(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월27일
(11) 등록번호 10-2747409
(24) 등록일자 2024년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0122937
(22) 출원일자 2022년09월28일
심사청구일자 2024년03월27일
(65) 공개번호 10-2023-0047009
(43) 공개일자 2023년04월06일
(30) 우선권주장
PCT/JP2021/035917 2021년09월29일
대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020210068061 A*
WO2019135404 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고
(72) 발명자
이시이 신야
일본 가나가와켄 가마쿠라시 가지와라 200반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
가미카와 다카유키
일본 가나가와켄 가마쿠라시 가지와라 200반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

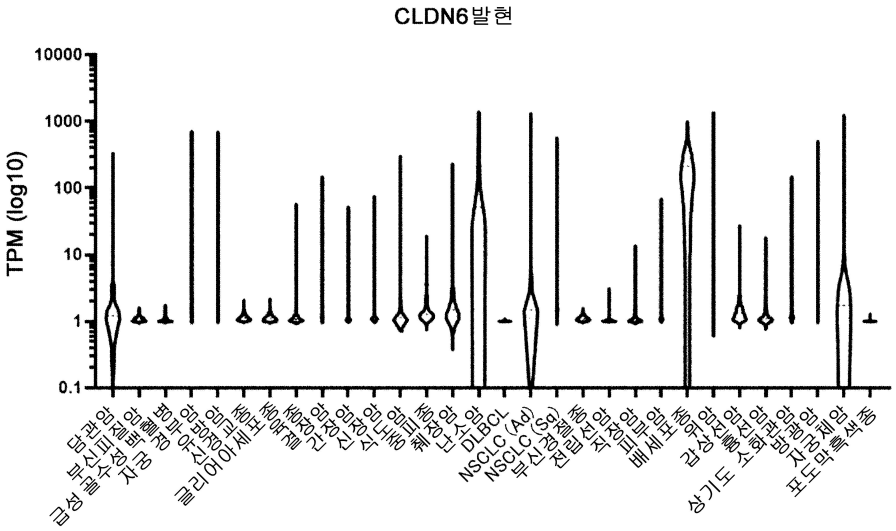
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 **암의 치료에 이용하기 위한 세포 상해 유도 치료제**

(57) 요 약

본 개시는, 표적 암 세포, 특히, 암 세포 등의 CLDN6 발현 세포에 T 세포를 효율적이고 또한 특이적으로 동원할 수 있고, 또한 CLDN6 발현 세포를 함유하는 표적 암 조직에 대한 T 세포의 세포 상해 활성을 통해서 암을 치료할 수 있는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 항암제, 당해 항암제와 적어도 하나의 다른 항암제의 병용 요법, 및 당해 병용 요법에 이용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/04 (2018.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
(72) 발명자
기무라 나오키
일본 가나가와켄 가마쿠라시 가지와라 200반치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
고다마 다쓰시
일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시무로마치 2초메 1반1고 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

이하를 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, 항암제:

서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2)로 이루어지는 제 2 항원 결합 부분, 및 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4)로 이루어지는 제 1 항원 결합 부분.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 항원 결합 부분은,

(i) CD3에 결합하는,

(ii) CD137에 결합하는, 또는

(iii) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 혹은 CD137 중 어느 하나에 결합하는,

항암제.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 암인, 항암제.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, 항암제.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

적어도 하나의 다른 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, 항암제.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 CLDN6 양성의 암이, 다른 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, 항암제.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 CLDN6 양성의 암이, 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, 항암제.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 항암제.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, 세포 상해를 유도하는, 항암제.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 세포 상해는, T 세포 의존적 세포 상해인, 항암제.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는, 클로딘 6을 표적으로 하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 항암제, 및 적어도 하나의 다른 항암제와의 병용 요법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 클로딘 패밀리는, 4개의 막관통 도메인을 가져, 타이트 정션을 구성하는, 분자량 대략 23kD의 세포막 단백질의 패밀리이다. 클로딘 패밀리는, 인간 및 마우스에 있어서 24종류의 멤버를 포함하고, 클로딘 패밀리의 각 멤버는, 각 상피 세포형에 응하여 매우 독특한 발현 패턴을 나타냄이 공지이다(비특허문헌 1~비특허문헌 4). 상피 세포의 시트에 있어서는, 물질이 세포 간극으로 누출(확산)되는 것을 막도록 어떤 기구가 작용하고, 타이트 정션으로 불리는 세포간 접착 시스템은, 이 누출을 막는 기구에 있어서 「배리어」로서의 중심적 역할을 실제로 함이 나타나 있다.

[0003] 타이트 정션 분자 클로딘 6(CLDN6)은, 클로딘 패밀리 단백질의 멤버이며, 정상적인 생체 조직에서는 전사적으로 발현하고 있지 않지만(비특허문헌 5 및 비특허문헌 6), 난소암, NSCLC, 및 위암 등의 복수 종류의 암에서는 발현 상승을 나타낸다(비특허문헌 7~비특허문헌 9).

[0004] 항CLDN6 항체에 관해서, CLDN6에 대한 단일 특이성 항체는, CLDN6 양성 암 세포주에 대해서 ADCC 활성 또는 내부 이행 활성을 가짐이 보고되어 있다(특허문헌 1~특허문헌 5). 지금까지, 6PHU3이라고 명명된, CLDN6을 표적으로 하는 T 세포 리다이렉팅 이중 특이성 항체가, 항CD3/항CLDN6 특이성을 갖는 이중 특이성 $sc(Fv)_2$ 형식을 이용하여 만들어지고 있다(특허문헌 6~특허문헌 7). 전(前)임상 평가에 있어서, 6PHU3은, in vitro 및 in vivo에서 암 세포의 강력한 살상을 나타냄이 보고되어 있다(비특허문헌 10).

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) WO2009/087978

(특허문헌 0002) WO2011/057788

(특허문헌 0003) WO2012/003956

(특허문헌 0004) WO2012/156018

(특허문헌 0005) WO2015/069794

(특허문헌 0006) WO2014/075697

(특허문헌 0007) WO2014/075788

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Furuse and Tsukita, TRENDS in Cell Biology 2006, 16: 181

(비특허문헌 0002) Wilcox, et al., Cell 2001, 104: 165

(비특허문헌 0003) Rahner, et al., GASTROENTEROLOGY 2001, 120: 411

(비특허문헌 0004) Morita, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96: 511

(비특허문헌 0005) Dev Dyn. 2004 Oct;231(2):425-31.

(비특허문헌 0006) Am J Physiol Renal Physiol. 2006 Dec;291(6):F1132-41.

(비특허문헌 0007) Int J Cancer. 2014 Nov 1;135(9):2206-14.

(비특허문헌 0008) Histopathology. 2012 Dec;61(6):1043-56.

(비특허문헌 0009) J Gastrointest Cancer. 2010 Mar;41(1):52-9.

(비특허문헌 0010) Oncoimmunology. 2015 Oct 29;5(3):e1091555.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시의 목적은, 표적 암 세포, 특히, 암 세포 등의 CLDN6 발현 세포에 T 세포를 효율적이고 또한 특이적으로 동원할 수 있고, 또한 CLDN6 발현 세포를 함유하는 표적 암 조직에 대한 T 세포의 세포 상해 활성을 통해서 암을 치료할 수 있는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제를 제공하는 것이다. 또한 본 발명은, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 다른 약제를 이용한 병용 요법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은, CD3 및 CD137(4-1BB)에 결합할 수 있고, CD3과 CD137 중 어느 하나에 결합하는(즉, CD3 및 CD137에 듀얼(dual) 결합성이지만, 동시에는 결합하지 않는) 제 1 항원 결합 부분과, 암 조직에 특이적으로 발현하고 있는 분자, 특히 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 발견했다. 본 발명자들은, 본 발명에 따른 다중 특이성 항원 결합 분자가, CLDN6 발현 암 세포를 포함하는 암 세포를 상해함을 분명히 했다. 본 발명은, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제를 이용한 병용 요법, 및 다중 특이성 항원 결합 분자와 항암제를 조합하여 이루어지는 의약 조성물을 제공한다.

[0009] 보다 구체적으로는, 본 개시는 이하를 제공한다:

[0010] (A-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제:

[0011] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0012] (A-2) 이하의 (1)~(6) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제:

[0013] (1) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0014] (2) 서열 번호: 9의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 15의 CDR 2, 및 서열 번호: 21의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0015] (3) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0016] (4) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0017] (5) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0018] (6) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0019] (A-3) 상기 제 1 항체 가변 영역, 상기 제 2 항체 가변 영역, 상기 제 3 항체 가변 영역, 및 상기 제 4 항체 가변 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나가, 인간 항체 프레임워크 또는 인간화 항체 프레임워크를 포함하는, (A-2)의 항암제.

[0020] (A-4) 이하의 (I)~(VI) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제:

[0021] (I) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0022] (II) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0023] (III) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함

하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0024] (IV) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0025] (V) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자;

[0026] (VI) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역; 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역; 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0027] (A-5) 상기 제 1 항체 가변 영역과 상기 제 2 항체 가변 영역이, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분을 구성하고, 상기 제 3 항체 가변 영역과 상기 제 4 항체 가변 영역이, CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 구성하는, (A-2)~(A-4) 중 어느 하나의 항암제.

[0028] (A-6) 상기 제 1 항체 가변 영역과 상기 제 2 항체 가변 영역이, CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분을 구성하고, 상기 제 3 항체 가변 영역과 상기 제 4 항체 가변 영역이, CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 구성하는, (A-2)~(A-4) 중 어느 하나의 항암제.

[0029] (A-7) 상기 제 1 항체 가변 영역과 상기 제 2 항체 가변 영역이, CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분을 구성하고, 상기 제 3 항체 가변 영역과 상기 제 4 항체 가변 영역이, CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 구성하는, (A-2)~(A-4) 중 어느 하나의 항암제.

[0030] (A-8) (i) CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0031] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0032] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0033] 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (a1)~(a4):

[0034] (a1) 서열 번호: 9의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 15의 CDR 2, 및 서열 번호: 21의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0035] (a2) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0036] (a3) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0037] (a4) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역

[0038] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0039] (A-9) 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (b1)~(b3):

[0040] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0041] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR

3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0042] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0043] 중 어느 하나를 포함하는, (A-8)의 항암제.

[0044] (A-10) (i) CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0045] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0046] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0047] 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (b1)~(b3):

[0048] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0049] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0050] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0051] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0052] (A-11) 상기 제 1 항체 가변 영역, 상기 제 2 항체 가변 영역, 상기 제 3 항체 가변 영역, 및 상기 제 4 항체 가변 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나가, 인간 항체 프레임워크 또는 인간화 항체 프레임워크를 포함하는, (A-8)~(A-10) 중 어느 하나의 항암제.

[0053] (A-12) (i) CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0054] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0055] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0056] 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (c1)~(c4):

[0057] (c1) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0058] (c2) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0059] (c3) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0060] (c4) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역

[0061] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0062] (A-13) 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (d1)~(d3):

[0063] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0064] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0065] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포

함하는 제 4 항체 가변 영역

[0066] 중 어느 하나를 포함하는, (A-12)의 항암제.

[0067] (A-14) (i) CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0068] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0069] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0070] 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (d1)~(d3):

[0071] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0072] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0073] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역

[0074] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0075] (A-15) (i) CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0076] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0077] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0078] 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (a1)~(a4):

[0079] (a1) 서열 번호: 9의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 15의 CDR 2, 및 서열 번호: 21의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0080] (a2) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0081] (a3) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0082] (a4) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역

[0083] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0084] (A-16) 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (b1)~(b3):

[0085] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0086] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0087] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0088] 중 어느 하나를 포함하는, (A-15)의 항암제.

[0089] (A-17) (i) CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0090] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0091] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0092] 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (b1)~(b3):

[0093] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0094] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0095] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0096] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0097] (A-18) 상기 제 1 항체 가변 영역, 상기 제 2 항체 가변 영역, 상기 제 3 항체 가변 영역, 및 상기 제 4 항체 가변 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나가, 인간 항체 프레임워크 또는 인간화 항체 프레임워크를 포함하는, (A-15)~(A-17) 중 어느 하나의 항암제.

[0098] (A-19) (i) CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0099] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0100] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0101] 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (c1)~(c4):

[0102] (c1) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0103] (c2) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0104] (c3) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0105] (c4) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역

[0106] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0107] (A-20) 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (d1)~(d3):

[0108] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0109] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0110] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역

[0111] 중 어느 하나를 포함하는, (A-19)의 항암제.

[0112] (A-21) (i) CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및

[0113] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분

[0114] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제로서,

[0115] 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (d1)~(d3):

[0116] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0117] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0118] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역

[0119] 중 어느 하나를 포함하는, 항암제.

[0120] (A-22) 이하의 (c1)~(c4):

[0121] (c1) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0122] (c2) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0123] (c3) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0124] (c4) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역

[0125] 중 어느 하나를 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제.

[0126] (A-23) 이하의 (d1)~(d3):

[0127] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0128] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0129] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역

[0130] 중 어느 하나를 추가로 포함하는, (A-22)의 항암제.

[0131] (A-24) 이하의 (d1)~(d3):

[0132] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0133] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0134] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역

[0135] 중 어느 하나를 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제.

[0136] (A-25) 이하의 (a1)~(a4):

[0137] (a1) 서열 번호: 9의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 15의 CDR 2, 및 서열 번호: 21의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0138] (a2) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포

함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0139] (a3) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0140] (a4) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역

[0141] 중 어느 하나를 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제.

[0142] (A-26) 이하의 (b1)~(b3):

[0143] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0144] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0145] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0146] 중 어느 하나를 추가로 포함하는, (A-25)의 항암제.

[0147] (A-27) 이하의 (b1)~(b3):

[0148] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0149] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0150] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역

[0151] 중 어느 하나를 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 항암제.

[0152] (A-28) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcγ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인을 추가로 포함하는, (A-1)~(A-27) 중 어느 하나의 항암제.

[0153] (A-29) 상기 Fc 도메인이, 제 1 Fc 영역 서브유닛 및 제 2 Fc 영역 서브유닛으로 구성되는, (A-28)의 항암제.

[0154] (A-30) 상기 Fc 도메인이, 이하의 (e1) 또는 (e2):

[0155] (e1) 349위에 Cys, 366위에 Ser, 368위에 Ala, 및 407위에 Val을 포함하는, 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 354위에 Cys 및 366위에 Trp를 포함하는 제 2 Fc 영역 서브유닛;

[0156] (e2) 439위에 Glu를 포함하는 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 356위에 Lys를 포함하는 제 2 Fc 영역 서브유닛

[0157] 을 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, (A-29)의 항암제.

[0158] (A-31) 제 1 및/또는 제 2 Fc 영역 서브유닛이, 이하의 (f1) 또는 (f2):

[0159] (f1) 234위에 Ala 및 235위에 Ala;

[0160] (f2) 234위에 Ala, 235위에 Ala, 및 297위에 Ala

[0161] 를 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, (A-29) 또는 (A-30)의 항암제.

[0162] (A-32) 상기 Fc 도메인이, 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 FcRn에 대한 보다 강력한 FcRn 결합 친화성을 추가로 나타내는, (A-29)~(A-31) 중 어느 하나의 항암제.

[0163] (A-33) 상기 제 1 및/또는 제 2 Fc 영역 서브유닛이, 428위에 Leu, 434위에 Ala, 438위에 Arg, 및 440위에 Glu를 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, (A-32)의 항암제.

[0164] (A-34) 제 1 항원 결합 부분의 제 1 항체 가변 영역이 제 1 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 1 항원 결합 부분의 제 2 항체 가변 영역이 제 1 경쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 3 항체 가변 영역이 제 2 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 4 항체 가변 영역이 제 2 경쇄 정상 영역에 융합되어 있고,

[0165] 해당 정상 영역이, 이하의 (g1)~(g7):

[0166] (g1) 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0167] (g2) 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 81의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0168] (g3) 서열 번호: 79의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 80의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0169] (g4) 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 82의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0170] (g5) 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0171] (g6) 서열 번호: 77의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0172] (g7) 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역

[0173] 중 어느 하나인, (A-1)~(A-27) 중 어느 하나의 항암제.

[0174] (A-35) 이하의 (h01)~(h18):

[0175] (h01) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0176] (h02) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0177] (h03) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0178] (h04) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경

쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0179] (h05) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0180] (h06) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0181] (h07) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0182] (h08) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0183] (h09) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0184] (h10) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0185] (h11) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0186] (h12) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0187] (h13) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0188] (h14) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0189] (h15) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0190] (h16) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0191] (h17) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4); 및

[0192] (h18) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4)

[0193] 중 어느 하나인 4개의 폴리펩티드쇄의 조합을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0194] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제.

[0195] (A-36) (i) 쇄 3에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 4에 포함되는 항체 가변 영역이, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분을 형성하고;

[0196] (ii) 쇄 1에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 2에 포함되는 항체 가변 영역이, 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 형성하고;

[0197] (iii) 쇄 1에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛 및 쇄 3에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛이, Fc 도메인을 형성하는,

[0198] (A-35)의 항암제.

[0199] (A-37) (i) 쇄 3에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 4에 포함되는 항체 가변 영역이, CD3에 결합하는 제 1 항원 결합 부분을 형성하고;

[0200] (ii) 쇄 1에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 2에 포함되는 항체 가변 영역이,

[0201] 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분을 형성하고;

[0202] (iii) 쇄 1에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛 및 쇄 3에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛이, Fc 도메인을 형성하는,

[0203] (A-35)의 항암제.

[0204] (A-38) (i) 쇄 3에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 4에 포함되는 항체 가변 영역이, CD137에 결합하는 제 1 항원 결합 부분을 형성하고;

[0205] (ii) 쇄 1에 포함되는 항체 가변 영역 및 쇄 2에 포함되는 항체 가변 영역이, 클로딘 6(CLDN6)에 결합하는 제 2 항원 결합 부분을 형성하고;

[0206] (iii) 쇄 1에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛 및 쇄 3에 포함되는 항체 Fc 영역 서브유닛이, Fc 도메인을 형성하는,

[0207] (A-35)의 항암제.

[0208] (A-39) (A-5)~(A-7) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자가 결합하는 CLDN6 및 CD3/CD137 상의 에피토프와 각각 중복 및/또는 경합하는 에피토프에 결합하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제.

[0209] (A-40) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (A-1)~(A-39) 중 어느 하나의 항암제.

[0210] (A-41) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 암인, (A-1)~(A-40) 중 어느 하나의 항암제.

[0211] (A-42) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (A-1)~(A-41) 중 어느 하나의 항암제.

[0212] (A-43) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (A-1)~(A-42) 중 어느 하나의 항암제.

[0213] (A-44) 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은 상기 적어도 하나의 다른 함암제와는 상이한 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (A-1)~(A-43) 중 어느 하나의 항암제.

[0214] (A-45) 상기 CLDN6 양성의 암이, 다른 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (A-40)~(A-44) 중 어느 하나의 항암제.

[0215] (A-46) 상기 CLDN6 양성의 암이, 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (A-40)~(A-45) 중 어느 하나의 항암제.

[0216] (A-47) 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, (A-1)~(A-46) 중 어느 하나의 항암제.

[0217] (A-48) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, 세포 상해를 유도하는, (A-1)~(A-47) 중 어느 하나의 항암제.

[0218] (A-49) 상기 세포 상해는, T 세포 의존적 세포 상해인, (A-48)의 항암제.

[0219] 더욱이, 본 개시는 이하를 제공한다:

[0220] (B-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 다른 항암제와 병용하기 위한 의약 조성물:

[0221] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0222] (B-2) (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 다른 항암제와 병용하기 위한 의약 조성물.

[0223] (B-3) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (B-1) 또는 (B-2)의 의약 조성물.

[0224] (B-4) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (B-1)~(B-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0225] (B-5) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (B-1)~(B-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0226] (B-6) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (B-1)~(B-5) 중 어느 하나의 의약 조성물

[0227] (B-7) 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 함암제와는 상이한 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (B-1)~(B-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0228] (B-8) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 함암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (B-1)~(B-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0229] (B-9) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (B-1)~(B-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0230] (B-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (B-1)~(B-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0231] (B-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (B-1)~(B-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0232] (B-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여에 의해 CLDN6의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B-1)~(B-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0233] (B-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 함암제의 투여에 의해 TGFβ의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B-1)~(B-12) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0234] (B-14) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 함암제의 투여에 의해 TGFβ1의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B-1)~(B-13) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0235] (B-15) 상기 적어도 하나의 다른 함암제의 투여에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (B-1)~(B-14) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0236] (B-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (B-1)~(B-15) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0237] (B-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (B-1)~(B-16) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0238] (B-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, TGFβ 유도 효과를 갖는 약제인, (B-1)~(B-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0239] (B-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (B-16) 내지 (B-18) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0240] (B-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0241] (B-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (B-16)~(B-20) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0242] (B-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0243] (B-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0244] (B-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0245] (B-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0246] (B-26) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (B-16)~(B-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0247] (B-27) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (B-16)의 의약 조성물.

[0248] (B-28) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (B-16)의 의약 조성물.

[0249] (B-29) (B-1)~(B-28) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0250] (B2-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 TGFβ를 유도하는 치료법과 병용하기 위한 의약 조성물:

[0251] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0252] (B2-2) 상기 TGFβ를 유도하는 치료법은, TGFβ를 유도하는 제의 투여인, (B2-1)의 의약 조성물.

[0253] (B2-3) 상기 TGFβ를 유도하는 치료법은, TGFβ1을 유도하는 제의 투여인, (B2-1) 또는 (B2-2)의 의약 조성물.

[0254] (B2-4) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (B2-1)~(B2-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0255] (B2-5) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브드이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (B2-1)~(B2-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0256] (B2-6) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (B2-1)~(B2-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0257] (B2-7) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (B2-1)~(B2-6) 중 어느 하나의 의약 조성물

[0258] (B2-8) 상기 TGFβ를 유도하는 치료법에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (B2-1)~(B2-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0259] (B2-9) 대상으로 하는 암이, 상기 TGFβ를 유도하는 치료법에 의한 치료 경험이 있는 암, 또는, 상기 TGFβ를 유도하는 치료법에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (B2-1)~(B2-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0260] (B2-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물이, 상기 TGFβ를 유도하는 치료와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (B2-1)~(B2-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0261] (B2-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 TGFβ를 유도하는 치료 전, 치료와 동시, 및/또는 치료 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (B2-2)~(B2-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0262] (B2-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 TGFβ를 유도하는 치료에 의해 CLDN6의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B2-1)~(B2-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0263] (B2-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 TGFβ를 유도하는 치료에 의해 TGFβ의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B2-1)~(B2-12) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0264] (B2-14) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 TGFβ를 유도하는 치료에 의해 TGFβ1의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B2-1)~(B2-13) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0265] (B2-15) 상기 TGFβ를 유도하는 치료에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (B2-

1)~(B2-14) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0266] (B2-16) (B2-1)~(B2-15) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0267] (B3-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와 병용하기 위한 의약 조성물:

[0268] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0269] (B3-2) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (B3-1)의 의약 조성물.

[0270] (B3-3) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (B3-1) 또는(B3-2)의 의약 조성물.

[0271] (B3-4) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (B3-1)~(B3-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0272] (B3-5) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인, (B3-1)~(B3-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0273] (B3-6) 상기 CLDN6 발현 유도제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (B3-1)~(B3-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0274] (B3-7) 대상으로 하는 암이, 상기 CLDN6 발현 유도제에 의한 치료 경험이 있는 암, 또는 상기 CLDN6 발현 유도제에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (B3-1)~(B3-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0275] (B3-8) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함한 의약 조성물이, 상기 CLDN6 발현 유도제와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (B3-1)~(B3-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0276] (B3-9) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 CLDN6 발현 유도제 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (B3-1)~(B3-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0277] (B3-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 CLDN6 발현 유도제의 투여에 의해 CLDN6의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B3-1)~(B3-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0278] (B3-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 CLDN6 발현 유도제의 투여에 의해 TGFβ의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B3-1)~(B3-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0279] (B3-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 CLDN6 발현 유도제의 투여에 의해 TGFβ1의 발현이 증가한 암을 갖는 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (B3-1)~(B3-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0280] (B3-13) 상기 CLDN6 발현 유도제의 투여에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (B3-1)~(B3-12) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0281] (B3-14) (B3-1)~(B3-13) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0282] 더욱이, 본 개시는 이하를 제공한다:

[0283] (C-1) (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하고, 또한 상기 제 1 항원 결합 부분이 CD3에만 결합할 수 있는 항원 결합 부분인 경우와 비교하여 세포 상해 활성이 높은, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0284] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제.

[0285] (C-2) (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하고, 또한 상기 제 1 항원 결합 부분이 CD3에만 결합할 수 있는 항원 결합 부분인 경우와 비교하여 독성이 낮은, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0286] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제.

[0287] (C-3) (1) T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 제 1 항원 결합 부분, 및 (2) CLDN6에 결합할 수 있는 제 2

항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 서열 번호: 194의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 192의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 항원 결합 부분 및 서열 번호: 193의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 195의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 CLDN6에 결합할 수 있는 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항체(CS3348)와 비교하여, T 세포 상해 활성이 동등 또는 그 이상인, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0288] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제.

[0289] (C-4) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (3) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcγ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인을 추가로 포함하는, (C-1)~(C-3) 중 어느 하나의 항암제.

[0290] (C-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 다중 특이성 항체(CS3348)와 비교하여 독성이 낮은 것을 추가로 특징으로 하는, (C-1), (C-3), 또는 (C-4)의 항암제.

[0291] (C-6) 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (a1) 또는 (a2)로부터 선택되는 항체 가변 영역의 조합, 또는, 이것과 기능적으로 동등한 항체 가변 영역의 조합을 포함하는, (C-1)~(C-5) 중 어느 하나의 항암제:

[0292] (a1) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역;

[0293] (a2) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는, 제 1 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는, 제 2 항체 가변 영역.

[0294] (C-7) 제 2 항원 결합 부분이 이하의 (b1) 또는 (b2)로부터 선택되는 항체 가변 영역의 조합, 또는, 이것과 기능적으로 동등한 항체 가변 영역의 조합을 포함하는, (C-1)~(C-6) 중 어느 하나의 항암제:

[0295] (b1) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역;

[0296] (b2) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는, 제 3 항체 가변 영역; 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는, 제 4 항체 가변 영역.

[0297] (C-8) 제 1 항원 결합 부분이, 이하의 (c1) 또는 (c2)로부터 선택되는 항체 가변 영역의 조합, 또는, 이것과 기능적으로 동등한 항체 가변 영역의 조합을 포함하는, (C-1)~(C-7) 중 어느 하나의 항암제:

[0298] (c1) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역;

[0299] (c2) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 항체 가변 영역.

[0300] (C-9) 제 2 항원 결합 부분이, 이하의 (d1) 또는 (d2)로부터 선택되는 항체 가변 영역의 조합, 또는, 이것과 기능적으로 동등한 항체 가변 영역의 조합을 포함하는, (C-1)~(C-8) 중 어느 하나의 항암제:

[0301] (d1) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역;

[0302] (d2) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 항체 가변 영역, 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 제 4 항체 가변 영역.

[0303] (C-10) 상기 Fc 도메인이, 제 1 Fc 영역 서브유닛 및 제 2 Fc 영역 서브유닛으로 구성되는, (C-4)~(C-9) 중 어느 하나의 항암제.

[0304] (C-11) 상기 Fc 도메인이, 이하의 (e1) 또는 (e2):

[0305] (e1) 349위에 Cys, 366위에 Ser, 368위에 Ala, 및 407위에 Val을 포함하는, 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 354위에 Cys 및 366위에 Trp를 포함하는 제 2 Fc 영역 서브유닛;

[0306] (e2) 439위에 Glu를 포함하는 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 356위에 Lys를 포함하는 제 2 Fc 영역 서브유닛

[0307] 을 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, (C-4)~(C-10) 중 어느 하나의 항암제.

[0308] (C-12) 제 1 및/또는 제 2 Fc 영역 서브유닛이, 이하의 (f1) 또는 (f2):

[0309] (f1) 234위에 Ala 및 235위에 Ala;

[0310] (f2) 234위에 Ala, 235위에 Ala, 및 297위에 Ala

[0311] 를 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, (C-9) 또는 (C-11)의 항암제.

[0312] (C-13) 상기 Fc 도메인이, 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 FcRn에 대한 보다 강력한 FcRn 결합 친화성을 추가로 나타내는, (C-4)~(C-12) 중 어느 하나의 항암제.

[0313] (C-14) 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, (C-1)~(C-13) 중 어느 하나의 항암제.

[0314] 더욱이, 본 개시는 이하를 제공한다:

[0315] (D-1) 적어도 하나의 다른 항암제를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물로서, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하기 위한 의약 조성물.

[0316] (D-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (D-1)의 의약 조성물.

[0317] (D-3) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (D-1) 또는 (D-2) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0318] (D-4) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (D-1)~(D-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0319] (D-5) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (D-1)~(D-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0320] (D-6) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (D-1)~(D-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0321] (D-7) 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (D-1)~(D-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0322] (D-8) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (D-1)~(D-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0323] (D-9) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (D-1)~(D-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0324] (D-10) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (D-1)~(D-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0325] (D-11) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (D-1)~(D-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0326] (D-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여에 의해 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 항종양 효과를 증강시키는, (D-1)~(D-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0327] (D-13) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (D-1)~(D-12) 중 어느 1개 의약 조성물.

[0328] (D-14) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (D-1)~(D-13) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0329] (D-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (D-1)~(D-14) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0330] (D-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (D-1)~(D-15) 중 어느 하

나의 의약 조성물.

[0331] (D-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (D-13)~(D-16) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0332] (D-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0333] (D-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 식물 알칼로이드인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0334] (D-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (D-3)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0335] (D-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0336] (D-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0337] (D-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0338] (D-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (D-13)~(D-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0339] (D-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (D-13)의 의약 조성물.

[0340] (D-26) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (D-13)의 의약 조성물.

[0341] (D-27) (D-1)~(D-26) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0342] 더욱이, 본 개시는 이하를 제공한다:

[0343] (E-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0344] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0345] (E-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (E-1)의 의약 조성물.

[0346] (E-3) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (E-1) 또는 (E-2) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0347] (E-4) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (E-1)~(E-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0348] (E-5) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (E-1)~(E-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0349] (E-6) 상기 암이, 복막 파종된 암인 (E-1)~(E-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0350] (E-7) 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (E-1)~(E-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0351] (E-8) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (E-1)~(E-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0352] (E-9) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (E-1)~(E-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0353] (E-10) 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (E-1)~(E-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0354] (E-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여에 의해 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 항종양 효과를 증강하는, (E-1)~(E-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0355] (E-12) 상기 의약 조성물이 배합제인 것을 특징으로 하는, (E-1)~(E-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0356] (E-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와, 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (E-1)~(E-12) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0357] (E-14) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 (E-13)의 의약 조성물.

[0358] (E-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (E-1)~(E-14) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0359] (E-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (E-1)~(E-15) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0360] (E-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (E-1)~(E-16) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0361] (E-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (E-1)~(E-17) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0362] (E-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 식물 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (E-15)~(E-18) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0363] (E-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0364] (E-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0365] (E-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0366] (E-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0367] (E-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0368] (E-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0369] (E-26) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (E-15)~(E-19) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0370] (E-27) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (E-15)의 의약 조성물.

[0371] (E-28) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (E-15)의 의약 조성물.

[0372] (E-29) (E-1)~(E-28) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0373] (E2-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0374] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0375] (E2-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (E2-1)의 의약 조성물.

[0376] (E2-3) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (E2-1) 또는 (E2-2) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0377] (E2-4) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (E2-1)~(E2-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0378] (E2-5) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (E2-1)~(E2-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0379] (E2-6) 상기 암이, 복막 파종된 암인 (E2-1)~(E2-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0380] (E2-7) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제와는 상이한 TGFβ 유도제에

의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (E2-1)~(E2-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0381] (E2-8) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제와는 상이한 TGFβ 유도제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (E2-1)~(E2-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0382] (E2-9) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (E2-1)~(E2-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0383] (E2-10) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 투여에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (E2-1)~(E2-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0384] (E2-11) 상기 의약 조성물이 배합제인 것을 특징으로 하는, (E2-1)~(E2-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0385] (E2-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (E2-1)~(E2-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0386] (E2-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 (E2-12)의 의약 조성물.

[0387] (E2-14) (E2-1)~(E2-13) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0388] (E3-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0389] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0390] (E3-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (E3-1)의 의약 조성물.

[0391] (E3-3) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (E3-1) 또는 (E3-2) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0392] (E3-4) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (E3-1)~(E3-3) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0393] (E3-5) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (E3-1)~(E3-4) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0394] (E3-6) 상기 암이, 복막 파종된 암인 (E3-1)~(E3-5) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0395] (E3-7) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와는 상이한 CLDN6 발현 유도제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (E3-1)~(E3-6) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0396] (E3-8) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와는 상이한 CLDN6 발현 유도제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (E3-1)~(E3-7) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0397] (E3-9) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (E3-1)~(E3-8) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0398] (E3-10) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 투여에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (E3-1)~(E3-9) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0399] (E3-11) 상기 의약 조성물이 배합제인 것을 특징으로 하는, (E3-1)~(E3-10) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0400] (E3-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (E3-1)~(E3-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0401] (E3-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 (E3-12)의 의약 조성물.

[0402] (E3-14) (E3-1)~(E3-13) 중 어느 하나의 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포

증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0403] (F-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제의 조합:

[0404] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0405] (F-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (F-1)의 조합.

[0406] (F-3) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (F-1) 또는 (F-2)의 조합.

[0407] (F-4) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (F-1)~(F-3) 중 어느 하나의 조합.

[0408] (F-5) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (F-1)~(F-4) 중 어느 하나의 조합.

[0409] (F-6) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (F-1)~(F-5) 중 어느 하나의 조합.

[0410] (F-7) 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (F-1)~(F-6) 중 어느 하나의 조합.

[0411] (F-8) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (F-1)~(F-7) 중 어느 하나의 조합.

[0412] (F-9) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (F-1)~(F-8) 중 어느 하나의 조합.

[0413] (F-10) 상기 적어도 하나의 다른 항암제에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (F-1)~(F-9) 중 어느 하나의 조합.

[0414] (F-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자에 의해 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 항종양 효과를 증강하는, (F-1)~(F-9) 중 어느 하나의 조합.

[0415] (F-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (F-1)~(F-11) 중 어느 하나의 조합.

[0416] (F-13) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (F-1)~(F-12) 중 어느 하나의 조합.

[0417] (F-14) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (F-1)~(F-13) 중 어느 하나의 조합.

[0418] (F-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (F-1)~(F-14) 중 어느 하나의 조합.

[0419] (F-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (F-1)~(F-15) 중 어느 하나의 조합.

[0420] (F-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (F-1)~(F-16) 중 어느 하나의 조합.

[0421] (F-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (F-14)~(F-17) 중 어느 하나의 조합.

[0422] (F-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (F-14)~(F-18) 중 어느 하나의 조합.

[0423] (F-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (F-14)~(F-18) 중 어느 하나의 조합.

[0424] (F-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (F-14)~(F-18) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0425] (F-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (F-14)~(F-18) 중 어느 하나의 조합.

[0426] (F-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (F-14)~(F-17) 중 어느 하나의 조합.

[0427] (F-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (F-14)~(F-17) 중 어느 하나의 조합.

[0428] (F-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (F-14)~(F-17) 중 어느 하나의 조합.

[0429] (F-26) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (F-14)의 조합.

[0430] (F-27) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (F-14)의 조합.

[0431] (F-28) (F-1)~(F-27) 중 어느 하나의 조합을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0432] (F2-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 조합:

[0433] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0434] (F2-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (F2-1)의 조합.

[0435] (F2-3) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (F2-1) 또는 (F2-2)의 조합.

[0436] (F2-4) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (F2-1)~(F2-3) 중 어느 하나의 조합.

[0437] (F2-5) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (F2-1)~(F2-4) 중 어느 하나의 조합.

[0438] (F2-6) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (F2-1)~(F2-5) 중 어느 하나의 조합.

[0439] (F2-7) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제와는 상이한 TGFβ 유도제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (F2-1)~(F2-6) 중 어느 하나의 조합.

[0440] (F2-8) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제와는 상이한 TGFβ 유도제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (F2-1)~(F2-7) 중 어느 하나의 조합.

[0441] (F2-9) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (F2-1)~(F2-8) 중 어느 하나의 조합.

[0442] (F2-10) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (F2-1)~(F2-9) 중 어느 하나의 조합.

[0443] (F2-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (F2-1)~(F2-10) 중 어느 하나의 조합.

[0444] (F2-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (F2-1)~(F2-11) 중 어느 하나의 조합.

[0445] (F2-13) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (F2-1)~(F2-12) 중 어느 하나의 조합.

[0446] (F2-14) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (F2-1)~(F2-13) 중 어느 하나의 조합.

[0447] (F2-15) (F2-1)~(F2-14) 중 어느 하나의 조합을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0448] (F3-1) 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 조합:

[0449] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0450] (F3-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자

인, (F3-1)의 조합.

[0451] (F3-3) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (F3-1) 또는 (F3-2)의 조합.

[0452] (F3-4) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (F3-1)~(F3-3) 중 어느 하나의 조합.

[0453] (F3-5) 대상으로 하는 암이, 복막으로 전이된 암인, (F3-1)~(F3-4) 중 어느 하나의 조합.

[0454] (F3-6) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (F3-1)~(F3-5) 중 어느 하나의 조합.

[0455] (F3-7) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와는 상이한 CLDN6 발현 유도제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (F3-1)~(F3-6) 중 어느 하나의 조합.

[0456] (F3-8) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제, 혹은, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와는 상이한 CLDN6 발현 유도제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (F3-1)~(F3-7) 중 어느 하나의 조합.

[0457] (F3-9) 대상으로 하는 암이, 상기 적어도 하나의 다른 CLDN6 발현 유도제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (F3-1)~(F3-8) 중 어느 하나의 조합.

[0458] (F3-10) 상기 적어도 하나의 다른 CLDN6 발현 유도제에 의해 상기 다중 특이성 항원 결합 분자의 항종양 효과를 증강하는, (F3-1)~(F3-9) 중 어느 하나의 조합.

[0459] (F3-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (F3-1)~(F3-10) 중 어느 하나의 조합.

[0460] (F3-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (F3-1)~(F3-11) 중 어느 하나의 조합.

[0461] (F3-13) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 세포의 TGFβ의 발현을 증강하는 제인, (F3-1)~(F3-12) 중 어느 하나의 조합.

[0462] (F3-14) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (F3-1)~(F3-13) 중 어느 하나의 조합.

[0463] (F3-15) (F3-1)~(F3-14) 중 어느 하나의 조합을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 또는 암 예방제.

[0464] (G-1) 유효량의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0465] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0466] 방법.

[0467] (G-2) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0468] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0469] 방법.

[0470] (G-3) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법으로서,

[0471] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합

하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0472] 방법.

[0473] (G-4) 개체에게, 유효량의 다중 특이성 항원 결합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 적어도 하나의 다른 항암제에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법으로서,

[0474] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0475] 방법.

[0476] (G-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (G-1)~(G-4) 중 어느 하나의 방법.

[0477] (G-6) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (G-1)~(G-5) 중 어느 하나의 방법.

[0478] (G-7) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (G-1)~(G-6) 중 어느 하나의 방법.

[0479] (G-8) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (G-1)~(G-7) 중 어느 하나의 방법.

[0480] (G-9) 상기 암이, 복막 파종된 암인, (G-1)~(G-8) 중 어느 하나의 방법.

[0481] (G-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (G-1)~(G-9) 중 어느 하나의 방법.

[0482] (G-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (G-1)~(G-10) 중 어느 하나의 방법.

[0483] (G-12) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (G-1)~(G-11) 중 어느 하나의 방법.

[0484] (G-13) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (G-1)~(G-12) 중 어느 하나의 방법.

[0485] (G-14) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (G-1)~(G-13) 중 어느 하나의 방법.

[0486] (G-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (G-1)~(G-14) 중 어느 하나의 방법.

[0487] (G-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (G-12)~(G-15) 중 어느 하나의 방법.

[0488] (G-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (G-12)~(G-16) 중 어느 하나의 방법.

[0489] (G-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (G-12)~(G-16) 중 어느 하나의 방법.

[0490] (G-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (G-12)~(G-16) 중 어느 하나의 의약조성물.

[0491] (G-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (G-12)~(G-16) 중 어느 하나의 방법.

[0492] (G-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (G-12)~(G-16) 방법.

[0493] (G-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (G-12)~(G-16) 방법.

[0494] (G-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (G-12)~(G-16) 방법.

[0495] (G-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (G-12) 방법.

[0496] (G-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (G-12) 방법.

[0497] (G2-1) 유효량의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0498] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0499] 방법.

[0500] (G2-2) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0501] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0502] 방법.

[0503] (G2-3) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법으로서,

[0504] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0505] 방법.

[0506] (G2-4) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (G2-1)~(G2-3) 중 어느 하나의 방법.

[0507] (G2-5) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (G2-1)~(G2-4) 중 어느 하나의 방법.

[0508] (G2-6) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (G2-1)~(G2-5) 중 어느 하나의 방법.

[0509] (G2-7) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (G2-1)~(G2-6) 중 어느 하나의 방법.

[0510] (G2-8) 상기 암이, 복막 파종된 암인, (G2-1)~(G2-7) 중 어느 하나의 방법.

[0511] (G2-9) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (G2-1)~(G2-8) 중 어느 하나의 방법.

[0512] (G2-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (G2-1)~(G2-9) 중 어느 하나의 방법.

[0513] (G2-11) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (G2-1)~(G2-10) 중 어느 하나의 방법.

[0514] (G2-12) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (G2-1)~(G2-11) 중 어느 하나의 방법.

[0515] (G3-1) 유효량의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0516] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0517] 방법.

[0518] (G3-2) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는,

면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법으로서,

[0519] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0520] 방법.

[0521] (G3-3) 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법으로서,

[0522] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0523] 방법.

[0524] (G3-4) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (G3-1)~(G3-3) 중 어느 하나의 방법.

[0525] (G3-5) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (G3-1)~(G3-4) 중 어느 하나의 방법.

[0526] (G3-6) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (G3-1)~(G3-5) 중 어느 하나의 방법.

[0527] (G3-7) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (G3-1)~(G3-6) 중 어느 하나의 방법.

[0528] (G3-8) 상기 암이, 복막 파종된 암인, (G3-1)~(G3-7) 중 어느 하나의 방법.

[0529] (G3-9) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (G3-1)~(G3-8) 중 어느 하나의 방법.

[0530] (G3-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 투여 전, 투여와 동시, 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (G3-1)~(G3-9) 중 어느 하나의 방법.

[0531] (G3-11) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 암 세포의 TGFβ의 발현을 증강하는 제인, (G2-1)~(G2-10) 중 어느 하나의 방법.

[0532] (G3-12) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (G3-1)~(G3-11) 중 어느 하나의 방법.

[0533] (H-1) 암 세포를, 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 적어도 하나의 다른 항암제와 접속시키는 것에 의해, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 상해를 야기시키는 방법, 또는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직의 증식을 억제하는 방법으로서,

[0534] 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는,

[0535] 방법.

[0536] (H-2) 암 세포를, 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 적어도 하나의 다른 항암제와 접속시키는 것에 의해, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 상해를 야기시키는지, 또는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직의 증식을 억제하는지를 확인하는 방법으로서, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[0537] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 방법.

[0538] (H-3) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (H-1) 또는 (H-2)의 방법.

[0539] (H-4) 상기 암 세포가, CLDN6 양성의 암 세포인, (H-1)~(H-3) 중 어느 하나의 방법.

[0540] (H-5) 상기 암 세포가, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또

는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 암의 암 세포인, (H-1)~(H-4) 중 어느 하나의 방법.

[0541] (H-6) 상기 암 세포가, 복막 파종된 암의 암 세포인, (H-1)~(H-5) 중 어느 하나의 방법.

[0542] (H-7) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (H-1)~(H-6) 중 어느 하나의 방법.

[0543] (H-8) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (H-1)~(H-7) 중 어느 하나의 방법.

[0544] (H-9) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (H-1)~(H-8) 중 어느 하나의 방법.

[0545] (H-10) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (H-1)~(H-9) 중 어느 하나의 방법.

[0546] (H-11) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (H-7)~(H-10) 중 어느 하나의 방법.

[0547] (H-12) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 방법.

[0548] (H-13) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 방법.

[0549] (H-14) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0550] (H-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 방법.

[0551] (H-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 방법.

[0552] (H-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0553] (H-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (H-7)~(H-11) 중 어느 하나의 의약 조성물.

[0554] (H-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (H-7)의 방법.

[0555] (H-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (H-7)의 방법.

[0556] (I-1) (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0557] (B) 용기, 및

[0558] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 1종의 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0559] 을 포함하는 키트.

[0560] (I-2) (A) 적어도 하나의 다른 항암제,

[0561] (B) 용기, 및

[0562] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0563] 을 포함하는 키트.

[0564] (I-3) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 적어도 하나의 다른 항암제가, 상기 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I-1) 또는 (I-2)의 키트.

[0565] (I-4) (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0566] (B) 용기, 및

[0567] (C) 적어도 하나의 다른 항암제

[0568] 를 포함하는 키트.

[0569] (I-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제가, 1개의 용기에 충전되어 있거나, 또는 각각 다른 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I-4)의 키트.

[0570] (I-6) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (I-1)~(I-5) 중 어느 하나의 키트.

[0571] (I-7) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (I-1)~(I-6) 중 어느 하나의 키트.

[0572] (I-8) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (I-1)~(I-7) 중 어느 하나의 키트.

[0573] (I-9) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (I-1)~(I-8) 중 어느 하나의 키트.

[0574] (I-10) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (I-1)~(I-9) 중 어느 하나의 키트.

[0575] (I-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (I-1)~(I-10) 중 어느 하나의 키트.

[0576] (I-12) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (I-1)~(I-11) 중 어느 하나의 키트.

[0577] (I-13) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (I-1)~(I-12) 중 어느 하나의 키트.

[0578] (I-14) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (I-1)~(I-13) 중 어느 하나의 키트.

[0579] (I-15) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (I-1)~(I-14) 중 어느 하나의 키트.

[0580] (I-16) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (I-1)~(I-15) 중 어느 하나의 키트.

[0581] (I-17) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (I-1)~(I-16) 중 어느 하나의 키트.

[0582] (I-18) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 백금 제제인, (I-1)~(I-17) 중 어느 하나의 키트.

[0583] (I-19) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 알칼로이드인, (I-1)~(I-17) 중 어느 하나의 키트.

[0584] (I-20) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 토포아이소메라제 저해제인, (I-1)~(I-17) 중 어느 하나의 키트.

[0585] (I-21) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 대사 길항약인, (I-1)~(I-17) 중 어느 하나의 키트.

[0586] (I-22) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (I-1)~(I-17) 중 어느 하나의 키트.

[0587] (I-23) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 이리노테칸인, (I-1)~(I-17)의 키트.

[0588] (I-24) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 겜시타빈인, (I-1)~(I-17)의 키트.

[0589] (I-25) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 항PD-L1 항체인, (I-1)~(I-17)의 키트.

[0590] (I-26) 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 올라파리브인, (I-1)~(I-17)의 키트.

[0591] (I2-1) (A) 적어도 하나의 TGFβ 유도제,

[0592] (B) 용기, 및

[0593] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0594] 을 포함하는 키트.

[0595] (I2-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 상기 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I2-1)의 키트.

[0596] (I2-3) (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0597] (B) 용기, 및

[0598] (C) 적어도 하나의 TGFβ 유도제

[0599] 를 포함하는 키트.

[0600] (I2-4) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 및 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 1개의 용기에 충전되어 있거나, 또는 각각 다른 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I2-3)의 키트.

[0601] (I2-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (I2-1)~(I2-4) 중 어느 하나의 키트.

[0602] (I2-6) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (I2-1)~(I2-5) 중 어느 하나의 키트.

[0603] (I2-7) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (I2-1)~(I2-6) 중 어느 하나의 키트.

[0604] (I2-8) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (I2-1)~(I2-7) 중 어느 하나의 키트.

[0605] (I2-9) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (I2-1)~(I2-8) 중 어느 하나의 키트.

[0606] (I2-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (I2-1)~(I2-9) 중 어느 하나의 키트.

[0607] (I2-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (I2-1)~(I2-10) 중 어느 하나의 키트.

[0608] (I2-12) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (I2-1)~(I2-11) 중 어느 하나의 키트.

[0609] (I2-13) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (I2-1)~(I2-12) 중 어느 하나의 키트.

[0610] (I2-14) 상기 적어도 하나의 TGFβ 유도제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (I2-1)~(I2-13) 중 어느 하나의 키트.

[0611] (I3-1) (A) 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제,

[0612] (B) 용기, 및

[0613] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0614] 을 포함하는 키트.

[0615] (I3-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 상기 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I3-1)의 키트.

[0616] (I3-3) (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0617] (B) 용기, 및

[0618] (C) 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제

[0619] 를 포함하는 키트.

[0620] (I3-4) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자 및 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 1개의 용기에 충전되어 있거나, 또는 각각 다른 용기에 충전되어 있는 것을 특징으로 하는, (I3-3)의 키트.

[0621] (I3-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (I3-1)~(I3-4) 중 어느 하나의 키트.

[0622] (I3-6) 대상으로 하는 암이, CLDN6 양성의 암인, (I3-1)~(I3-5) 중 어느 하나의 키트.

[0623] (I3-7) 대상으로 하는 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (I3-1)~(I3-6) 중 어느 하나의 키트.

[0624] (I3-8) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (I3-1)~(I3-7) 중 어느 하나의 키트.

[0625] (I3-9) 대상으로 하는 암이, 복막 파종된 암인 (I3-1)~(I3-8) 중 어느 하나의 키트.

[0626] (I3-10) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (I3-1)~(I3-9) 중 어느 하나의 키트.

[0627] (I3-11) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (I3-1)~(I3-10) 중 어느 하나의 키트.

[0628] (I3-12) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (I3-1)~(I3-11) 중 어느 하나의 키트.

[0629] (I3-13) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (I3-1)~(I3-12) 중 어느 하나의 키트.

[0630] (I3-14) 상기 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제가, 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (I3-1)~(I3-13) 중 어느 하나의 키트.

[0631] (J-1) 암의 치료에 있어서의 사용을 위한 다중 특이성 항원 결합 분자로서,

[0632] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0633] (J-2) (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (J-1)의 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0634] (J-3) 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제와 조합하여 암의 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는, (J-1) 또는 (J-2) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0635] (J-4) 암의 치료에 있어서의 사용을 위한, 다중 특이성 항원 결합 분자와, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제의 조합으로서, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[0636] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii)

클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 조합.

[0637] (J-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자는, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (J-4)의 조합.

[0638] (J-6) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와, 상기 적어도 하나의 제가, 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (J-3)~(J-5) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0639] (J-7) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (J-6)의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0640] (J-8) 상기 적어도 하나의 제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (J-3)~(J-7) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0641] (J-9) 상기 적어도 하나의 제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (J-3)~(J-8) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0642] (J-10) 상기 적어도 하나의 제가, 암 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (J-3)~(J-9) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0643] (J-11) 상기 적어도 하나의 제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제인, (J-3)~(J-10) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0644] (J-12) 상기 적어도 하나의 제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (J-8)~(J-11) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0645] (J-13) 상기 적어도 하나의 제가, 백금 제제인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0646] (J-14) 상기 적어도 하나의 제가, 알칼로이드인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0647] (J-15) 상기 적어도 하나의 제가, 토포아이소메라제 저해제인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0648] (J-16) 상기 적어도 하나의 제가, 대사 길항약인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0649] (J-17) 상기 적어도 하나의 제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0650] (J-18) 상기 적어도 하나의 제가, 이리노테칸인, (J-8)~(J-12) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0651] (J-19) 상기 적어도 하나의 제가, 겜시타빈인, (J-8)~(J-12)의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0652] (J-20) 상기 적어도 하나의 제가, 항PD-L1 항체인, (J-8)의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0653] (J-21) 상기 적어도 하나의 제가, 올라파리브인, (J-8)의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0654] (J-22) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (J-1)~(J-21) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0655] (J-23) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (J-1)~(J-22) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0656] (J-24) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (J-1)~(J-23) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0657] (J-25) 상기 암이, 복막 파종된 암인, (J-1)~(J-24) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0658] (J-26) 면역 체크포인트 저해제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (J-1)~(J-25) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0659] (J-27) 상기 암이, 상기 다른 항암제, 혹은, 상기 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (J-1)~(J-26) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0660] (J-28) 상기 암이, 상기 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (J-1)~(J-27) 중 어느 하나의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 조합.

[0661] (K-1) 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 이하의 다중 특이성 항원 결합의 사용: (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0662] (K-2) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (K-1)의 사용.

[0663] (K-3) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제와 조합하여 사용되는 것을 특징으로 하는, (K-1) 또는 (K-2) 중 어느 하나의 사용.

[0664] (K-4) 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자와, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제의 조합의 사용:

[0665] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자.

[0666] (K-5) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, (A-2)~(A-39) 중 어느 하나에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자인, (K-4)의 사용.

[0667] (K-6) 상기 의약이 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 제의 배합제인 것을 특징으로 하는, (K-4) 또는 (K-5)의 사용.

[0668] (K-7) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와, 상기 적어도 하나의 제가 따로따로, 또는 연속하여 투여되는 것을 특징으로 하는, (K-3)~(K-5) 중 어느 하나의 사용.

[0669] (K-8) 상기 다중 특이성 항원 결합 분자가, 상기 적어도 하나의 제의 전에, 동시에, 및/또는 후에 투여되는 것을 특징으로 하는, (K-7)의 사용.

[0670] (K-9) 상기 적어도 하나의 제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, 및 PARP 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, (K-3)~(K-8) 중 어느 하나의 사용.

[0671] (K-10) 상기 적어도 하나의 제가, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제인, (K-3)~(K-9) 중 어느 하나의 사용.

[0672] (K-11) 상기 적어도 하나의 제가, 암 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제인, (K-3)~(K-10) 중 어느 하나의 사용.

[0673] (K-12) 상기 적어도 하나의 제가, 암 세포의 TGFβ1의 발현 유도의 발현을 유도하는 제인, (K-3)~(K-11) 중 어느 하나의 사용.

[0674] (K-13) 상기 적어도 하나의 제가, 백금 제제, 알칼로이드, 또는 대사 길항약인, (K-9)~(K-12) 중 어느 하나의 사용.

[0675] (K-14) 상기 적어도 하나의 제가, 백금 제제인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0676] (K-15) 상기 적어도 하나의 제가, 알칼로이드인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0677] (K-16) 상기 적어도 하나의 제가, 토포아이소메라제 저해제인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0678] (K-17) 상기 적어도 하나의 제가, 대사 길항약인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0679] (K-18) 상기 적어도 하나의 다른 제가, 카보플라틴 또는 시스플라틴인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0680] (K-19) 상기 적어도 하나의 다른 제가, 이리노테칸인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0681] (K-20) 상기 적어도 하나의 다른 제가, 겜시타빈인, (K-9)~(K-13) 중 어느 하나의 사용.

[0682] (K-21) 상기 적어도 하나의 다른 제가, 항PD-L1 항체인, (K-9)의 사용.

[0683] (K-22) 상기 적어도 하나의 다른 제가, 올라파리브인, (K-9)의 사용.

[0684] (K-23) 상기 암이, CLDN6 양성의 암인, (K-1)~(K-22) 중 어느 하나의 사용.

[0685] (K-24) 상기 암이, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 암인, (K-1)~(K-23) 중 어느 하나의 사용.

[0686] (K-25) 상기 암이, 복막으로 전이된 암인, (K-1)~(K-24) 중 어느 하나의 사용.

[0687] (K-26) 상기 암이, 복막 파종된 암인, (K-1)~(K-25) 중 어느 하나의 사용.

[0688] (K-27) 면역 체크포인트 저해제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위한, (K-1)~(K-26) 중 어느 하나의 사용.

[0689] (K-28) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제, 혹은, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와는 상이한 항암제에 의한 치료 경험이 있는 암인, (K-1)~(K-27) 중 어느 하나의 사용.

[0690] (K-29) 상기 암이, 상기 적어도 하나의 다른 항암제 단독 투여에 의한 치료에 대해서 소망의 효과가 얻어지지 않았던 암인, (K-1)~(K-28) 중 어느 하나의 사용.

도면의 간단한 설명

[0691] [도 1] TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 기초로, 각종 암 조직에 있어서의 CLDN6의 발현을 비교한 그래프이다.

[도 2] CD137 상의 H0868L0581 Fab 접촉 영역의 에피토프를 나타낸다. CD137 아미노산 서열에 있어서의 에피토프 매핑(흑색: H0868L0581로부터 3.0옹스트롬보다도 가깝다, 빗금: 4.5옹스트롬보다도 가깝다).

[도 3] CD137 상의 H0868L0581 Fab 접촉 영역의 에피토프를 나타낸다. 결정 구조에 있어서의 에피토프 매핑(암회색의 구: H0868L0581로부터 3.0옹스트롬보다도 가깝다, 박회색의 봉: 4.5옹스트롬보다도 가깝다).

[도 4] 다양한 항체 포맷을 도시한다. 표 4의 각 Fv 영역의 어노테이션, 및 표 4, 표 5, 및 표 6의 명명 규칙. (a) FAST-Ig를 이용하는 것에 의한 1+1 이중 특이성 항체; (b) CrossMab 테크놀로지를 이용하는 것에 의한 1+1 이중 특이성 항체를 도시하는 도면.

[도 5] 인간 CLDN 패밀리 단백질(CLDN3, CLDN4, CLDN6, 및 CLDN9)에 대한 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체(CS2961 및 6PHU3/TR01)의 결합 활성을 나타낸다. BaF3 트랜스펙턴트(hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF, 및 hCLDN9/BaF)에 대한 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체의 결합 활성을 15μg/ml의 농도로 플로 사이토미터에 의해 조사하고 막대 그래프로서 플롯했다. KLH/TR01을 음성 대조로서 이용했다.

[도 6] LDH 어세이에 의한 T 세포 의존성 세포 상해의 평가를 나타낸다.

[도 7] 인간 CLDN9와 인간 CLDN6의 아미노산 서열 얼라인먼트를 나타낸다. 인간 CLDN9 및 인간 CLDN6은, N말단 잔기(29위의 Met/Leu)를 제외하고, 세포외 도메인 1에 있어서 거의 동일한 서열을 포함한다. 세포외 도메인 2에 있어서, 2개의 아미노산이, 인간 CLDN9와 인간 CLDN6에서 상이하다(145위의 Arg/Leu 및 156위의 Glu/Leu).

[도 8] LDH 어세이에 의한, 여러 가지 암 세포주(NUGC-3, PA-1, SNG-M, NEC8, NEC14, CHLA-02-ATRT, HT-1197, 및 OUMS-23)에 대한 항체(PPU4135)의 T 세포 의존성 세포 상해의 평가 결과를 나타낸다.

[도 9] xCELLigence 어세이에 의한, 여러 가지 암 세포주에 대한 항체(CS3348, PPU4135, 및 PPU4136)의 리얼타임 세포 증식 저해 어세이의 결과를 나타낸다.

[도 10] CLDN6 발현 인간 세포주(OVCAR3 및 NCI-H1435) 및 CLDN6 음성 세포주(5637)와의 공배양하에서의, 항체(CS3348, PPU4135, PPU4136, PPU4137, 및 PPU4138)에 의한 CD3 결합을 통한 T 세포의 활성화를 나타낸다. 음성 대조로서 KLH/TR01을 이용했다.

[도 11] CLDN6 발현 인간 세포주(OVCAR3 및 NCI-H1435) 및 CLDN6 음성 세포주(5637)와의 공배양하에서의, 항체(CS3348, PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137, 및 PPU4138)에 의한 CD137 결합을 통한 NFκB의 활성화를 나타낸다. 음성 대조로서 KLH/TR01을 이용했다.

[도 12] NCI-H1435/HuNOG 마우스 모델을 이용한, 1mg/kg의 용량에서의 항체(CS3348, PPU4134, PPU4135,

PPU4136, PPU4137, 및 PPU4138)의 in vivo 항종양 효과를 나타낸다.

[도 13] OV-90/HuNOG 마우스 모델을 이용한, 0.05mg/kg 및 0.2mg/kg의 용량에서의 항체(CS3348 및 PPU4135)의 in vivo 항종양 효과를 나타낸다.

[도 14] CS3348 또는 PPU4135의 투여에 의해 매개되는 AST, ALT, GLDH(간 효소), ALP, TBIL, GGT, TBA(간담도 장애 파라미터), 및 CRP(염증 마커) 레벨의 변화를 나타낸다.

[도 15] 마우스 복막 파종 모델에 있어서의, 항CLDN6/Dual-Fab 항체 투여 후의 생존율을 나타낸 도면이다.

[도 16] 각종 암 세포(인간 난소암 세포주(NIH-OVCAR3), 인간 폐암 세포주(NCI-H1435), 및 인간 자궁체암 세포주(SNG-M))를 화학요법제(시스플라틴(CDDP) 또는 카보플라틴(CBDCA))로 처리한 후의 CLDN6 발현량의 변화를 나타내는 도면이다.

[도 17] 화학요법제(시스플라틴(CDDP) 또는 카보플라틴(CBDCA))로 처리한 후의, CS4135 항체의 CD3 결합을 통한 T 세포 활성화능의 변화를, GloResponse NFAT-luc2 Jurkat 세포를 이용한 루시페라제 어세이 시스템을 이용하여 평가한 도면이다.

[도 18] SNG-M 종양 이식 마우스에 있어서의, 카보플라틴 투여 후의 CLDN6의 상대 발현량을, GAPDH를 내부 컨트롤로 하여, 리얼타임 PCR에 의해 조사한 도면이다.

[도 19] 인간 자궁체암 세포주 SNG-M과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여, 카보플라틴 단제 투여, 및 CS4135 항체와 카보플라틴의 병용 투여에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 20] 난소암 세포주 OVCAR3과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여, 카보플라틴 단제 투여, 및 CS4135 항체와 카보플라틴의 병용 투여(동시)에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 21] 난소암 세포주 OVCAR3과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여, 카보플라틴 단제 투여, 카보플라틴 투여 후의 CS4135 항체의 연속적 투여에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 22] 난소암 세포주 OVCAR3과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여, 이리노테칸 염산염 단제 투여, CS4135 항체와 이리노테칸 염산염의 병용 투여에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 23] 클로딘 6(CLDN6)을 강제 발현시킨 폐암 세포주 LLC1을 이식한 hCD137 KI/hCD3Tg 마우스에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 24] 클로딘 6(CLDN6)을 강제 발현시킨 폐암 세포주 LLC1을 이식한 hCD137 KI/hCD3Tg 마우스에 CS4135 항체를 투여하여, 종양 조직 중의 CD8 양성 T 세포수를 플로 사이토메트리(FCM)에 의해 해석한 결과를 나타내는 도면이다.

[도 25] 클로딘 6(CLDN6)을 강제 발현시킨 폐암 세포주 LLC1을 이식한 hCD137 KI/hCD3Tg 마우스에 있어서의, CS4135 항체 단제 투여, 항마우스 PD-L1 항체 단제 투여, 및 CS4135 항체와 항마우스 PD-L1 항체의 병용 투여에 의한 종양 체적의 변화를 나타낸 도면이다.

[도 26] 인간 CLDN6을 발현하는 BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289 또는 BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90(ATCC)에 있어서의, PARP 저해제(올라파리브(Olaparib))로 처리한 후의 CLDN6 발현량의 변화를 FACS 해석에 의해 조사한 도면이다.

[도 27] PARP 저해제(올라파리브(Olaparib))를 첨가한 인간 CLDN6을 발현하는 BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289 또는 BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90에 있어서의, CS4135 항체에 의한 세포 상해 활성을, 인간 PBMC를 이펙터 세포로서 이용하는 락트산 데하이드로제나제(LDH) 방출 어세이에 의해 평가한 도면이다.

[도 28] CS4135 항체에 의한 세포 상해 활성을, KLH/CD137 이중 특이성 항체의 존재하 또는 비존재하에 있어서, 리얼타임 세포 증식 저해 어세이(xCELLigence 어세이)를 이용하여 해석한 도면이다. 표적 세포로서, 인간 CLDN6을 발현하는 마우스 결장암 세포주 MC38/CLDN6을, 이펙터 세포로서 hCD3 트랜스제닉 마우스 또는 hCD3/hCD137 노크인 마우스 유래의 T 세포를 이용했다.

[도 29] 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3)를, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 또는 겜시타빈으로 처리하고, CLDN6 발현량을 정량 PCR로 측정하여, 무처리 세포와 비교한 도면이다.

[도 30] 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3)를 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 또는 겜시타빈으로 처리하고, TGFβ1 발현량을 정량 PCR로 측정하여, 무처리 세포와 비교한 도면이다.

[도 31] 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3)를 TGFβ1로 자극하고, CLDN6 발현량을 정량 PCR로 측정하여, 무자극 세포와 비교한 도면이다.

[도 32] 각종 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3, COV362, COV413A, COV413B)를 TGFβ1로 자극하고, CLDN6 발현량을 FACS로 해석하여, 무자극 세포와 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0692] 본 명세서에 있어서 기재 또는 참조되는 기법 및 수순은, 대체로 충분히 이해되고 있고, 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, 및 Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)에 기재되는 널리 이용되고 있는 방법론 등의 종래의 방법론을 사용하여 당업자에 의해 일반적으로 이용되는 것이다.

[0693] 이하의 정의 및 상세한 설명은, 본 명세서에 있어서 설명하는 본 개시의 이해를 용이하게 하기 위해서 제공된다.

[0694] 정의

[0695] 아미노산

[0696] 본 명세서에 있어서, 아미노산은, 1문자 코드 혹은 3문자 코드 또는 그 양쪽, 예를 들어, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, 또는 Val/V에 의해 기재된다.

[0697] 아미노산의 개변

[0698] 항원 결합 분자의 아미노산 서열 중의 아미노산 개변(본 명세서에 있어서 「아미노산 치환」 또는 「아미노산 변이」라고도 기재된다)을 위해서는, 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) 및 중복 신장 PCR 등의 공지된 방법이 적절히 채용될 수 있다. 더욱이, 비천연 아미노산에 치환하기 위한 아미노산 개변 방법으로서, 몇몇 공지된 방법도 또한 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249; 및 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357). 예를 들어, 종지 코돈의 하나인 UAG 코돈(앰버 코돈)의 상보적 앰버 서프레서 tRNA에 비천연 아미노산이 결합한 tRNA를 포함하는 무세포 번역계(Clover Direct (Protein Express))를 이용하는 것이 적절하다.

[0699] 본 명세서에 있어서, 아미노산 개변의 부위를 기재할 때의 용어 「및/또는」의 의미는, 「및」과 「또는」이 적절히 조합된 모든 조합을 포함한다. 구체적으로는, 예를 들어, 「33위, 55위, 및/또는 96위의 아미노산이 치환되는」은, 아미노산 개변의 이하의 배리에이션을 포함한다: (a) 33위, (b) 55위, (c) 96위, (d) 33위 및 55위, (e) 33위 및 96위, (f) 55위 및 96위, 및 (g) 33위, 55위, 및 96위의 아미노산.

[0700] 더욱이, 본 명세서에 있어서, 아미노산의 개변을 나타내는 표현으로서, 특정의 위치를 나타내는 숫자의 앞 및 뒤에, 각각 개변 전 및 개변 후의 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드를 나타내는 표현이, 적절히 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 가변 영역 중에 포함되는 아미노산을 치환할 때에 이용되는 N100bL 또는 Asn100bLeu라고 하는 개변은, 100b위(Kabat 넘버링에 따름)에 있어서의 Asn의, Leu에 의한 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 Kabat 넘버링에 의한 아미노산의 위치를 나타내고, 숫자 앞에 기재되는 1문자 또는 3문자의 아미노산 코드는 치환 전의 아미노산을 나타내고, 숫자 뒤에 기재되는 1문자 또는 3문자의 아미노산 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다. 마찬가지로, 항체 정상 영역 중에 포함되는 Fc 영역의 아미노산을 치환할 때에 이용되는 P238D 또는 Pro238Asp라고 하는 개변은, 238위(EU 넘버링에 따름)에 있어서의 Pro의, Asp에 의한 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 EU 넘버링에 의한 아미노산의 위치를 나타내고, 숫자 앞에 기재되는 1문자 또는 3문자의 아미노산 코드는 치환 전의 아미노산을 나타내고, 숫자 뒤에 기재되는 1문자 또는 3문자의 아미노산 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다.

[0701] 폴리펩티드

[0702] 본 명세서에서 이용되는 용어 「폴리펩티드」는, 아마이드 결합(펩티드 결합으로서도 알려짐)에 의해 직쇄상으로 연결된 단량체(아미노산)로 구성되는 분자를 가리킨다. 용어 「폴리펩티드」는, 2아미노산 이상의 임의의 쇄를 가리키고, 특정 길이의 산물을 가리키는 것은 아니다. 따라서, 펩티드, 다이펩티드, 트라이펩티드, 올리고펩티드, 「단백질」, 「아미노산쇄」, 또는 2아미노산 이상의 쇄를 가리키기 위해서 이용되는 임의의 다른 용어는, 「폴리펩티드」의 정의 내에 포함되고, 용어 「폴리펩티드」는, 이들 용어 중 어느 하나 대신에 또는 서로 교환 가능하게 이용되어도 된다. 용어 「폴리펩티드」는 또한, 한정되지 않지만, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호기/블로킹기에 의한 유도체화, 단백질 절단, 또는 비천연 아미노산에 의한 수식을 포함하는, 폴리펩티드의 발현 후 수식의 산물을 가리키는 것도 의도한다. 폴리펩티드는, 천연의 생물학적 공급원에서 유래해도 되고, 또는 재조합 기술에 의해 산생되어도 되지만, 반드시 지정된 핵산으로부터 번역될 필요는 없다. 그것은, 화학 합성을 포함하는, 임의의 방법으로 생성되어도 된다. 본 명세서에 있어서 기재되는 폴리펩티드는, 약 3아미노산 이상, 5아미노산 이상, 10아미노산 이상, 20아미노산 이상, 25아미노산 이상, 50아미노산 이상, 75아미노산 이상, 100아미노산 이상, 200아미노산 이상, 500아미노산 이상, 1,000아미노산 이상, 또는 2,000아미노산 이상의 사이즈의 것이어도 된다. 폴리펩티드는 규정된 삼차원 구조를 가질 수 있지만, 그들은 반드시 그와 같은 구조를 가질 필요는 없다. 규정된 삼차원 구조를 갖는 폴리펩티드는, 절첩(fold)되었다고 칭해지고, 규정된 삼차원 구조를 가지지 않지만 다수의 상이한 입체 구조를 취할 수 있는 폴리펩티드는, 절첩되어 있지 않다고 칭해진다.

[0703] 퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성

[0704] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 「퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성」은, 최대의 퍼센트 서열 동일성을 얻도록 서열을 정렬시키고 또한 필요하면 갭을 도입한 후의, 또한, 어떠한 보존적 치환도 서열 동일성의 일부라고 생각하지 않는다고 했을 때의, 참조 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의, 백분율비로서 정의된다. %아미노산 서열 동일성을 결정할 목적의 얼라인먼트는, 당해 기술 분야에 있어서의 기술의 범위 내에 있는 여러 가지 방법, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어 등의, 공적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것에 의해 달성할 수 있다. 당업자는, 비교되는 서열의 전장에 걸쳐서 최대의 얼라인먼트를 달성하기 위해서 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열의 얼라인먼트를 취하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그렇지만, 본 명세서에 있어서의 목적을 위해서, %아미노산 서열 동일성치는, 서열 비교 컴퓨터 프로그램인 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은, 제넨테크사의 저작이며, 그 원시 코드는 미국 저작권청(U.S. Copyright Office, Wasington D.C., 20559)에 사용자용 서류와 함께 제출되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로서 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은, 제넨테크사(Genentech, Inc., South San Francisco, California)로부터 공적으로 입수 가능하고, 원시 코드로부터 컴파일해도 된다. ALIGN-2 프로그램은, Digital UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX operating system 상에서의 사용을 위해서 컴파일된다. 모든 서열 비교 파라미터는, ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변동되지 않는다. 아미노산 서열 비교에 ALIGN-2가 이용되는 상황에서는, 소여의 아미노산 서열 A의, 소여의 아미노산 서열 B로의, 또는 그것과의, 또는 그에 대한 %아미노산 서열 동일성(혹은, 소여의 아미노산 서열 B로

의, 또는 그것과의, 또는 그에 대한, 어느 %아미노산 서열 동일성을 갖거나 또는 포함하는 소여의 아미노산 서열 A라고 할 수도 있다)은, 다음과 같이 계산된다: 분율 X/Y의 100배. 여기에서, X는 서열 얼라인먼트 프로그램 ALIGN-2에 의해, 당해 프로그램의 A 및 B의 얼라인먼트에 있어서 동일한 일치로서 스코어링된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B 중의 아미노산 잔기의 전수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A의 B로의 %아미노산 서열 동일성은, B의 A로의 %아미노산 서열 동일성과 동일하지 않은 것이, 이해될 것이다. 각별히 특별히 명시하지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 모든 %아미노산 서열 동일성치는, 직전의 단락에서 기술한 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 얻어지는 것이다.

[0705] 재조합의 방법 및 구성

[0706] 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호에 기재되는 바와 같이, 항체 및 항원 결합 분자는 재조합의 방법이나 구성을 이용하여 제조할 수 있다. 하나의 태양에 있어서, 본 명세서에 기재의 항체를 코딩하는, 단리된 핵산이 제공된다. 그와 같은 핵산은, 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩해도 된다. 추가적인 태양에 있어서, 이와 같은 핵산을 포함하는 1개 또는 복수의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가적인 태양에 있어서, 이와 같은 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이와 같은 태양의 하나에서는, 숙주 세포는, (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는, (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 벡터와 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 2 벡터를 포함한다(예를 들어, 형질 전환되어 있다). 하나의 태양에 있어서, 숙주 세포는, 진핵성이다(예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포) 또는 림프계의 세포(예를 들어, Y0, NS0, Sp2/0 세포)). 하나의 태양에 있어서, 항체의 발현에 호적한 조건하에서, 전술한 바와 같이 당해 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것, 및 임의로, 당해 항체를 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 것을 포함하는, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자를 제작하는 방법이 제공된다.

[0707] 본 명세서에 있어서 기재되는 항체의 재조합 제조를 위해서, (예를 들어, 전술한 것 등의) 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가적인 클로닝 및/또는 숙주 세포 중에서의 발현을 위해서, 1개 또는 복수의 벡터에 삽입한다. 그와 같은 핵산은, 종래의 수순을 이용하여 용이하게 단리 및 서열 결정될 것이다(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써).

[0708] 항체를 코딩하는 벡터의 클로닝 또는 발현에 호적한 숙주 세포는, 본 명세서에 기재된 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하게 되지 않는 경우는, 세균으로 제조해도 된다. 세균에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 관해서, 예를 들어, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호, 및 제5,840,523호를 참조할 것. (더하여, 대장균(E. coli)에 있어서의 항체 단편의 발현에 대해 기재한 Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254도 참조할 것.) 발현 후, 항체는 세균 세포 페이스트로부터 가용성 프랙션 중에 단리 되어도 되고, 또한 추가로 정제할 수 있다.

[0709] 원핵생물에 더하여, 부분적인 또는 완전한 인간의 글리코실화 패턴을 수반하는 항체의 산생을 가져오는, 글리코실화 경로가 「인간화」되어 있는 균류 및 효모의 주를 포함하는, 사상균 또는 효모 등의 진핵성의 미생물은, 항체 코드 벡터의 호적한 클로닝 또는 발현 숙주이다. Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)를 참조할 것.

[0710] 다세포 생물(무척추 생물 및 척추 생물)에서 유래하는 것도 또한, 글리코실화된 항체의 발현을 위해서 호적한 숙주 세포이다. 무척추 생물 세포의 예는, 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 곤충 세포와의 접합, 특히 Spodoptera frugiperda 세포의 형질 전환에 이용되는, 수많은 바큘로바이러스주가 동정되어 있다.

[0711] 식물 세포 배양물도, 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호, 및 제6,417,429호(트랜스제닉 식물로 항체를 산생하기 위한, PLANTIBODIES(상표) 기술을 기재)를 참조할 것.

[0712] 척추 동물 세포도 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 부유 상태에서 증식하도록 적응된 포유동물 세포주는, 유용할 것이다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는, SV40으로 형질 전환된 원숭이 신장 CV1주(COS-7); 인간 태아성 신주(Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977) 등에 기재된 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) 등에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카녹색원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁 경부암 세포(HELA); 개 신

장 세포(MDCK); Buffalo계 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유방암(MMT 060562); TRI 세포(예를 들어, Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)에 기재); MRC5 세포; 및, FS4 세포 등이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는, DHFR- CHO 세포(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))를 포함하는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 Y0, NS0, 및 Sp2/0 등의 골수종 세포주를 포함한다. 항체 산생에 호적한 특정의 포유동물 숙주 세포주의 총설로서, 예를 들어, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)을 참조할 것.

[0713] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자의 재조합 산생은, 항원 결합 분자 전체 또는 항원 결합 분자의 일부를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 1개 또는 복수의 벡터를 포함하는(예를 들어, 그에 의해 형질 전환되어 있는) 숙주 세포를 이용하는 것에 의해, 상기에 기재된 것과 마찬가지의 방법으로 행할 수 있다.

[0714] 항원 결합 분자 및 다중 특이성 항원 결합 분자

[0715] 본 명세서에서 이용되는 용어 「항원 결합 분자」는, 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 분자, 또는 항원에 대한 결합 활성을 갖는 임의의 분자를 가리키고, 약 5아미노산 이상의 길이를 갖는 펩티드 또는 단백질 등의 분자를 추가로 가리킬 수 있다. 펩티드 및 단백질은, 생물에서 유래하는 것으로 한정되지 않고, 예를 들어, 그들은, 인공적으로 설계된 서열로부터 산생된 폴리펩티드여도 된다. 그들은, 천연 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드, 재조합 폴리펩티드 등의 어느 것이어도 된다. 스캐폴드로서 α/β 배럴 등의 공지된 안정된 입체 구조를 포함하고, 분자의 일부가 항원 결합 부위가 되는, 스캐폴드 분자도 또한, 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자의 일 태양이다.

[0716] 「다중 특이성 항원 결합 분자」는, 2개 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 가리킨다. 「다중 특이성 항원 결합 분자」는, 2개 이상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 항체 단편을 포함한다. 용어 「이중 특이성」은, 항원 결합 분자가, 적어도 2종류의 상이한 항원 결정기에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 용어 「삼중 특이성」은, 항원 결합 분자가 적어도 3종류의 상이한 항원 결정기에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다.

[0717] 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자는, 삼중 특이성 항원 결합 분자, 즉, 3종류의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있고, 즉, CD3 및 CD137에 결합할 수 있지만, 양쪽의 항원에 동시에는 결합하지 않고, 또한 CLDN6에 특이적으로 결합할 수 있는, 삼중 특이성 항원 결합 분자이다.

[0718] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0719] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0720] (ii) 클로딘 6(CLDN6), 바람직하게는 인간 CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0721] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제를 제공한다.

[0722] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0723] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0724] (ii) 클로딘 6(CLDN6), 바람직하게는 인간 CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0725] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 다른 항암제와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

[0726] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0727] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0728] (ii) 클로딘 6(CLDN6), 바람직하게는 인간 CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0729] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 TGFβ 유도제와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

[0730] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0731] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0732] (ii) 클로딘 6(CLDN6), 바람직하게는 인간 CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0733] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

[0734] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하고, 또한 상기 제 1 항원 결합 부분이 CD3에만 결합할 수 있는 항원 결합 부분인 경우와 비교하여 세포 상해 활성이 높은, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0735] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제를 제공한다.

[0736] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하고, 또한 상기 제 1 항원 결합 부분이 CD3에만 결합할 수 있는 항원 결합 부분인 경우와 비교하여 독성이 낮은, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0737] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제를 제공한다.

[0738] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0739] (1) T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 제 1 항원 결합 부분, 및 (2) CLDN6에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 서열 번호: 194의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 192의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 항원 결합 부분 및 서열 번호: 193의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 195의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 CLDN6에 결합할 수 있는 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항체(CS3348)와 비교하여, T 세포 상해 활성이 동등 또는 그 이상인, 다중 특이성 항원 결합 분자

[0740] 를 유효 성분으로서 포함하는, 항암제를 제공한다.

[0741] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 적어도 하나의 다른 항암제를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물로서, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하기 위한 의약 조성물을 제공한다.

[0742] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0743] 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0744] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자

[0745] 를 제공한다.

[0746] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0747] 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 TGFβ를 유도하는 치료법을 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0748] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자

[0749] 를 제공한다.

[0750] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0751] 이하의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및, 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 조합하여 이루어지는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약 조성물:

[0752] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii)

클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자

[0753] 를 제공한다.

[0754] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 다른 항암제의 조합을 제공한다.

[0755] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 조합을 제공한다.

[0756] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 조합을 제공한다.

[0757] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 유효량의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0758] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0759] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 다른 항암제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법을 제공한다.

[0760] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 투여하는 것을 포함하는, 적어도 하나의 다른 항암제에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법을 제공한다.

[0761] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 유효량의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0762] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0763] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법을 제공한다.

[0764] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 유효량의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0765] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하여, 개체에 있어서의, 세포 상해를 유도하는, 세포 증식을 억제하는, 세포 증식을 저해하는, 면역 응답을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0766] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 개체에게, 유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 포함하는, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한, 개체에 있어서의, 세포 상해 유도, 세포 증식 억제, 세포 증식 저해, 면역 응답 활성화, 암의 치료, 또는 암의 예방의 효과를 증강시키는 방법을 제공한다.

[0767] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암 세포를, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 적어도 하나의 다른 항암제와 접속시키는 것에 의해, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 상해를 야기시키는 방법, 또는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.

[0768] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암 세포를, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 적어도 하나의 다른 항암제와 접속시키는 것에 의해, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제가, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 상해를 야기시키는지, 또는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직의 증식을 억제하는지를 확인하는 방법을 제공한다.

[0769] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0770] (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0771] (B) 용기, 및

[0772] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 1종의 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0773] 을 포함하는 키트를 제공한다.

[0774] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0775] (A) 적어도 하나의 다른 항암제,

[0776] (B) 용기, 및

[0777] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0778] 을 포함하는 키트를 제공한다.

[0779] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0780] (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는

의약 조성물,

[0781] (B) 용기, 및

[0782] (C) 적어도 하나의 다른 항암제

[0783] 를 포함하는 키트를 제공한다.

[0784] 또 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0785] (A) 적어도 하나의 TGFβ 유도제,

[0786] (B) 용기, 및

[0787] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0788] 을 포함하는 키트를 제공한다.

[0789] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0790] (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0791] (B) 용기, 및

[0792] (C) 적어도 하나의 TGFβ 유도제

[0793] 를 포함하는 키트를 제공한다.

[0794] 또 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0795] (A) 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제,

[0796] (B) 용기, 및

[0797] (C) 개체에 있어서의 암을 치료 또는 예방하기 위해서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제와, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨

[0798] 을 포함하는 키트를 제공한다.

[0799] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는,

[0800] (A) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물,

[0801] (B) 용기, 및

[0802] (C) 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제

[0803] 를 포함하는 키트를 제공한다.

[0804] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암의 치료에 있어서의 사용을 위한,

[0805] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 제공한다.

[0806] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암의 치료에 있어서의 사용을 위한, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활

성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자와, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 제의 조합을 제공한다.

[0807] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자의 사용을 제공한다.

[0808] 또한, 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분, 및 (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 대한 결합 활성을 갖는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 제의 조합의 사용을 제공한다.

[0809] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[0810] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcɣ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[0811] 을 추가로 포함해도 된다.

[0812] 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 구성 성분은, 여러 가지 구성에 있어서 서로 융합시킬 수 있다. 예시적인 구성을 도 4에 도시한다. 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, 안정되게 회합할 수 있는 제 1 Fc 영역 서브유닛 및 제 2 Fc 영역 서브유닛으로 구성되는 Fc 도메인을 포함한다.

[0813] 상기 태양 중 어느 하나에 의하면, 다중 특이성 항원 결합 분자의 구성 성분(예를 들어, 항원 결합 부분, Fc 도메인)은, 직접적으로, 또는 여러 가지 링커, 특히, 본 명세서에 있어서 기재되어 있거나 또는 당 기술 분야에 있어서 공지된 1개 혹은 복수의 아미노산, 전형적으로는 약 2~20개의 아미노산을 포함하는 펩티드 링커를 통해서, 융합시켜도 된다. 적절한 비면역원성 펩티드 링커에는, 예를 들어, (G4S)n, (SG4)n, (G4S)n, 또는 G4(SG4)n 펩티드 링커가 포함되고, 여기에서, n은 대체로 1~10, 전형적으로는 2~4의 수이다.

[0814] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[0815] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0816] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0817] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자로서,

[0818] 제 1 항원 결합 부분의 제 1 항체 가변 영역이 제 1 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 1 항원 결합 부분의 제 2 항체 가변 영역이 제 1 경쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 3 항체 가변 영역이 제 2 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 4 항체 가변 영역이 제 2 경쇄 정상 영역에 융합되어 있는, 다중 특이성 항원 결합 분자일 수 있다.

[0819] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[0820] (i) CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 제 1 항원 결합 부분; 및

[0821] (ii) 클로딘 6(CLDN6)에 결합할 수 있는 제 2 항원 결합 부분

[0822] 을 포함하는, 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 제 1 항원 결합 부분의 제 1 항체 가변 영역이 제 1 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 1 항원 결합 부분의 제 2 항체 가변 영역이 제 1 경쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 3 항체 가변 영역이 제 2 중쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 제 2 항원 결합 부분의 제 4 항체 가변 영역이 제 2 경쇄 정상 영역에 융합되어 있고, 해당 정상 영역이, 이하의 (g1)~(g7):

[0823] (g1) 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0824] (g2) 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 81의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0825] (g3) 서열 번호: 79의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 80의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0826] (g4) 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 82의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0827] (g5) 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0828] (g6) 서열 번호: 77의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역;

[0829] (g7) 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 중쇄 정상 영역, 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 경쇄 정상 영역, 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 중쇄 정상 영역, 및 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 경쇄 정상 영역

[0830] 중 어느 하나인, 다중 특이성 항원 결합 분자일 수 있다.

[0831] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 4개의 폴리펩티드쇄를 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 4개의 폴리펩티드쇄가, 이하의 (h01)~(h18):

[0832] (h01) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0833] (h02) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0834] (h03) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0835] (h04) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0836] (h05) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0837] (h06) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0838] (h07) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0839] (h08) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경

쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0840] (h09) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0841] (h10) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0842] (h11) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0843] (h12) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0844] (h13) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0845] (h14) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0846] (h15) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0847] (h16) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0848] (h17) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0849] (h18) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2), 및 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4)

[0850] 중 어느 하나인, 다중 특이성 항원 결합 분자일 수 있다.

[0851] 파이로글루타밀화

[0852] 항체가 세포에 있어서 발현되었을 경우, 항체는 번역 후에 수식됨이 알려져 있다. 번역 후 수식의 예로서는, 중쇄의 C말단에 있는 리신의, 카복시펩티다제에 의한 절단; 중쇄 및 경쇄의 N말단에 있는 글루타민 또는 글루타민산의, 파이로글루타밀화에 의한 파이로글루타민산으로의 수식; 글리코실화; 산화; 탈아마이드; 및 당화를 들 수 있고, 그와 같은 번역 후 수식은 여러 가지 항체에서 생김이 공지이다(Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol. 97, p. 2426-2447).

[0853] 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자에는, 번역 후 수식을 받고 있는 다중 특이성 항체도 포함된다. 번역 후 수식을 받는 본 개시의 그 다중 특이성 항원 결합 분자의 예로서는, 중쇄 가변 영역의 N말단에서의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄의 C말단에서의 리신의 결실을 받고 있는 다중 특이성 항체를 들 수 있다. 당 분야에 있어서, N말단에서의 파이로글루타밀화 및 C말단에서의 리신의 결실에 의한 그와 같은 번역 후 수식이, 항체의 활성에 어떤 영향을 갖지 않음은 공지이다(Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0854] 항원 결합 부분

[0855] 본 명세서에서 이용되는 용어 「항원 결합 부분」은, 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 분자를 가리킨다. 하나의 태양에 있어서, 항원 결합 부분은, 그것이 결합하고 있는 실체(예를 들어, 제 2 항원 결합 부분)를, 표적 부위, 예를 들어 암 항원(CLDN6)을 발현하는 특정의 종류의 종양 세포로 방향지을 수 있다. 다른 태양에 있어서, 항원 결합 부분은, 그 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원(CD3) 또는 공자극 분자 CD137을 통해서 시그널 전달을 활성화할 수 있다. 항원 결합 부분에는, 본 명세서에 있어서 추가로 정의되는 항체 및 그 단편이 포함된다. 구체적인 항원 결합 부분으로서는, 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체의 항원 결합 도메인 또는 항체 가변 영역을 들 수 있다. 특정의 태양에 있어서, 항원 결합 부분은, 본 명세서에 있어서 추가로 정의되고 또한 당 기술 분야에 있어서 공지된 항체 정상 영역을 포함해도 된다. 유용한 중쇄 정상 영역에는, 5개의 아이소타입: α, δ, ε, γ, 또는 μ 중 어느 하나가 포함된다. 유용한 경쇄 정상 영역에는, 2개의 아이소타입: κ 및 λ 중 어느 하나가 포함된다.

[0856] 항원 결합 부분 등에 관해서, 본 명세서에서 이용되는 용어 「제 1」, 「제 2」, 「제 3」, 및 「제 4」는, 2종류 이상의 종류별의 부분 등이 존재하는 경우에 구별한다고 하는 편리성을 위해서 이용된다. 이들 용어의 사용은, 특별히 명시하지 않는 한, 다중 특이성 항원 결합 분자의 특정의 순서 또는 방향을 부여하는 것을 의도하지 않는다.

[0857] CD3 및 CD137에 결합할 수 있는 항원 결합 부분

[0858] 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3 및 CD137에 결합할 수 있는 적어도 1개의 항원 결합 부분(본 명세서에 있어서 「듀얼 항원 결합 부분」 또는 「제 1 항원 결합 부분」 또는 「Dual-Ig」 또는 「Dual-Fab」라고도 칭해진다)을 포함한다. 본 명세서에 있어서 기재되는 제 1 항원 결합 부분은, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합한다. 즉, 본 명세서에 있어서 기재되는 제 1 항원 결합 부분은, CD3에 결합한다. 또는, 본 명세서에 있어서 기재되는 제 1 항원 결합 부분은, CD137에 결합한다. 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3 및 CD137에 특이적으로 결합할 수 있지만, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 2개 이하의 항원 결합 부분을 포함한다. 하나의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 1가의 결합을 가져온다. 하나의 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, CD3에 대한 결합 활성을 갖고, CD137에 대한 결합 활성을 가지지만, 항원에 대해서 결합할 때에는, CD3 또는 CD137의 어느 한쪽에 결합한다. 하나의 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, CD3 및 CD137에 결합할 수 있지만, CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않는, 항원 결합 부분이다.

[0859] T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 항원 결합 부분

[0860] 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 적어도 1개의 항원 결합 부분(본 명세서에 있어서 「제 1 항원 결합 부분」이라고도 칭해진다)을 포함한다. 본 명세서에 있어서 기재되는 제 1 항원 결합 부분은, T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있다. T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 항원 결합 부분이란, T 세포 수용체 복합체의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 또한 상보적인 영역을 포함하여 이루어지는 항T 세포 수용체 복합체 항체의 부분을 말한다. T 세포 수용체 복합체는, T 세포 수용체 자신이어도 되고, T 세포 수용체와 함께 T 세포 수용체 복합체를 구성하는 어댑터 분자여도 된다. 어댑터로서 적합한 것은 CD3이다.

[0861] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은 대체로, Fab 분자, 특히 종래의 Fab 분자이다. 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역(VL 및 VH)을 포함하는 도메인이다. 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 그와 같은 도메인의 적절한 예로서는, 「단쇄 Fv(scFv)」, 「단쇄 항체」, 「Fv」, 「단쇄 Fv2(scFv2)」, 「Fab」, 「$F(ab')_2$」 등을 들 수 있다.

[0862] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, CD3의 부분 펩티드의 전체 또는 일부에 특이적으로 결합한다. 특정의 태양에 있어서, CD3은 인간 CD3 또는 필리핀원숭이 CD3, 특히 인간 CD3이다. 특정의 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, 인간 CD3 및 필리핀원숭이 CD3에 대해서 교차 반응성이다(즉, 그들에 특이적으로 결합한다). 몇몇 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, CD3의 ε 서브유닛, 특히, 서열 번호: 170(NP_000724.1)(괄호 내에 RefSeq 등록 번호를 나타낸다)에 나타나는 CD3의 인간 CD3ε 서브유닛에 특이적으로 결합할 수 있다. 몇몇 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, 진핵세포의 표면 상에 발현하고 있는

CD3ε 쇄에 특이적으로 결합할 수 있다. 몇몇 태양에 있어서, 제 1 항원 결합 부분은, T 세포의 표면 상에 발현하고 있는 CD3ε 쇄에 결합한다.

[0863] 특정의 태양에 있어서, CD137은 인간 CD137이다. 몇몇 태양에 있어서, 본 개시의 항원 결합 분자의 호적한 예에는, 이하로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체에 의해 결합되는 인간 CD137 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자가 포함된다:

[0864] SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC 서열(서열 번호: 182)을 포함하는 영역을 인식하는 항체,

[0865] DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC 서열(서열 번호: 181)을 포함하는 영역을 인식하는 항체,

[0866] LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC 서열(서열 번호: 183)을 포함하는 영역을 인식하는 항체, 및

[0867] 인간 CD137 단백질 중의 LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC 서열(서열 번호: 180)을 포함하는 영역을 인식하는 항체.

[0868] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 이하의 항체 가변 영역(a1)~(a4):

[0869] (a1) 서열 번호: 9의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 15의 CDR 2, 및 서열 번호: 21의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0870] (a2) 서열 번호: 10의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 16의 CDR 2, 및 서열 번호: 22의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 31의 CDR 1, 서열 번호: 35의 CDR 2, 및 서열 번호: 39의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0871] (a3) 서열 번호: 11의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 17의 CDR 2, 및 서열 번호: 23의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0872] (a4) 서열 번호: 12의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 18의 CDR 2, 및 서열 번호: 24의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 32의 CDR 1, 서열 번호: 36의 CDR 2, 및 서열 번호: 40의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역)

[0873] 중 어느 하나를 포함한다.

[0874] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 인간 항체 프레임워크 또는 인간화 항체 프레임워크를 포함하는 항체 가변 영역을 포함한다.

[0875] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 이하의 (c1)~(c4):

[0876] (c1) 서열 번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0877] (c2) 서열 번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0878] (c3) 서열 번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역);

[0879] (c4) 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역)

[0880] 중 어느 하나를 포함한다.

[0881] 하나의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 3에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 27에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0882] 하나의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 4에 대해서 적어도 약

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 27에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0883] 하나의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 5에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 28에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0884] 하나의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 6에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 1 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 28에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 2 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0885] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 이하의 (j01)~(j18):

[0886] (j01) 서열 번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0887] (j02) 서열 번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0888] (j03) 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0889] (j04) 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0890] (j05) 서열 번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0891] (j06) 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0892] (j07) 서열 번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0893] (j08) 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0894] (j09) 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0895] (j10) 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0896] (j11) 서열 번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0897] (j12) 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0898] (j13) 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0899] (j14) 서열 번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0900] (j15) 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0901] (j16) 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 경

쇄(쇄 4);

[0902] (j17) 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4);

[0903] (j18) 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 3) 및 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 4)

[0904] 중 어느 하나를 포함한다.

[0905] 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 항체 가변 영역을 포함한다. 특정의 태양에 있어서, 듀얼 항원 결합 부분(「제 1 항원 결합 부분」)은, 전술한 제 1 항체 가변 영역 및 제 2 항체 가변 영역을 포함한다.

[0906] 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자에는, 번역 후 수식을 받고 있는 다중 특이성 항체도 포함된다. 번역 후 수식을 받는 본 개시의 그 다중 특이성 항원 결합 분자의 예로서는, 중쇄 가변 영역의 N말단에서의 파이로글루타밀화 및/또는 중쇄의 C말단에서의 리신의 결실을 받고 있는 다중 특이성 항원 결합 분자를 들 수 있다. 당분야에 있어서, N말단에서의 파이로글루타밀화 및 C말단에서의 리신의 결실에 의한 그와 같은 번역 후 수식이, 항체의 활성에 어떤 영향을 갖지 않음은 공지이다(Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0907] CLDN6에 결합할 수 있는 항원 결합 부분

[0908] 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, CLDN6에 결합할 수 있는 적어도 1개의 항원 결합 부분을 포함한다(본 명세서에 있어서 「CLDN6 항원 결합 부분」 또는 「제 2 항원 결합 부분」이라고도 칭해진다). 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, CLDN6에 결합할 수 있는 1개의 항원 결합 부분을 포함한다.

[0909] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은 대체로, Fab 분자, 특히 종래의 Fab 분자이다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역(VL 및 VH)을 포함하는 도메인이다. 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 그와 같은 도메인의 적절한 예로서는, 「단쇄 Fv(scFv)」, 「단쇄 항체」, 「Fv」, 「단쇄 Fv2(scFv2)」, 「Fab」, 「$F(ab')_2$」 등을 들 수 있다.

[0910] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, CLDN6의 부분 펩티드의 전체 또는 일부에 특이적으로 결합한다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6은 인간 CLDN6 또는 필리핀원숭이 CLDN6 또는 마우스 CLDN6, 특히 인간 CLDN6이다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 인간 CLDN6 및 필리핀원숭이 CLDN6에 대해서 교차 반응성이다(즉, 그들에 특이적으로 결합한다).

[0911] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, CLDN6의 제 1 세포외 도메인(서열 번호: 196 또는 197의 아미노산 29~81) 또는 CLDN6의 제 2 세포외 도메인(서열 번호: 196 또는 197의 아미노산 138~159)에 특이적으로 결합한다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 진핵세포의 표면 상에 발현하고 있는 인간 CLDN6에 특이적으로 결합한다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6에 대한 결합 활성은, 암 세포의 표면 상에 발현하고 있는 CLDN6 단백질에 대한 결합 활성이다.

[0912] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 인간 CLDN9에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0913] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 인간 CLDN4에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0914] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 인간 CLDN3에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0915] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 205에 규정되는 CLDN6 변이체에 실질적으로 결합하지 않는다.

[0916] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 크로스오버 Fab 분자, 즉, Fab 중쇄 및 Fab 경쇄의 가변 영역 또는 정상 영역 중 한쪽이 교환되어 있는 Fab 분자이다.

[0917] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 이하의 항체 가변 영역(b1) 또는

(b2):

[0918] (b1) 서열 번호: 8의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 14의 CDR 2, 및 서열 번호: 20의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 30의 CDR 1, 서열 번호: 34의 CDR 2, 및 서열 번호: 38의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역);

[0919] (b2) 서열 번호: 7의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 29의 CDR 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역)

[0920] (b3) 서열 번호: 29의 상보성 결정 영역(CDR) 1, 서열 번호: 33의 CDR 2, 및 서열 번호: 37의 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 7의 CDR 1, 서열 번호: 13의 CDR 2, 및 서열 번호: 19의 CDR 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역)

[0921] 을 포함한다.

[0922] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 인간 항체 프레임워크 또는 인간화 항체 프레임워크를 포함하는 항체 가변 영역을 포함한다.

[0923] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 이하의 (d1) 또는 (d2):

[0924] (d1) 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역);

[0925] (d2) 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역)

[0926] (d3) 서열 번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역), 및 서열 번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역)

[0927] 를 포함한다.

[0928] 하나의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 2에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 26에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0929] 하나의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 1에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 25에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0930] 하나의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 서열 번호: 25에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 영역(제 3 항체 가변 영역) 서열, 및 서열 번호: 1에 대해서 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역(제 4 항체 가변 영역) 서열을 포함한다.

[0931] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 이하의 (k01)~(k09):

[0932] (k01) 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0933] (k02) 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0934] (k03) 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0935] (k04) 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0936] (k05) 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경

쇄(쇄 2);

[0937] (k06) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0938] (k07) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0939] (k08) 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2);

[0940] (k09) 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄(쇄 1) 및 서열 번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄(쇄 2)

[0941] 중 어느 하나를 포함한다.

[0942] 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 항체 가변 영역을 포함한다. 특정의 태양에 있어서, CLDN6 항원 결합 부분(「제 2 항원 결합 부분」)은, 전술한 제 3 항체 가변 영역 및 제 4 항체 가변 영역을 포함한다.

[0943] 상기의 다중 특이성 항원 결합 분자에 있어서, 중쇄 및 경쇄의 CDR1, CDR2, CDR3, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 중쇄 전장, 및 경쇄 전장의 아미노산 서열은, CD3, CD137, T 세포 수용체 복합체, 또는 CLDN6에 대한 결합 활성을 갖는 한, 해당 아미노산 서열에 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 해당 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있는 아미노산 서열을 조제하기 위한, 당업자에게 잘 알려진 방법으로서는, 단백질에 변이를 도입하는 방법이 알려져 있다. 예를 들어, 당업자이면, 부위 특이적 변이 유발법(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M.(1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492) 등을 이용하여, CD3, CD137, T 세포 수용체 복합체, 또는 CLDN6에 대한 결합 활성을 갖는 항체의 아미노산 서열에 적절히 변이를 도입하는 것에 의해, 원래의 다중 특이성 항원 결합 분자의 항체 가변 영역의 조합과 기능적으로 동등한 항체 가변 영역의 조합을 포함하는 변이체 다중 특이성 항원 결합 분자를 조제할 수 있다. 여기에서, 본 발명에 있어서 「기능적으로 동등」이란, 항원에 대한 결합 친화성이 동등한, 혹은, 다중 특이성 항원 결합 분자로서 이용되었을 경우에, 클로딘 6이 발현하고 있는 세포 또는 당해 세포를 포함하는 조직에 대한 세포 상해 활성이 동등한 것을 의미한다. 결합 친화성 및 세포 상해 활성은, 본 명세서의 기재에 기초하여 측정할 수 있지만, 상세는 후술한다.

[0944] 개변하는 아미노산의 개수에 제한은 없지만, 예를 들어, 40개 이내, 30개 이내, 20개 이내, 바람직하게는 18개 이내, 16개 이내, 15개 이내, 12개 이내, 10개 이내, 9개 이내, 8개 이내, 7개 이내, 6개 이내, 5개 이내, 4개 이내, 3개 이내, 또는 2개 이내여도 된다.

[0945] 아미노산 잔기를 개변하는 경우에는, 아미노산 측쇄의 성질이 보존되어 있는 다른 아미노산으로 변이되는 것이 바람직하다. 예를 들어 아미노산 측쇄의 성질로서는, 소수성 아미노산(A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 지방족 측쇄를 갖는 아미노산(G, A, V, L, I, P), 수산기 함유 측쇄를 갖는 아미노산(S, T, Y), 황 원자 함유 측쇄를 갖는 아미노산(C, M), 카복실산 및 아마이드 함유 측쇄를 갖는 아미노산(D, N, E, Q), 염기 함유 측쇄를 갖는 아미노산(R, K, H), 및, 방향족 함유 측쇄를 갖는 아미노산(H, F, Y, W)을 들 수 있다(괄호 내는 모두 아미노산의 1문자 표기를 나타낸다). 이들 각 그룹 내의 아미노산의 치환을 보존적 치환이라 칭한다. 어느 아미노산 서열에 대한 1 또는 복수개의 아미노산 잔기의 결실, 부가 및/또는 다른 아미노산에 의한 치환에 의해 수식된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드가 그 생물학적 활성을 유지함은 이미 알려져 있다(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984)81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science (1984) 224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982)79:6409-13).

[0946] 항원

[0947] 본 명세서에서 이용되는 용어 「항원」은, 항원 결합 부분이 결합하는 폴리펩티드 거대 분자 상의 부위(예를 들어, 연속된 일련의 아미노산, 또는 비연속 아미노산의 다른 영역으로 구성되는 입체 구조)를 가리키고, 항원 결합 부분-항원 복합체를 형성한다. 유용한 항원 결정기는, 예를 들어, 종양 세포의 표면 상에, 바이러스 감염 세포의 표면 상에, 다른 질환 세포의 표면 상에, 면역 세포의 표면 상에, 혈청 중에 유리된 상태에서, 및/또는 세포외 기질(ECM) 중에 발견할 수 있다. 특별히 나타내지 않는 한, 본 명세서에 있어서 항원이라고 칭해지는 단백질(예를 들어, CD3, CD137, CLDN6)은, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트) 등의 포유동물을 포함하는, 임의의 척추동물 공급원 유래의 단백질의 임의의 천연 형태일 수 있다. 특정의 태양에 있어서, 항원은 인간 CD3, 인간 CD137, 또는 인간 CLDN6이다. 본 명세서에 있어서 특정의 단백질에 대한 언급이 이루어지는 경우, 해당 용어는, 「전장」의, 프로세싱을 받고 있지 않은 단백질, 및 세포 중에서의 프로세싱에 의해 생기는 단백질의 임의의 형태를 포함한다. 해당 용어는 또한, 단백질의 천연에 존재하는 배리언트, 예를 들어, 스플라이스 배리언트 또는 대립 유전자 배리언트도 포함한다.

[0948] 특정의 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 다른 종의 CD3, CD137, 또는 CLDN6의 사이에서 보존되어 있는 CD3, CD137, 또는 CLDN6의 에피토프에 결합한다. 특정의 태양에 있어서, 본 출원의 다중 특이성 항원 결합 분자는, 삼중 특이성 항원 결합 분자, 즉, 3종류의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는, 즉, CD3 및 CD137에 결합할 수 있지만, 양쪽 항원에 동시에는 결합하지 않고, 또한 CLDN6에 특이적으로 결합할 수 있는, 삼중 특이성 항원 결합 분자이다.

[0949] 클로딘 6(CLDN6) 및 다른 클로딘 패밀리 단백질

[0950] 본 명세서에서 이용되는 용어 「CLDN6」는, 특별히 나타내지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트) 등의 포유동물을 포함하는, 임의의 척추동물 공급원 유래의 임의의 천연형 클로딘 6을 가리킨다. 인간 CLDN6(hCLDN6)의 아미노산 서열은 서열 번호: 196 또는 197에 나타나고, 마우스 CLDN6(mCLDN6)의 아미노산 서열은 서열 번호: 201에 나타난다.

[0951] CLDN6 이외의 클로딘 패밀리에는, CLDN3, CLDN4, 및 CLDN9 등의 많은 다른 단백질이 존재한다. 인간 CLDN3(hCLDN3), 인간 CLDN4(hCLDN4), 및 인간 CLDN9(hCLDN9)의 아미노산 서열은 각각, 서열 번호: 199, 200, 및 198에 나타난다. 마우스 CLDN3(mCLDN3), 마우스 CLDN4(mCLDN4), 및 마우스 CLDN9(mCLDN9)의 아미노산 서열은 각각, 서열 번호: 203, 204, 및 202에 나타난다.

[0952] CD3

[0953] 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3의 부분 펩티드의 전체 또는 일부에 특이적으로 결합한다. 특정의 태양에 있어서, CD3은 인간 CD3 또는 필리핀원숭이 CD3, 특히 인간 CD3이다. 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, 인간 CD3 및 필리핀원숭이 CD3에 대해서 교차 반응성이다(즉, 그들에 특이적으로 결합한다). 몇몇 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3의 ε 서브유닛, 특히, 서열 번호: 170(NP_000724.1)(괄호 내에 RefSeq 등록 번호를 나타낸다)에 나타나는 CD3의 인간 CD3ε 서브유닛에 특이적으로 결합할 수 있다. 몇몇 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, 진핵세포의 표면 상에 발현하고 있는 CD3ε 쇄에 특이적으로 결합할 수 있다. 몇몇 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, T 세포의 표면 상에 발현하고 있는 CD3ε 쇄에 결합한다.

[0954] CD137

[0955] 특정의 태양에 있어서, CD137은 인간 CD137이다. 몇몇 태양에 있어서, 본 개시의 항원 결합 분자의 호적한 예에는, 이하로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체에 의해 결합되는 인간 CD137 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자가 포함된다:

[0956] SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC 서열(서열 번호: 182)을 포함하는 영역을 인식하는 항체,

[0957] DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC 서열(서열 번호: 181)을 포함하는 영역을 인식하는 항체,

[0958] LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC 서열(서열 번호: 183)을 포함하는 영역을 인식하는 항체, 및

[0959] 인간 CD137 단백질 중의 LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC 서열(서열 번호: 180)을 포함하는 영역을 인식하는 항체.

[0960] 항원 결합 도메인

[0961] 용어 「항원 결합 도메인」은, 항원의 일부 또는 모두에 특이적으로 결합하고 또한 그것에 상보적인 영역을 포함하는 항체의 일부를 가리킨다. 항원 결합 도메인은, 예를 들어, 1개 또는 복수의 항체 가변 도메인(항체 가변 영역이라고도 불린다)에 의해 초래되어도 된다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은, 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)의 양쪽을 포함한다. 그와 같은 바람직한 항원 결합 도메인에는, 예를 들어, 「단쇄 Fv(scFv)」, 「단쇄 항체」, 「Fv」, 「단쇄 Fv2(scFv2)」, 「Fab」, 및 「$F(ab')_2$」가 포함된다. 항원 결합 도메인은 또한, 싱글 도메인 항체에 의해 초래되어도 된다.

[0962] 싱글 도메인 항체

[0963] 본 명세서에 있어서, 용어 「싱글 도메인 항체」는, 해당 도메인이 그것 단독으로 항원 결합 활성을 발휘할 수 있는 한은, 그 구조에 의해 한정되지 않는다. 일반적인 항체, 예를 들어, IgG 항체는, 가변 영역이 VH 및 VL의 페어링에 의해 형성되어 있는 상태에서 항원 결합 활성을 나타내는데 반해, 싱글 도메인 항체의 그 자체의 도메인 구조는, 다른 도메인과의 페어링 없이 그것 단독으로 항원 결합 활성을 발휘할 수 있음이 공지이다. 통상, 싱글 도메인 항체는, 비교적 낮은 분자량을 가져, 단량체의 형태로 존재한다.

[0964] 싱글 도메인 항체의 예로서는, 이들로 한정되지 않지만, 경쇄를 선천적으로 결여하고 있는 낙타과의 동물의 VHH 및 상어 VNAR 등의 항원 결합 분자, 및 항체 VH 도메인의 전체 혹은 일부 또는 항체 VL 도메인의 전체 혹은 일부를 함유하는 항체 단편을 들 수 있다. 항체 VH 도메인 또는 항체 VL 도메인의 전체 또는 일부를 함유하는 항체 단편인 싱글 도메인 항체의 예로서는, 이들로 한정되지 않지만, 미국 특허 제6,248,516호 B1 등에 기재되어 있는 바와 같은 인간 항체 VH 또는 인간 항체 VL을 기원으로 하는, 인공적으로 조제한 싱글 도메인 항체를 들 수 있다. 본 발명의 몇몇 태양에 있어서, 1개의 싱글 도메인 항체는, 3종류의 CDR(CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 갖는다.

[0965] 싱글 도메인 항체는, 싱글 도메인 항체를 산생할 수 있는 동물로부터, 또는 싱글 도메인 항체를 산생할 수 있는 동물의 면역화에 의해, 얻을 수 있다. 싱글 도메인 항체를 산생할 수 있는 동물의 예로서는, 이들로 한정되지 않지만, 낙타과의 동물, 및 싱글 도메인 항체를 발생시킬 수 있는 유전자를 보유하는 트랜스제닉 동물을 들 수 있다. 낙타과의 동물에는, 낙타, 라마, 알파카, 단봉 낙타, 및 구아나코 등이 포함된다. 싱글 도메인 항체를 발생시킬 수 있는 유전자를 보유하는 트랜스제닉 동물의 예로서는, 이들로 한정되지 않지만, 국제 공개공보 번호 WO2015/143414 및 미국 특허공보 번호 US2011/0123527 A1에 기재된 트랜스제닉 동물을 들 수 있다. 해당 동물로부터 얻어진 싱글 도메인 항체의 프레임워크 서열은, 인간화 싱글 도메인 항체를 얻기 위해서, 인간 생식계열 서열 또는 그것과 유사한 서열로 변환되어도 된다. 인간화 싱글 도메인 항체(예를 들어, 인간화 VHH)도 또한, 본 발명의 싱글 도메인 항체의 일 태양이다.

[0966] 혹은, 싱글 도메인 항체는, 싱글 도메인 항체를 함유하는 폴리펩티드 라이브러리로부터 ELISA 또는 패닝 등에 의해 얻을 수 있다. 싱글 도메인 항체를 함유하는 폴리펩티드 라이브러리의 예로서는, 이들로 한정되지 않지만, 여러 가지 동물 또는 인간으로부터 얻어진 나이브 항체 라이브러리(예를 들어, Methods in Molecular Biology 2012 911 (65-78); 및 Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 2006 1764: 8 (1307-1319)), 여러 가지 동물의 면역화에 의해 얻어진 항체 라이브러리(예를 들어, Journal of Applied Microbiology 2014 117: 2 (528-536)), 및 여러 가지 동물 또는 인간의 항체 유전자로부터 조제한 합성 항체 라이브러리(예를 들어, Journal of Biomolecular Screening 2016 21: 1 (35-43); Journal of Biological Chemistry 2016 291:24 (12641-12657); 및 AIDS 2016 30: 11 (1691-1701))를 들 수 있다.

[0967] 가변 영역

[0968] 용어 「가변 영역」 또는 「가변 도메인」은, 항체를 항원으로 결합시키는 것에 관여하는, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 가리킨다. 천연형 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은, 통상, 각 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함하는, 유사한 구조를 갖는다. (예를 들어, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 참조.) 1개의 VH 또는 VL 도메인으로, 항원 결합 특이성을 주는 데 충분할 것이다. 더욱이, 어느 특정의 항원에 결합하는 항체는, 당해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 각각 VL 또는 VH 도메인의 상보적 라이브러리를 스크리닝하고, 단리되어도 된다. 예를 들어 Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) 참조.

[0969] HVR 또는 CDR

[0970] 본 명세서에서 이용되는 용어 「초가변 영역」 또는 「HVR」은, 서열에 있어서 초가변이고(「상보성 결정 영역」 또는 「CDR」(complementarity determining region)), 및/또는 구조적으로 정해진 루프(「초가변 루프」)를 형성하고, 및/또는 항원 접촉 잔기(「항원 접촉」)를 포함하는, 항체의 가변 도메인의 각 영역을 가리킨다. 초가변 영역(HVR)은, 「상보성 결정 영역」(CDR)이라고도 칭해지고, 이들 용어는, 본 명세서에서는, 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분에 관해서 서로 교환 가능하게 이용된다. 통상, 항체는 6개의 HVR을 포함한다: VH에 3개(H1, H2, H3), 및 VL에 3개(L1, L2, L3)이다. 본 명세서에서의 예시적인 HVR은, 이하의 것을 포함한다:

[0971] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)의 장소에 생기는 초가변 루프(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[0972] (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3)의 장소에 생기는 CDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0973] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2), 및 93-101(H3)의 장소에 생기는 항원 접촉(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및,

[0974] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3), 및 94-102(H3)를 포함하는, (a), (b), 및/또는 (c)의 조합.

[0975] 특별히 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인 중의 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는, 본 명세서에서는 상기의 Kabat 등에 따라 넘버링된다.

[0976] HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3은, 각각, 「H-CDR1」, 「H-CDR2」, 「H-CDR3」, 「L-CDR1」, 「L-CDR2」, 및 「L-CDR3」이라고도 기재된다.

[0977] CD3 및 CD137에 결합할 수 있는

[0978] 본 개시의 항체 가변 영역이 「CD3 및 CD137에 결합할 수 있는」지 여부는는, 당 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 판정할 수 있다.

[0979] 이것은, 예를 들어, 전기 화학 발광법(ECL법)에 의해 판정할 수 있다(BMC Research Notes 2011, 4:281).

[0980] 구체적으로는, 예를 들어, 비오틴 표지된 피험 항원 결합 분자의, CD3 및 CD137에 결합할 수 있는 영역, 예를 들어, Fab 영역으로 구성되는 저분자 항체, 또는 그의 1가 항체(통상의 항체가 갖는 2개의 Fab 영역 중 1개가 결여되어 있는 항체)를, sulfo-tag(Ru 착체)로 표지된 CD3 또는 CD137과 혼합하고, 혼합물을 스트렙트아비딘 고정화 플레이트 상에 첨가한다. 이 조작에 있어서, 비오틴 표지된 피험 항원 결합 분자는, 플레이트 상의 스트렙트아비딘에 결합한다. sulfo-tag로부터 광을 발생시키고, 그 발광 시그널을, Sector Imager 600 또는 2400(MSD K.K.) 등을 이용하여 검출하고, 그것에 의해, CD3 또는 CD137에 대한 피험 항원 결합 분자의 전술한 영역의 결합을 확인할 수 있다.

[0981] 혹은, 이 어세이는, ELISA, FACS(형광 활성화 세포 선별), ALPHAScreen(증폭 발광 근접 호모지니어스 어세이 스크린), 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상에 기초하는 BIACORE법 등에 의해 실시되어도 된다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

[0982] 구체적으로는, 어세이는, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상에 기초하는 상호작용 해석 기기인 Biacore(GE Healthcare Japan Corp.)를 이용하여 실시할 수 있다. Biacore 해석 기기에는, Biacore T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000, 또는 C 등의 임의의 기종이 포함된다. CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA, L1, HPA, 또는 Au 칩 등의 임의의 Biacore용 센서 칩을, 센서 칩으로서 이용할 수 있다. 프로틴 A, 프로틴 G, 프로틴 L, 항인간 IgG 항체, 항인간 IgG-Fab, 항인간 L쇄 항체, 항인간 Fc 항체, 항원 단백질, 또는 항원 펩티드 등의, 본 개시의 항원 결합 분자를 포착하기 위한 단백질을, 아민 커플링, 다이설파이드 커플링, 또는 알데하이드 커플링 등의 커플링법에 의해, 센서 칩 상에 고정화한다. 그 위에 CD3 또는 CD137을 애널라이트로서 인젝트하고, 상호작용을 측정하여 센서그램을 취득한다. 이 조작에 있어서, CD3 또는 CD137의 농도는, 어세이 샘플의 상호작용의 강도(예를 들어, KD)에 따라 수μM로부터 수pM의 범위 내에서 선택할 수 있다.

[0983] 혹은, CD3 또는 CD137을, 항원 결합 분자 대신에 센서 칩 상에 고정화하고, 다음에, 평가하고 싶은 항체 샘플을

상호작용시켜도 된다. 본 개시의 항원 결합 분자의 항체 가변 영역이 CD3 또는 CD137에 대한 결합 활성을 갖는지 여부를, 상호작용의 센서그램으로부터 산출된 해리 상수(KD)치에 기초하여, 또는 항원 결합 분자 샘플의 작용 전의 레벨을 상회하는, 작용 후의 센서 그램의 증가의 정도에 기초하여, 확인할 수 있다. 몇몇 태양에 있어서, 목적하는 항원(즉, CD3 또는 CD137)에 대한 본 개시의 항체 가변 영역의 결합 활성 또는 친화성을, 예를 들어, Biacore T200 기기(GE Healthcare) 또는 Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 이용하여, 37℃(CD137에 대해) 또는 25℃(CD3에 대해)로 평가한다. 항인간 Fc(예를 들어, GE Healthcare)를, 아민 커플링 키트(예를 들어, GE Healthcare)를 이용하여 CM4 센서 칩의 모든 플로 셀 상에 고정화한다. 항원 결합 분자 또는 항체 가변 영역을, 항Fc 센서 표면 상에 포착하고, 그 다음에, 항원(CD3 또는 CD137)을 플로 셀 상에 인젝트한다. 항원 결합 분자 또는 항체 가변 영역의 포착 레벨은, 200레조넌스 유닛(RU)을 목표로 해도 된다. 재조합 인간 CD3 또는 CD137을, 2배 단계 희석에 의해 조제한 400~25nM로 인젝트하고, 그 후 해리시켜도 된다. 모든 항원 결합 분자 또는 항체 가변 영역 및 애널라이트는, 20mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3을 함유하는 ACES pH 7.4에 있어서 조제한다. 센서 표면은, 사이클마다 3M $MgCl_2$로 재생한다. 결합 친화성은, 예를 들어, Biacore T200 Evaluation software, version 2.0(GE Healthcare) 또는 Biacore 8K Evaluation software(GE Healthcare)를 이용하여, 데이터를 프로세싱하여, 1:1 결합 모델에 피팅시키는 것에 의해 결정한다. 본 개시의 항원 결합 도메인의 특이적 결합 활성 또는 친화성을 평가하기 위해서, KD치를 산출한다.

[0984] ALPHAScreen은, 2종류의 비즈(도너 및 억셉터)를 이용하는 ALPHA 테크놀로지에 의해, 이하의 원리에 기초하여 실시된다: 도너 비즈에 결합한 분자와 억셉터 비즈에 결합한 분자 사이의 생물학적 상호작용에 의해 이들 2개의 비즈가 근접하여 위치할 때에만, 발광 시그널이 검출된다. 레이저에 의해 여기된 도너 비즈 중의 포토센서타이저는, 주변의 산소를 여기 상태의 일중항 산소로 변환한다. 일중항 산소는, 도너 비즈 주변으로 확산하고, 그것에 근접하여 위치하는 억셉터 비즈에 도달하면, 그것에 의해 비즈에 있어서의 화학 발광 반응을 야기하여, 최종적으로 광이 방출된다. 도너 비즈에 결합한 분자와 억셉터 비즈에 결합한 분자 사이의 상호작용이 없는 경우에는, 도너 비즈에 의해 산생되는 일중항 산소가 억셉터 비즈에 도달하지 않는다. 따라서, 화학 발광 반응은 일어나지 않는다.

[0985] 그 사이의 상호작용을 관찰하는 물질의 한쪽(리간드)을, 센서 칩의 금 박막 상에 고정한다. 금 박막과 유리의 경계면에서 전반사하도록, 센서 칩의 이측으로부터 광을 쬔다. 결과로서, 반사광의 일부에, 반사 강도가 저하된 부위(SPR 시그널)가 형성된다. 그 사이의 상호작용을 관찰하는 물질의 다른 쪽(애널라이트)을, 센서 칩의 표면 상에 인젝트한다. 애널라이트가 리간드에 결합하면, 고정화되어 있는 리간드 분자의 질량이 증가하여, 센서 칩 표면 상의 용매의 굴절률이 변화한다. 이 굴절률의 변화에 의해, SPR 시그널의 위치가 시프트한다(반대로, 결합한 분자가 해리되면, 시그널은 원래의 위치로 돌아간다). Biacore 시스템은, 시프트의 양, 즉, 센서 칩 표면 상의 질량 변화를 세로 좌표에 플롯하고, 질량의 시간 의존적 변화를 어세이 데이터로서 표시한다(센서그램). 센서 칩 표면 상에 포착된 리간드에 결합한 애널라이트의 양(애널라이트를 상호작용시킨 전후에서의 센서그램 상에서의 리스폰스의 변화의 양)을, 센서그램으로부터 결정할 수 있다. 그러나, 결합량은 리간드의 양에도 의존하기 때문에, 비교는, 실질적으로 동일한 양의 리간드의 양을 이용하는 조건하에서 행해지지 않으면 안 된다. 키네틱스, 즉, 회합 속도 상수(ka) 및 해리 속도 상수(kd)는, 센서그램의 곡선으로부터 결정할 수 있고, 한편, 친화성(KD)은, 이들 상수의 비로부터 결정할 수 있다. 저해 어세이도 또한, BIACORE법에 있어서 호적하게 이용된다. 저해 어세이의 예는, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010에 기재되어 있다.

[0986] <u>CD3과 CD137(4-1BB)에 동시에는 결합하지 않는</u>

[0987] 전술한 바와 같이, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합한다고 하는 것은, CD3과 CD137(4-1BB)에 동시에는 결합하지 않는다고 하는 것을 포함한다. 용어 「CD3과 CD137(4-1BB)에 동시(at the same time)에는 결합하지 않는」 또는 「CD3과 CD137(4-1BB)에 동시(simultaneously)에는 결합하지 않는」은, 본 개시의 항원 결합 부분 또는 항체 가변 영역이, CD3과 결합하고 있는 상태에서는 CD137에 결합할 수 없고, 반대로, 항원 결합 부분 또는 항체 가변 영역이, CD137과 결합하고 있는 상태에서는 CD3에 결합할 수 없음을 의미한다. 여기에서, 「CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않는」이라고 하는 어구에는, CD3을 발현하는 세포와 CD137을 발현하는 세포를 가교하지 않는 것, 또는, 각각이 상이한 세포 상에서 발현하고 있는 CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않는 것도 포함된다. 그와 같은 항체 가변 영역은, 이들 기능을 갖고 있는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그 예에는, 소망의 항원에 결합하도록 그 아미노산의 일부를 개변한, IgG형의 항체 가변 영역에서 유래하는 가변 영역이 포함될 수 있다. 개변되는 아미노산은, 예를 들어, CD3 또는 CD137에 결합하는 항체 가변 영역에 있어서의, 그 개변이

항원에 대한 결합을 상실시키지 않는 아미노산으로부터 선택된다.

[0988] 여기에서, 「상이한 세포 상에서 발현하고 있는」이라고 하는 어구는, 단순히, 항원이 상이한 세포 상에서 발현하고 있음을 의미한다. 그와 같은 세포의 조합은, 예를 들어, T 세포와 다른 T 세포와 같이 동일한 종류의 세포여도 되고, 또는 T 세포와 NK 세포와 같이 상이한 종류의 세포여도 된다.

[0989] 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자가, 항원 결합 시에는 「CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는」지 여부는, 항원 결합 분자가 CD3 및 CD137의 양쪽에 대한 결합 활성을 갖는 것을 확인하는 것; 그 다음에, 이 결합 활성을 갖는 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자에, CD3 또는 CD137 중 어느 하나를 미리 결합시키는 것; 및 그 다음에, 전술한 방법에 의해 다른 하나의 것에 대한 그 결합 활성의 유무를 판정하는 것에 의해 확인할 수 있다. 혹은, 이것은 또한, ELISA 플레이트 상 또는 센서 칩 상에 고정화된 CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 대한 항원 결합 분자의 결합이, 용액 중으로의 다른 하나의 것의 첨가에 의해 저해되는지 여부를 판정하는 것에 의해, 확인할 수도 있다. 몇몇 태양에 있어서, 본 개시의 항원 결합 분자의 CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 대한 결합은, 또 1개에 대한 항원 결합 분자의 결합에 의해, 적어도 50%, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 또는 한층 보다 바람직하게는 95% 이상 저해된다.

[0990] 하나의 국면에 있어서, 1개의 항원(예를 들어, CD3)을 고정화하고 있는 동안에, CD3에 대한 항원 결합 분자의 결합의 저해를, 선행 기술에 있어서 공지된 방법(즉, ELISA, BIACORE 등)에 의해, 다른 항원(예를 들어, CD137)의 존재하에서 결정할 수 있다. 다른 국면에 있어서, CD137을 고정화하고 있는 동안에, CD137에 대한 항원 결합 분자의 결합의 저해도 또한, CD3의 존재하에서 결정할 수 있다. 전술한 2개의 국면 중 어느 1개가 실시될 때에, 결합이, 적어도 50%, 바람직하게는 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 또는 한층 보다 바람직하게는 95% 이상 저해된다면, 본 개시의 항원 결합 분자는, CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않는다고 판정된다.

[0991] 몇몇 태양에 있어서, 애널라이트로서 인젝트되는 항원의 농도는, 고정화되는 다른 항원의 농도보다도 적어도 1배, 2배, 5배, 10배, 30배, 50배, 또는 100배 높다.

[0992] 바람직한 양식에 있어서, 애널라이트로서 인젝트되는 항원의 농도는, 고정화되는 다른 항원의 농도보다도 100배 높고, 결합은, 적어도 80% 저해된다.

[0993] 하나의 태양에 있어서, 항원 결합 분자의 CD137(고정화) 결합 활성에 대한 KD치에 대한 항원 결합 분자의 CD3(애널라이트) 결합 활성에 대한 KD치의 비(KD(CD3)/KD(CD137))를 산출하여, CD137(고정화) 농도보다도 KD치의 비(KD(CD3)/KD(CD137))가 10배, 50배, 100배, 또는 200배 높은, CD3(애널라이트) 농도를, 상기의 경합 측정을 위해서 이용할 수 있다. (예를 들어, KD치의 비가 0.1인 경우는, 1배, 5배, 10배, 또는 20배 높은 농도를 선택할 수 있다. 더욱이, KD치의 비가 10인 경우는, 100배, 500배, 1000배, 또는 2000배 높은 농도를 선택할 수 있다.)

[0994] 하나의 국면에 있어서, 1개의 항원(예를 들어, CD3)을 고정화하고 있는 동안에, CD3에 대한 항원 결합 분자의 결합 시그널의 감약을, 선행 기술에 있어서 공지된 방법(즉, ELISA, ECL 등)에 의해, 다른 항원(예를 들어, CD137)의 존재하에서 결정할 수 있다. 다른 국면에 있어서, CD137을 고정화하고 있는 동안에, CD137에 대한 항원 결합 분자의 결합 시그널의 감약도 또한, CD3의 존재하에서 결정할 수 있다. 전술한 2개의 국면 중 어느 1개가 실시될 때에, 결합 시그널이, 적어도 50%, 바람직하게는 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 또는 한층 보다 바람직하게는 95% 이상 감약된다면, 본 개시의 항원 결합 분자는, CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않는다고 판정된다.

[0995] 몇몇 태양에 있어서, 애널라이트로서 인젝트되는 항원의 농도는, 고정화되는 다른 항원의 농도보다도 적어도 1배, 2배, 5배, 10배, 30배, 50배, 또는 100배 높다.

[0996] 바람직한 양식에 있어서, 애널라이트로서 인젝트되는 항원의 농도는, 고정화되는 다른 항원의 농도보다도 100배 높고, 결합은, 적어도 80% 저해된다.

[0997] 하나의 태양에 있어서, 항원 결합 분자의 CD137(고정화) 결합 활성에 대한 KD치에 대한 항원 결합 분자의 CD3(애널라이트) 결합 활성에 대한 KD치의 비(KD(CD3)/KD(CD137))를 산출하여, CD137(고정화) 농도보다도 KD치의 비(KD(CD3)/KD(CD137))가 10배, 50배, 100배, 또는 200배 높은, CD3(애널라이트) 농도를, 상기의 측정을 위해서 이용할 수 있다. (예를 들어, KD치의 비가 0.1인 경우는, 1배, 5배, 10배, 또는 20배 높은 농도를 선택할 수

있다. 더욱이, KD치의 비가 10인 경우는, 100배, 500배, 1000배, 또는 2000배 높은 농도를 선택할 수 있다.)

[0998] 구체적으로는, 예를 들어, ECL법을 이용하는 경우, 비오틴 표지된 피험 항원 결합 분자, sulfo-tag(Ru 착체)로 표지된 CD3, 및 표지되어 있지 않은 CD137을 준비한다. 피험 항원 결합 분자가, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 경우, 피험 항원 결합 분자와 표지된 CD3의 혼합물을 스트렙트아비딘 고정화 플레이트 상에 첨가하는 것, 및 그 후의 발광에 의해, sulfo-tag의 발광 시그널이, 표지되어 있지 않은 CD137의 비존재하에서 검출된다. 대조적으로, 발광 시그널은, 표지되어 있지 않은 CD137의 존재하에서 감소한다. 이 발광 시그널의 감소를 정량하여, 상대적인 결합 활성을 결정할 수 있다. 이 해석은, 표지된 CD137 및 표지되어 있지 않은 CD3을 이용하여, 마찬가지로 실시될 수 있다.

[0999] ALPHAScreen의 경우, 피험 항원 결합 분자는, 경합하는 CD137의 비존재하에서 CD3과 상호작용하여, 520～620nm의 시그널을 생성한다. 태그 붙여져 있지 않은 CD137은, 피험 항원 결합 분자와의 상호작용에 대해 CD3과 경합한다. 경합의 결과로서 야기되는 형광의 감소를 정량하고, 그것에 의해 상대적인 결합 활성을 결정할 수 있다. 설포-NHS-비오틴 등을 이용한 폴리펩티드의 비오틴화는, 당 기술 분야에 있어서 공지이다. 예를 들어, CD3을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 GST를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 인프레임으로 융합하는 것; 및, 결과로서 생긴 융합 유전자를, 그 발현이 가능한 벡터를 보유하는 세포 등에 의해 발현시키고, 그 후 글루타티온 컬럼을 이용하여 정제하는 것을 포함하는, 적절히 채용되는 방법에 의해, CD3을 GST로 태그 붙이기할 수 있다. 얻어진 시그널은, 바람직하게는, 예를 들어, 비선형 회귀 해석에 기초하는 일부위 경합(one-site competition) 모델에 적합한 소프트웨어 GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)을 이용하여 해석된다. 이 해석은, 태그 붙여진 CD137 및 태그 붙여져 있지 않은 CD3을 이용하여, 마찬가지로 해석될 수 있다.

[1000] 혹은, 형광 공명 에너지 이동(FRET)을 이용한 방법이 이용되어도 된다. FRET란, 여기 에너지가, 근접하여 위치하는 2개의 형광 분자 사이에서 서로, 전자 공명에 의해 직접 이동하는 현상이다. FRET가 일어나면, 도너(여기 상태를 갖는 형광 분자)의 여기 에너지가 억셉터(도너의 근처에 위치하는 다른 하나의 형광 분자)로 이동하기 때문에, 도너로부터 방사되는 형광이 소실되고(정확하게는, 형광의 수명이 단축되고), 대신에 억셉터로부터 형광이 방사된다. 이 현상의 사용에 의해, CD3과 CD137에 동시에 결합하는지 여부를 해석할 수 있다. 예를 들어, 형광 도너를 갖는 CD3 및 형광 억셉터를 갖는 CD137이, 피험 항원 결합 분자에 동시에 결합하면, 도너의 형광은 소실되고, 한편, 억셉터로부터 형광이 방사된다. 그 때문에, 형광 파장의 변화가 관찰된다. 그와 같은 항체는, CD3과 CD137에 동시에 결합하는 것이라고 확인된다. 다른 한편으로, CD3, CD137, 및 피험 항원 결합 분자의 혼합이, CD3과 결합한 형광 도너의 형광 파장을 변화시키지 않다면, 이 피험 항원 결합 분자는, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는 항원 결합 도메인으로 간주할 수 있다.

[1001] 예를 들어, 비오틴 표지된 피험 항원 결합 분자를, 도너 비즈 상의 스트렙트아비딘에 결합시키고, 한편, 글루타티온 S 트랜스페라제(GST)로 태그 붙여진 CD3을, 억셉터 비즈에 결합시킨다. 피험 항원 결합 분자는, 경합하는 제 2 항원의 비존재하에서 CD3과 상호작용하여, 520～620nm의 시그널을 생성한다. 태그 붙여져 있지 않은 제 2 항원은, 피험 항원 결합 분자와의 상호작용에 대해 CD3과 경합한다. 경합의 결과로서 야기되는 형광의 감소를 정량하고, 그것에 의해 상대적인 결합 활성을 결정할 수 있다. 설포-NHS-비오틴 등을 이용한 폴리펩티드의 비오틴화는, 당 기술 분야에 있어서 공지이다. 예를 들어, CD3을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 GST를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 인프레임으로 융합하는 것; 및, 결과로서 생긴 융합 유전자를, 그 발현이 가능한 벡터를 보유하는 세포 등에 의해 발현시키고, 그 후 글루타티온 컬럼을 이용하여 정제하는 것을 포함하는, 적절히 채용하는 방법에 의해, CD3을 GST로 태그 붙이기할 수 있다. 얻어진 시그널은, 바람직하게는, 예를 들어, 비선형 회귀 해석에 기초하는 일부위 경합 모델에 적합한 소프트웨어 GRAPHPAD PRISM(GraphPad Software, Inc., San Diego)을 이용하여 해석된다.

[1002] 태그 붙이기는, GST 태그 붙이기로 한정되지 않고, 히스티딘 태그, MBP, CBP, Flag 태그, HA 태그, V5 태그, c-myc 태그 등이지만 그들로 한정되지 않는, 임의의 태그로 실시되어도 된다. 피험 항원 결합 분자의 도너 비즈로의 결합은, 비오틴-스트렙트아비딘 반응을 이용한 결합으로 한정되지 않는다. 특히, 피험 항원 결합 분자가 Fc를 포함하는 경우, 가능한 방법에는, 도너 비즈 상의 프로틴 A 또는 프로틴 G 등의 Fc 인식 단백질을 개재시켜 피험 항원 결합 분자를 결합시키는 것이 포함된다.

[1003] 상이한 세포 상에서 발현하고 있는 CD3과 CD137에 동시에는 결합할 수 없는 경우도 또한, 당 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 어세이할 수 있다.

[1004] 구체적으로는, CD3 및 CD137에 대한 동시의 결합을 검출하기 위한 ECL-ELISA에 있어서 양성이라고 확인되어 있는 피험 항원 결합 분자를 또한, CD3을 발현하는 세포 및 CD137을 발현하는 세포와 혼합한다. 피험 항원 결합

분자는, 항원 결합 분자 및 이들 세포가 서로 동시에 결합하지 않는 한, 상이한 세포 상에서 발현하고 있는 CD3과 CD137에 동시에는 결합할 수 없음이 나타날 수 있다. 이 어세이는, 예를 들어, 세포 베이스의 ECL-ELISA에 의해 실시할 수 있다. CD3을 발현하는 세포를, 미리 플레이트 상에 고정화한다. 피험 항원 결합 분자를 그것에 결합시킨 후에, CD137을 발현하는 세포를 플레이트에 첨가한다. CD137을 발현하는 세포 상에서만 발현하고 있는 다른 항원은, 이 항원에 대한 sulfo-tag로 표지된 항체를 이용하여 검출된다. 항원 결합 분자가, 각각 2개의 세포 상에서 발현하고 있는 2개의 항원에 동시에 결합하는 경우는, 시그널이 관찰된다. 항원 결합 분자가 이들 항원에 동시에는 결합하지 않는 경우는, 어떠한 시그널도 관찰되지 않는다.

[1005] 혹은, 이 어세이는, ALPHAScreen법에 의해 실시되어도 된다. 피험 항원 결합 분자를, 도너 비즈에 결합한 CD3을 발현하는 세포 및 억셉터 비즈에 결합한 CD137을 발현하는 세포와 혼합한다. 항원 결합 분자가, 각각 2개의 세포 상에서 발현하고 있는 2개의 항원에 동시에 결합하는 경우는, 시그널이 관찰된다. 항원 결합 분자가 이들 항원에 동시에는 결합하지 않는 경우는, 시그널은 관찰되지 않는다.

[1006] 혹은, 이 어세이는, Octet 상호작용 해석법에 의해 실시되어도 된다. 최초에, 펩티드 태그를 부가한 CD3을 발현하는 세포를, 펩티드 태그를 인식하는 바이오센서에 결합시킨다. CD137을 발현하는 세포 및 피험 항원 결합 분자를, 웰에 넣고, 상호작용에 대해 해석한다. 항원 결합 분자가, 각각 2개의 세포 상에서 발현하고 있는 2개의 항원에 동시에 결합하는 경우는, 피험 항원 결합 분자 및 CD137을 발현하는 세포의 바이오센서로의 결합에 의해 야기되는 큰 파장 시프트가 관찰된다. 항원 결합 분자가 이들 항원에 동시에는 결합하지 않는 경우는, 피험 항원 결합 분자만의 바이오센서로의 결합에 의해 야기되는 작은 파장 시프트가 관찰된다.

[1007] 결합 활성에 기초하는 이들 방법 대신에, 생물 활성에 기초하는 어세이가 실시되어도 된다. 예를 들어, CD3을 발현하는 세포 및 CD137을 발현하는 세포를, 피험 항원 결합 분자와 혼합하여 배양한다. 각각 2개의 세포 상에서 발현하고 있는 2개의 항원은, 항원 결합 분자가 이들 2개의 항원에 동시에 결합하는 경우는, 피험 항원 결합 분자를 개재시켜 서로 활성화된다. 그 때문에, 항원의 각각의 하류의 인산화 레벨의 증가 등의 활성화 시그널의 변화를, 검출할 수 있다. 혹은, 사이토카인의 산생이, 활성화의 결과로서 유도된다. 그 때문에, 산생되는 사이토카인의 양을 측정하고, 그것에 의해, 2개의 세포에 동시에 결합하는지 여부를 확인할 수 있다. 혹은, CD137을 발현하는 세포에 대한 세포 상해 활성이, 활성화의 결과로서 유도된다. 혹은, 리포터 유전자의 발현이, 활성화의 결과로서, CD137 또는 CD3의 시그널 전달 경로의 하류에서 활성화되는 프로모터에 의해 유도된다. 그 때문에, 세포 상해 활성 또는 산생되는 리포터 단백질의 양을 측정하고, 그것에 의해, 2개의 세포에 동시에 결합하는지 여부를 확인할 수 있다.

[1008] 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, CD3 및 CD137로의 항원 결합 분자의 결합은 동시는 아니므로(즉, CD3과 CD137에 동시에는 결합하지 않으므로), 동일한 항원 결합 분자에 의한, 상이한 면역 세포(예를 들어, T 세포) 상에 발현하고 있는 CD3 및/또는 CD137로의 동시 결합은 생기지 않고, 그것에 의해, T 세포 상에 발현하고 있는 CD3 및 제 2 분자(예를 들어, CD137)에 동시에 결합할 수 있는 종래의 다중 특이성 항원 결합 분자를 in vivo로 투여했을 경우에 유해 반응을 담당한다고 생각되는 상이한 면역 세포 사이의 바람직하지 않은 가교를 원인으로 하는 독성이 회피된다. 다중 특이성 항원 결합 분자를 in vivo로 투여했을 경우의 독성은, 사이토카인의 산생 등에 의해 측정할 수 있다. 독성이 낮다는 것은, 대조가 되는 다중 특이성 항체와 비교했을 경우에, CLDN6 비의존적인 사이토카인의 산생 등의 면역 활성화 유도가 없는 경우를 말한다.

[1009] Fab 분자

[1010] 「Fab 분자」는, 면역글로불린의 중쇄의 VH 및 CH1 도메인(「Fab 중쇄」) 및 경쇄의 VL 및 CL 도메인(「Fab 경쇄」)으로 이루어지는 단백질을 가리킨다.

[1011] 융합되는

[1012] 「융합되는」은, 구성 성분(예를 들어, Fab 분자 및 Fc 도메인 서브유닛)이, 직접적으로, 또는 1개 혹은 복수의 펩티드 링커를 개재시켜, 펩티드 결합에 의해 연결되는 것을 의미한다.

[1013] 「크로스오버」 Fab

[1014] 「크로스오버」 Fab 분자(「Crossfab」라고도 불린다)는, Fab 중쇄 및 Fab 경쇄의 가변 영역 또는 정상 영역의 어느 하나가 교환되어 있는, Fab 분자를 의미하고, 즉, 크로스오버 Fab 분자는, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 정상 영역으로 구성된 펩티드쇄와 중쇄 가변 영역 및 경쇄 정상 영역으로 구성된 펩티드쇄를 포함한다. 명확하게 하기 위해서 적자면, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변 영역이 교환되어 있는 크로스오버 Fab 분자에서는, 중쇄 정상

영역을 포함하는 펩티드쇄가, 본 명세서에 있어서, 크로스오버 Fab 분자의 「중쇄」라고 칭해진다. 반대로, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 정상 영역이 교환되어 있는 크로스오버 Fab 분자에서는, 중쇄 가변 영역을 포함하는 펩티드쇄가, 본 명세서에 있어서, 크로스오버 Fab 분자의 「중쇄」라고 칭해진다.

[1015] 「종래의」 Fab

[1016] 그에 반해, 「종래의」 Fab 분자는, 그 천연의 형식에서의 Fab 분자, 즉, 중쇄의 가변 영역 및 정상 영역으로 구성된 중쇄(VH-CH1), 및 경쇄의 가변 영역 및 정상 영역으로 구성된 경쇄(VL-CL)를 포함하는 Fab 분자를 의미한다. 용어 「면역글로불린 분자」는, 천연에 존재하는 항체의 구조를 갖는 단백질을 가리킨다. 예를 들어, IgG 클래스의 면역글로불린은, 다이설파이드 결합으로 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된, 약 150,000 돌턴의 헤테로4량체 당단백질이다. 각 중쇄는, N말단으로부터 C말단으로, 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH)과 그 후에 계속되는 중쇄 정상 영역이라고도 불리는 3종류의 정상 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 마찬가지로, 각 경쇄는, N말단으로부터 C말단으로, 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL)과 그 후에 계속되는 경쇄 정상 영역이라고도 불리는 정상 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 면역글로불린의 중쇄는, α(IgA), δ(IgD), ε(IgE), γ(IgG), 또는 μ(IgM)로 불리는 5개의 타입 중 하나에 할당되어도 되고, 그들의 일부는, 서브타입, 예를 들어, γ1(IgG1), γ2(IgG2), γ3(IgG3), γ4(IgG4), α1(IgA1), 및 α2(IgA2)로 추가로 분류되어도 된다. 면역글로불린의 경쇄는, 그 정상 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, κ 및 λ로 불리는 2개의 타입 중 하나에 할당되어도 된다. 면역글로불린은, 면역글로불린 힌지 영역을 개재시켜 연결된, 2개의 Fab 분자 및 Fc 도메인으로 본질적으로 이루어진다.

[1017] 친화성

[1018] 「친화성」은, 분자(예를 들어, 항원 결합 분자 또는 항체)의 결합 부위 1개와, 분자의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의, 비공유 결합적인 상호작용의 합계의 강도를 가리킨다. 특별히 나타내지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 「결합 친화성」은, 어느 결합쌍의 멤버(예를 들어, 항원 결합 분자와 항원, 또는 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는, 고유의 결합 친화성을 가리킨다. 분자 X의, 그 파트너 Y에 대한 친화성은, 일반적으로, 해리 속도 상수와 회합 속도 상수(각각 koff 및 kon)의 비인, 해리 상수(KD)에 의해 나타낼 수 있다. 따라서, 속도 상수의 비가 동일한 그대로인 한, 등가의 친화성은 상이한 속도 상수를 포함해도 된다. 친화성은, 본 명세서에 기재된 것을 포함하는, 당 기술 분야에 있어서 공지된 확립된 방법에 의해 측정할 수 있다. 친화성을 측정하기 위한 구체적인 방법은, 표면 플라즈몬 공명(SPR)이다.

[1019] 친화성을 결정하는 방법

[1020] 특정의 태양에 있어서, 본 명세서에서 제공되는 항원 결합 분자 또는 항체는, 그 항원에 대해서, ≤1μM, ≤120nM, ≤100nM, ≤80nM, ≤70nM, ≤50nM, ≤40nM, ≤30nM, ≤20nM, ≤10nM, ≤2nM, ≤1nM, ≤0.1nM, ≤0.01nM 또는 ≤0.001nM(예를 들어, 10^{-8}M 이하, 10^{-8}M~10^{-13}M, 10^{-9}M~10^{-13}M)의 해리 상수(KD)를 갖는다. 특정의 태양에 있어서, CD3, CD137, 또는 CLDN6에 대한, 항체/항원 결합 분자의 KD치는, 1~40, 1~50, 1~70, 1~80, 30~50, 30~70, 30~80, 40~70, 40~80, 또는 60~80nM의 범위 내에 들어간다.

[1021] 하나의 태양에 있어서, KD는, 방사성 표지 항원 결합 측정법(radiolabeled antigen binding assay: RIA)에 의해 측정된다. 하나의 태양에 있어서, RIA는, 목적하는 항체의 Fab 버젼 및 그 항원을 이용하여 실시된다. 예를 들어, 항원에 대한 Fab의 용액 중 결합 친화성은, 비표지 항원의 점증량 계열의 존재하에서 최소 농도의 (^{125}I) 표지 항원에 의해 Fab를 평형화시키고, 그 다음에 결합한 항원을 항Fab 항체로 코팅된 플레이트에 의해 포착하는 것에 의해 측정된다. (예를 들어, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)을 참조할 것). 측정 조건을 구축하기 위해서, MICROTITER(등록상표) 멀티웰 플레이트(Thermo Scientific)를 50mM 탄산 나트륨(pH 9.6) 중 5μg/ml의 포착용 항Fab 항체(Cappel Labs)로 하룻밤 코팅하고, 그 후에 실온(대략 23℃)에서 2~5시간, PBS 중 2%(w/v) 소 혈청 알부민으로 블록한다. 비흡착 플레이트(Nunc #269620)에 있어서, 100pM 또는 26pM의 [^{125}I]-항원을, (예를 들어, Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)에 있어서의 항VEGF 항체, Fab-12의 평가와 동일하게) 목적하는 Fab의 단계 희석물과 혼합한다. 그 다음에, 목적하는 Fab를 하룻밤 인큐베이트하지만, 이 인큐베이션은, 평형이 확실히 달성되도록, 보다 장시간(예를 들어, 약 65시간) 계속될 수 있다. 그 후, 혼합물을, 실온에서의 인큐베이션(예를 들어, 1시간)을 위해서 포착 플레이트로 옮긴다. 그 다음에 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중 0.1%의 폴리소르베이트 20(TWEEN-20(등록상표))으로 8회 세정한다. 플레이트가 건조하면, 150μl/웰의 신틸런트(MICROSCINT-20(상표), Packard)를 첨가하고, TOPCOUNT(상표) 감마 카운터 (Packard)에 있어서 플레이트를 10분간 카운트한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의

농도를, 경합 결합 어세이에 있어서 사용하기 위해서 선택한다.

[1022] 다른 태양에 의하면, Kd는, BIACORE(등록상표) 표면 플라즈몬 공명 어세이를 이용하여 측정된다. 예를 들어, BIACORE(등록상표)-2000 또는 BIACORE(등록상표)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용하는 측정법이, 대략 10반응 단위(response unit: RU)의 항원이 고정된 CM5 칩을 이용하여 25℃에서 실시된다. 하나의 태양에 있어서, 카복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)은, 공급원의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)를 이용하여 활성화된다. 항원은, 대략 10반응 단위(RU)의 단백질의 결합을 달성하도록, 5㎕/분의 유속으로 주입되기 전에, 10mM 아세트산 나트륨, pH4.8을 이용하여 5㎍/ml(대략 0.2㎛M)로 희석된다. 항원의 주입 후, 미반응기를 블록하기 위해서 1M 에탄올 아민이 주입된다. 키네틱스의 측정을 위해서, 25℃, 대략 25㎕/분의 유속으로, 0.05% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20(상표)) 계면활성제 함유 PBS(PBST) 중의 Fab의 2배 단계 희석물 (0.78nM~500nM)이 주입된다. 회합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는, 단순한 1대1 랭뮤어 결합 모델(BIACORE(등록상표) 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여, 회합 및 해리의 센서그램을 동시에 피팅하는 것에 의해 계산된다. 평형 해리 상수(Kd)는, k_{off}/k_{on}비로서 계산된다. 예를 들어, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)을 참조할 것. 상기의 표면 플라즈몬 공명 어세이에 의해 온 속도가 $10^6 M^{-1} s^{-1}$을 초과하는 경우, 온 속도는, 분광계(예를 들어 스톱 플로식 분광 광도계(Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳을 이용하는 8000 시리즈의 SLM-AMINCO(상표) 분광 광도계(ThermoSpectronic))에 있어서 측정되는, 점증 농도의 항원의 존재하에서의 PBS, pH7.2 중 20nM의 항항원 항체(Fab 형태)의 25℃에서의 형광 발광 강도(여기=295nm; 발광=340nm, 밴드 패스 16nm)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 소광 기술을 이용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[1023] 항원 결합 분자 또는 항체의 친화성을 측정하는 상기의 방법에 따라, 당업자는, 다양한 항원에 대한 다른 항원 결합 분자 또는 항체의 친화성 측정을 행할 수 있다.

[1024] 항체

[1025] 본 명세서에서 용어 「항체」는, 가장 넓은 의미로 사용되고, 소망의 항원 결합 활성을 나타내는 한은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이성 항체(예를 들어, 이중 특이성 항체, 삼중 특이성 항체) 및 항체 단편을 포함하는, 여러 가지 항체 구조를 포함한다.

[1026] 특정의 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항체는, 상이한 종의 CD3, CD137, 또는 CLDN6의 사이에서 보존되어 있는 CD3, CD137, 또는 CLDN6의 에피토프에 결합한다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 다중 특이성 항체는, 삼중 특이성 항체이며, 3종류의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체이다. 즉, 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 다중 특이성 항체는, CD3 및 CD137에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하는, 즉, CD3과 CD137의 양쪽 항원에 동시에는 결합하지 않고, 또한 CLDN6에 특이적으로 결합할 수 있는, 삼중 특이성 항체이다.

[1027] 항체의 클래스

[1028] 항체의 「클래스」는, 항체의 중쇄에 구비되는 정상 도메인 또는 정상 영역의 타입을 가리킨다. 항체에는 5개의 주요한 클래스가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이다. 그리고, 이 중 몇몇은 추가로 서브클래스(아이소타입)로 나눠져도 된다. 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2이다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 대응하는 중쇄 정상 도메인을, 각각, α, δ, ε, γ, 및 μ라고 부른다.

[1029] 특별히 나타내지 않는 한, 경쇄 정상 영역 중의 아미노산 잔기는, 본 명세서에서는 Kabat 등에 따라 넘버링되고, 중쇄 정상 영역 중의 아미노산 잔기의 넘버링은, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기재되어 있는 바와 같은, EU 인덱스라고도 불리는, EU 넘버링 시스템에 따른다.

[1030] 프레임워크

[1031] 「프레임워크」 또는 「FR」은, 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의, 가변 도메인 잔기를 가리킨다. 가변 도메인의 FR은, 통상 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어진다. 그것에 따라서, HVR 및 FR의 서열은, 통상 다음의 순서로 VH(또는 VL)에 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[1032] 인간 컨센서스 프레임워크

[1033] 「인간 컨센서스 프레임워크」는, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택군에 있어서 가장 공통

되게 생기는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 통상, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은, 가변 도메인 서열의 서브그룹으로부터이다. 통상, 서열의 서브그룹은, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), vols. 1-3에 있어서의 서브그룹이다. 하나의 태양에 있어서, VL에 대해, 서브그룹은 상기의 Kabat 등에 의한 서브그룹 κI이다. 하나의 태양에 있어서, VH에 대해, 서브그룹은 상기의 Kabat 등에 의한 서브그룹 III이다.

[1034] 키메라 항체

[1035] 용어 「키메라」항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정의 공급원 또는 종에서 유래하는 한편으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종에서 유래하는 항체를 가리킨다. 마찬가지로, 용어 「키메라 항체 가변 도메인」은, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 일부분이 특정의 공급원 또는 종에서 유래하는 한편으로, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 나머지 부분이 상이한 공급원 또는 종에서 유래하는 항체 가변 영역을 가리킨다.

[1036] 인간화 항체

[1037] 「인간화」항체는, 비인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는, 키메라 항체를 가리킨다. 어느 태양에서는, 인간화 항체는, 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함하고, 당해 가변 영역에 있어서는, 모든 혹은 실질적으로 모든 HVR(예를 들어 CDR)은 비인간 항체의 것에 대응하고, 또한, 모든 혹은 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 대응한다. 인간화 항체는, 임의로, 인간 항체에서 유래하는 항체 정상 영역의 적어도 일부분을 포함해도 된다. 항체(예를 들어, 비인간 항체)의 「인간화된 형태」는, 인간화를 거친 항체를 가리킨다. 「인간화 항체 가변 영역」은, 인간화 항체의 가변 영역을 가리킨다.

[1038] 인간 항체

[1039] 「인간 항체」는, 인간 혹은 인간 세포에 의해 산생된 항체 또는 인간 항체 레퍼터리 혹은 다른 인간 항체 코드 서열을 이용하는 비인간 공급원에서 유래하는 항체의 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 구비하는 항체이다. 이 인간 항체의 정의는, 비인간의 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를, 명확히 제외하는 것이다. 「인간 항체 가변 영역」은, 인간 항체의 가변 영역을 가리킨다.

[1040] 폴리뉴클레오티드(핵산)

[1041] 본 명세서에서 서로 교환 가능하게 사용되는 「폴리뉴클레오티드」 또는 「핵산」은, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머를 가리키고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 수식 뉴클레오티드 혹은 염기, 및/또는 그들의 아날로그, 또는 DNA 혹은 RNA 폴리메라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 폴리머에 짜넣어질 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 아날로그 등의 수식 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에, 비뉴클레오티드 성분이 끼어들어가 있어도 된다. 폴리뉴클레오티드는, 표지로의 컨주게이션 등의, 합성 후에 이루어지는 수식을 포함할 수 있다. 다른 타입의 수식은, 예를 들어, 「캡」, 1개 또는 복수의 천연에 존재하는 뉴클레오티드와 아날로그의 치환, 뉴클레오티드간 수식, 예를 들어, 비하전 연결(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트라이에스터, 포스포로아마이드산, 카바메이트 등) 및 하전 연결(예를 들어, 포스포로싸이오에이트, 포스포로다이싸이오에이트 등)을 수반하는 것, 예를 들어 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩티드, 폴리-L-리신 등) 등의 팬던트 부분을 포함하는 것, 인터칼레이트제(예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등)를 수반하는 것, 킬레이트제(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)를 포함하는 것, 알킬화제를 포함하는 것, 수식 연결(예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)이나 비수식 형태의 폴리뉴클레오티드를 수반하는 것을 포함한다. 더욱이, 통상 당에 존재하는 임의의 하이드록실기는, 예를 들어, 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 치환될 수 있는, 표준적인 보호기에 의해 보호될 수 있는, 혹은 추가적인 뉴클레오티드로의 추가적인 연결을 생성하도록 활성화될 수 있는, 또는 고체 혹은 반고체 지지체에 컨주게이트될 수 있다. 5′ 및 3′ 말단의 OH는, 인산화 또는 아민 혹은 1~20탄소 원자의 유기 캡기 부분에 치환될 수 있다. 다른 하이드록실도 또한, 표준적인 보호기에 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 예를 들어 이하의 것을 포함하는, 당 기술 분야에서 일반적으로 공지가 되어 있는 리보스 또는 데옥시리보스당의 유사 형태를 포함할 수 있다: 2′-O-메틸-, 2′-O-알릴-, 2′-플루오로-, 또는 2′-아자이도리보스, 탄소환식 당 아날로그, α-어노머 당, 아라비노스 또는 자일로스 또는 릭소스 등의 에피머 당, 피라노스당, 푸라노스당, 세도헵툴로스, 비환식 아날로그, 및 메틸 리보사이드 등의 염기성 뉴클레오티드 아날로그. 1개 또는 복수의 포스포다이에스터 결합은, 대체의 연결기에 의해 치

환될 수 있다. 이들 대체의 연결기는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 포스페이트가 이하의 것에 의해 치환되어 있는 태양을 포함한다: P(O)S(「싸이오에이트」), P(S)S(「다이싸이오에이트」), (O)NR_2(「아미데이트」), P(O)R, P(O)OR', CO, 또는 CH_2(「폼아세탈」), 여기에서, 각 R 또는 R'는 독립적으로 H, 또는, 임의로 에터(-O-) 연결, 아릴, 알켄일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 혹은 아르알딜을 포함하는 치환 혹은 비치환 알킬(1~20C)이다. 폴리뉴클레오티드 중의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기의 설명은, RNA 및 DNA를 포함하는 본 명세서에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[1042] 단리된 (핵산)

[1043] 「단리된」 핵산 분자는, 그 원래의 환경의 성분으로부터 분리된 것을 가리킨다. 단리된 핵산 분자는 추가로, 그 핵산 분자를 통상 포함하는 세포 중에 포함된 핵산 분자를 포함하지만, 그 핵산 분자는 염색체 외에 존재하고 있거나 또는 본래의 염색체 상의 위치와는 상이한 염색체 상의 위치에 존재하고 있다.

[1044] 벡터

[1045] 본 명세서에서 이용되는 용어 「벡터」는, 그것이 연결된 다른 하나의 핵산을 증가시킬 수 있는, 핵산 분자를 가리킨다. 이 용어는, 자기 복제 핵산 구조로서의 벡터, 및, 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈 중에 집어넣을 수 있는 벡터를 포함한다. 어느 벡터는, 자신이 동작적으로 연결된 핵산의, 발현을 가져올 수 있다. 그와 같은 벡터는, 본 명세서에서는 「발현 벡터」라고도 칭해진다. 벡터는, 바이러스 또는 일렉트로포레이션을 이용하여 숙주 세포에 도입할 수 있다. 그렇지만, 벡터의 도입은, in vitro로의 방법으로 한정되지 않는다. 예를 들어, 벡터는, 인비보로의 방법을 이용하여 대상에게 직접 도입할 수도 있다.

[1046] 숙주 세포

[1047] 용어 「숙주 세포」, 「숙주 세포주」, 및 「숙주 세포 배양물」은, 서로 교환 가능하게 이용되고, 외래 핵산이 도입된 세포(그와 같은 세포의 자손을 포함한다)를 가리킨다. 숙주 세포는 「형질 전환체」 및 「형질 전환 세포」를 포함하고, 이것에는 초대의 형질 전환 세포 및 계대수에 상관 없이 그 세포에서 유래하는 자손을 포함한다. 자손은, 친세포와 핵산의 내용에 있어서 완전히 동일하지 않아도 되고, 변이를 포함하고 있어도 된다. 오리지널의 형질 전환 세포가 스크리닝되었을 또는 선택되었을 때에 이용된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손도, 본 명세서에서는 포함된다.

[1048] 특이성

[1049] 「특이적」이란, 1개 또는 복수의 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 분자가, 해당 파트너 이외의 분자에 대해서 어떠한 유의한 결합을 나타내지 않음을 의미한다. 더욱이, 「특이적」은 또한, 항원 결합 부위가, 항원 중에 포함되는 복수의 에피토프 중 특정의 에피토프에 특이적인 경우에도 이용된다. 항원 결합 분자가 항원에 특이적으로 결합하는 경우, 그것은 「항원 결합 분자가, 항원에/항원에 대해서 특이성을 갖는/나타내는」이라고도 기재된다. 항원 결합 부위가 결합하는 에피토프가 복수의 상이한 항원 중에 포함되는 경우, 해당 항원 결합 부위를 포함하는 항원 결합 분자는, 해당 에피토프를 갖는 다양한 항원에 결합할 수 있다.

[1050] 항체 단편

[1051] 「항체 단편」은, 완전 항체가 결합하는 항원에 결합하는 당해 완전 항체의 일부분을 포함하는, 당해 완전 항체 이외의 분자를 가리킨다. 항체 단편의 예는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')$_2$, 다이아보디, 선상 항체, 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv), 및 싱글 도메인 항체를 포함한다. 특정의 항체 단편에 대한 총설로서, Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)를 참조할 것. scFv 단편의 총설로서, 예를 들어, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); 더하여, WO93/16185; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호를 참조할 것. 샐비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 in vivo에 있어서의 반감기가 길어진 Fab 및 F(ab')$_2$ 단편에 대한 논설로서, 미국 특허 제5,869,046호를 참조할 것. 다이아보디는, 2가 또는 이중 특이적이어도 되는, 항원 결합 부위를 2개 수반하는 항체 단편이다. 예를 들어, EP404,097; WO1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993) 참조. 트라이아보디(triabody)나 테트라보디(tetrabody)도, Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)에 기재되어 있다. 싱글 도메인 항체는, 항체의 중쇄 가변 도메인의 전체 혹은 일부분, 또는 경쇄 가변 도메인의 전체 혹은 일부분을 포함하는, 항체 단편이다. 특정의 태양에 있어서, 싱글 도메인 항체는, 인간 싱글 도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516호 B1 참조). 항체 단편

은, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 본 명세서에 기재된, 완전 항체의 단백질 분해적 소화, 재조합 숙주 세포(예를 들어, 대장균 또는 파지)에 의한 산생을 포함하는, 여러 가지 수법에 의해 만들 수 있다.

[1052] 가변 단편(Fv)

[1053] 본 명세서에 있어서, 용어 「가변 단편(Fv)」는, 항체의 경쇄 가변 영역(VL)과 항체의 중쇄 가변 영역(VH)의 페어로 구성되는 항체 유래의 항원 결합 부위의 최소 단위를 가리킨다. 1988년에 Skerra와 Pluckthun은, 세균의 시그널 서열의 하류에 항체 유전자를 삽입하여 대장균 중에서 당해 유전자의 발현을 유도하는 것에 의해, 균일하고 또한 활성인 항체가 대장균의 페리플라즘 획분으로부터 조제될 수 있음을 발견했다(Science (1988) 240 (4855), 1038-1041). 페리플라즘 획분으로부터 조제된 Fv에 있어서는, 항원에 결합하는 것과 같은 양식으로 VH와 VL이 회합하고 있다.

[1054] scFv, 단쇄 항체, 및 $sc(Fv)_2$

[1055] 본 명세서에 있어서, 용어 「scFv」, 「단쇄 항체」, 및 「$sc(Fv)_2$」는 모두, 중쇄 및 경쇄에서 유래하는 가변 영역을 포함하지만, 정상 영역을 포함하지 않는, 단일 폴리펩티드쇄의 항체 단편을 가리킨다. 일반적으로, 단쇄 항체는, 항원 결합을 가능하게 한다고 생각되는 소망의 구조의 형성을 가능하게 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. 단쇄 항체는, 「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore, eds., Springer-Verlag, New York, 269-315 (1994)」에 있어서 Pluckthun에 의해 상세히 고찰되어 있다. 마찬가지로, 국제 공개 공보 WO1988/001649, 미국 특허 제4,946,778호 및 동 제5,260,203호를 참조할 것. 특정의 태양에 있어서, 단쇄 항체는, 이중 특이성이고 또한/또는 인간화될 수 있다.

[1056] scFv는 Fv를 형성하는 VH와 VL가 펩티드 링커에 의해 함께 연결된 단쇄 저분자량 항체이다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(1988) 85 (16), 5879-5883). 당해 펩티드 링커에 의해 VH와 VL이 근접한 상태로 유지될 수 있다.

[1057] $sc(Fv)_2$는, 2개의 VL과 2개의 VH의 4개의 가변 영역이 펩티드 링커 등의 링커에 의해 연결되어 1본쇄를 형성하는 단쇄 항체이다(J Immunol. Methods (1999) 231 (1-2), 177-189). 이 2개의 VH와 2개의 VL은 상이한 모노클로날 항체에서 유래해도 된다. 그와 같은 $sc(Fv)_2$로서는, 예를 들어, Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374에 개시되는 바와 같은, 단일 항원 중에 존재하는 2개의 에피토프를 인식하는 이중 특이성 $sc(Fv)_2$를 호적하게 들 수 있다. $sc(Fv)_2$는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, $sc(Fv)_2$는, scFv를 펩티드 링커 등의 링커로 연결하는 것에 의해 제조될 수 있다.

[1058] 본 명세서에 있어서, $sc(Fv)_2$는, 1본쇄 폴리펩티드의 N말단을 기점으로 하여 VH, VL, VH, VL([VH] -링커- [VL] -링커- [VH] -링커- [VL])의 순서로 늘어서 있는 2개의 VH 단위 및 2개의 VL 단위를 포함한다. 2개의 VH 단위와 2개의 VL 단위의 순서는 상기의 구성으로 한정되지 않고, 어떠한 순서로 늘어서 있어도 된다. 구성의 예를 이하에 열거한다.

[1059] [VL] -링커- [VH] -링커- [VH] -링커- [VL]

[1060] [VH] -링커- [VL] -링커- [VL] -링커- [VH]

[1061] [VH] -링커- [VH] -링커- [VL] -링커- [VL]

[1062] [VL] -링커- [VL] -링커- [VH] -링커- [VH]

[1063] [VL] -링커- [VH] -링커- [VL] -링커- [VH]

[1064] $sc(Fv)_2$의 분자 형태에 대해서는 WO2006/132352에 있어서도 상세히 기재되어 있다. 당업자이면 이들 기재에 따라, 본 명세서에서 개시되는 폴리펩티드 복합체를 제조하기 위해서 소망의 $sc(Fv)_2$를 적절히 조제하는 것이 가능하다.

[1065] 더욱이 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체에, PEG 등의 담체 고분자나 항암제 등의 유기 화합물을 컨주게이트해도 된다. 혹은, 당쇄가 소망의 효과를 가져오도록, 당쇄 부가 서열이 항원 결합 분자 또는 항체에 호적하게 삽입된다.

[1066] 항체의 가변 영역의 연결에 사용하는 링커는, 유전자 공학에 의해 도입될 수 있는 임의의 펩티드 링커, 합성 링커, 및 예를 들어 Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996에 개시되는 링커를 포함한다. 그렇지만, 본 개

시에 있어서는 펩티드 링커가 바람직하다. 펩티드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하다. 길이는, 바람직하게는 5아미노산 이상(특별히 한정되지 않지만, 상한은 통상, 30아미노산 이하, 바람직하게는 20아미노산 이하)이며, 특히 바람직하게는 15아미노산이다. $sc(Fv)_2$에 3개의 펩티드 링커가 포함되는 경우에는, 그들의 길이는 모두 동일해도 되고 상이해도 된다.

[1067] 예를 들어, 그와 같은 펩티드 링커에는 이하의 것이 포함된다:

[1068] Ser,

[1069] Gly-Ser,

[1070] Gly-Gly-Ser,

[1071] Ser-Gly-Gly,

[1072] Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호: 171),

[1073] Ser-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 172),

[1074] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호: 173),

[1075] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 174),

[1076] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호: 175),

[1077] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 176),

[1078] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호: 177),

[1079] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 178),

[1080] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호: 173))n, 및

[1081] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(서열 번호: 174))n.

[1082] 여기에서 n은 1 이상의 정수이다. 펩티드 링커의 길이나 서열은 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

[1083] 합성 링커(화학 가교제)는, 펩티드의 가교에 통상 이용되고 있고, 예로서는, N-하이드록시석신이미드(NHS), 다이석신이미딜수베레이트(DSS), 비스(설포석신이미딜)수베레이트(BS3), 다이싸이오비스(석신이미딜프로피오네이트)(DSP), 다이싸이오비스(설포석신이미딜프로피오네이트)(DTSSP), 에틸렌 글라이콜 비스(석신이미딜석시네이트)(EGS), 에틸렌 글라이콜 비스(설포석신이미딜석시네이트)(설포-EGS), 다이석신이미딜타르타르산염(DST), 다이설포석신이미딜타르타르산염(설포-DST), 비스 [2-(석신이미드옥시카보닐옥시)에틸] 설폰(BSOCOES), 및 비스 [2-(설포석신이미드옥시카보닐옥시)에틸] 설폰(설포-BSOCOES)을 들 수 있다. 이들 가교제는 시판되고 있다.

[1084] 4개의 항체 가변 영역을 연결하려면, 통상, 3개의 링커가 필요하다. 이용되는 링커는, 동일한 종류의 것이어도 상이한 종류의 것이어도 된다.

[1085] Fab, $F(ab')_2$, 및 Fab'

[1086] 「Fab」는, 1개의 경쇄, 및 1개의 중쇄의 CH1 도메인 및 가변 영역으로 이루어진다. Fab 분자의 중쇄는, 다른 중쇄 분자와 다이설파이드 결합을 형성할 수 없다.

[1087] 「$F(ab')_2$」 또는 「Fab」는, 면역글로불린(모노클로날 항체)을 펩신 및 파파인 등의 프로테아제로 처리하는 것에 의해 제조되고, 면역글로불린(모노클로날 항체)을 2개의 각 H쇄의 힌지 영역 사이에 존재하는 다이설파이드 결합의 근처에서 소화하는 것에 의해 생성되는 항체 단편을 가리킨다. 예를 들어 파파인은, IgG를, 2개의 각 H쇄의 힌지 영역 사이에 존재하는 다이설파이드 결합의 상류에서 절단하여, VL(L쇄 가변 영역) 및 CL(L쇄 정상 영역)를 포함하는 L쇄가 VH(H쇄 가변 영역) 및 CHγ1(H쇄 정상 영역 중의 γ1 영역)을 포함하는 H쇄 단편과 그들의 C말단 영역에서 다이설파이드 결합에 의해 연결되어 있는, 상동인 2개의 항체 단편을 생성한다. 이들 2개의 상동인 항체 단편은 각각 Fab'로 불린다.

[1088] 「$F(ab')_2$」는, 2개의 경쇄, 및 다이설파이드 결합이 2개의 중쇄 사이에 형성되도록 CH1 도메인 및 CH2 도메인

의 일부분의 정상 영역을 포함하는 2개의 중쇄로 이루어진다. 본 명세서에 있어서 개시되는 $F(ab')_2$는, 다음과 같이 호적하게 제조될 수 있다. 소망의 항원 결합 부위를 포함하는 모노클로날 전부 항체 등을, 펩신 등의 프로테아제로 부분 소화하고, Fc 단편을 프로틴 A 컬럼에 흡착시키는 것에 의해 제거한다. 프로테아제는, pH 등의 적절한 설정 효소 반응 조건하에서 선택적으로 $F(ab')_2$를 가져오도록 전부 항체를 절단할 수 있는 것인 한, 특별히 한정은 되지 않는다. 예를 들어, 그와 같은 프로테아제에는 펩신 및 피신이 포함된다.

[1089] Fc 영역

[1090] 본 발명에 있어서, 용어 「Fc 영역」 또는 「Fc 도메인」은, 항체 분자 중의, 힌지 또는 그 일부, 및 CH2 및 CH3 도메인으로 이루어지는 단편을 포함하는 영역을 가리킨다. IgG 클래스의 Fc 영역은, 예를 들어, 시스테인 226(EU 넘버링(본 명세서에 있어서 EU 인덱스라고도 칭해진다))으로부터 C말단까지, 또는 프롤린 230(EU 넘버링)으로부터 C말단까지의 영역을 의미하지만, 그것에 한정되지 않는다. Fc 영역은, 바람직하게는, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 모노클로날 항체를, 펩신 등의 단백질 분해 효소로 부분 소화한 후에, 프로틴 A 컬럼 또는 프로틴 G 컬럼에 흡착된 획분을 재용출하는 것에 의해 취득할 수 있다. 그와 같은 단백질 분해 효소는, 적절히 설정되는 효소의 반응 조건(예를 들어, pH)하에서 제한적으로 Fab 또는 $F(ab')_2$를 형성하도록 전장 항체를 소화할 수 있는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그 예에는, 펩신 및 파파인이 포함될 수 있다.

[1091] 본 발명에 있어서, 예를 들어, 천연형 IgG에서 유래하는 Fc 영역을, 본 개시의 「Fc 영역」으로서 이용할 수 있다. 여기에서, 천연형 IgG란, 천연에서 발견되는 IgG와 동일한 아미노산 서열을 함유하고, 면역글로불린 γ 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 항체의 클래스에 속하는 폴리펩티드를 의미한다. 천연형 인간 IgG란, 예를 들어, 천연형 인간 IgG1, 천연형 인간 IgG2, 천연형 인간 IgG3, 또는 천연형 인간 IgG4를 의미한다. 천연형 IgG에는 또한, 자연 발생적으로 그것에서 유래하는 배리언트 등도 포함된다. 유전자다형에 기초하는 복수의 알로타입 서열이, 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 및 인간 IgG4 항체의 정상 영역으로서 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242에 기재되어 있고 그들은 모두, 본 개시에 있어서 이용할 수 있다. 특히, 인간 IgG1의 서열은, EU 넘버링 356~358위의 아미노산 서열로서 DEL 또는 EEM을 가져도 된다.

[1092] 몇몇 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, 면역글로불린 분자의 중쇄 도메인을 포함하는 폴리펩티드쇄의 쌍으로 이루어진다. 예를 들어, 면역글로불린 G(IgG) 분자의 Fc 도메인은, 그 각 서브유닛이 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 정상 도메인을 포함하는, 이량체이다. Fc 도메인의 2개의 서브유닛은, 서로 안정적으로 회합할 수 있다. 하나의 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 1개 이하의 Fc 도메인을 포함한다.

[1093] 본 명세서에 있어서 기재되는 하나의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 다른 태양에 있어서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 추가적인 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 영역이다.

[1094] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[1095] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcγ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[1096] 을 추가로 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 Fc 도메인이, 안정되게 회합할 수 있는 제 1 Fc 영역 서브유닛 및 제 2 Fc 영역 서브유닛으로 구성된다.

[1097] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[1098] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcγ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[1099] 을 추가로 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 Fc 도메인이, 이하의 (e1) 또는 (e2):

[1100] (e1) 349위에 Cys, 366위에 Ser, 368위에 Ala, 및 407위에 Val을 포함하는, 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 354위에 Cys 및 366위에 Trp를 포함하는 제 2 Fc 영역;

[1101] (e2) 439위에 Glu를 포함하는 제 1 Fc 영역 서브유닛, 및 356위에 Lys를 포함하는 제 2 Fc 영역

[1102] 을 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, 다중 특이성 항원 결합 분자이다.

[1103] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[1104] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcɣ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[1105] 을 추가로 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 Fc 도메인에 포함되는 제 1 및/또는 제 2 Fc 영역 서브유닛이, 이하의 (f1) 또는 (f2):

[1106] (f1) 234위에 Ala 및 235위에 Ala;

[1107] (f2) 234위에 Ala, 235위에 Ala, 및 297위에 Ala

[1108] 를 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, 다중 특이성 항원 결합 분자이다.

[1109] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[1110] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcɣ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[1111] 을 추가로 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 Fc 도메인이, 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 FcRn에 대한 보다 강력한 FcRn 결합 친화성을 추가로 나타내는, 다중 특이성 항원 결합 분자이다.

[1112] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는,

[1113] (iii) 천연형 인간 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, 인간 Fcɣ 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인

[1114] 을 추가로 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자로서, 해당 Fc 도메인에 포함되는 제 1 및/또는 제 2 Fc 영역 서브유닛이, 428위에 Leu, 434위에 Ala, 438위에 Arg, 및 440위에 Glu를 포함하고, 해당 아미노산 위치가, EU 인덱스에 의해 넘버링되는, 다중 특이성 항원 결합 분자이다.

[1115] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트, 방법, 또는 사용에 있어서, 화학요법제와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 백금 제제와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 특정의 태양에 있어서, 카보플라틴 또는 시스플라틴과 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 알칼로이드와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 식물 알칼로이드와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 토포아이소메라제 저해제와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 특정의 태양에 있어서, 이리노테칸과 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 대사 길항약과 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 특정의 태양에 있어서, 겜시타빈과 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다.

[1116] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트, 방법, 또는 사용에 있어서, 면역 체크포인트 저해제와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 항PD-L1 항체와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다.

[1117] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트, 방법, 또는 사용에 있어서, PARP 저해제와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다. 어느 태양에 있어서, 올라파리브와 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자가 병용된다.

[1118] 저하된 Fc 수용체(Fcɣ 수용체) 결합 활성을 갖는 Fc 영역

[1119] 특정의 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, 천연형 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타낸다. 하나의 그와 같은 태양에 있어서, Fc 도메인(또는 해당 Fc 도메인을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자)은, 천연형 IgG1 Fc 도메인(또는 천연

형 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자)과 비교하여, 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 보다 바람직하게는 10% 미만, 및 가장 바람직하게는 5% 미만의 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 나타낸다. 하나의 태양에 있어서, Fc 도메인(또는 해당 Fc 도메인을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자)은, Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않는다. 특정의 태양에 있어서, Fc 수용체는 Fcγ 수용체이다. 하나의 태양에 있어서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 하나의 태양에 있어서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 특정의 태양에 있어서, Fc 수용체는, 활성화 인간 Fcγ 수용체, 보다 구체적으로는 인간 FcγRIIIa, FcγRI, 또는 FcγRIIa, 가장 구체적으로는 인간 FcγRIIIa이다.

[1120] 특정의 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 저하시키는 1개 또는 복수의 아미노산 변이를 포함한다. 전형적으로는, 동일한 1개 또는 복수의 아미노산 변이가, Fc 도메인의 2개의 서브유닛의 각각에 존재한다. 하나의 태양에 있어서, 아미노산 변이는, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 저하시킨다. 하나의 태양에 있어서, 아미노산 변이는, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 적어도 2분의 1, 적어도 5분의 1, 또는 적어도 10분의 1로 저하시킨다. Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 저하시키는 2개 이상의 아미노산 변이가 존재하는 태양에 있어서, 이들 아미노산 변이의 조합은, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 적어도 10분의 1, 적어도 20분의 1, 또는 더욱이 적어도 50분의 1로 저하시킬 수 있다. 하나의 태양에 있어서, 엔지니어링된 Fc 도메인을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 엔지니어링되어 있지 않은 Fc 도메인을 포함하는 다중 특이성 항원 결합 분자와 비교하여, 20% 미만, 구체적으로는 10% 미만, 보다 구체적으로는 5% 미만의 Fc 수용체에 대한 결합 친화성을 나타낸다. 특정의 태양에 있어서, Fc 수용체는 Fcγ 수용체이다. 몇몇 태양에 있어서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 몇몇 태양에 있어서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 특정의 태양에 있어서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fcγ 수용체, 보다 구체적으로는 인간 FcγRIIIa, FcγRI, 또는 FcγRIIa, 가장 구체적으로는 인간 FcγRIIIa이다. 바람직하게는, 이들 수용체의 각각에 대한 결합이 저하된다.

[1121] 하나의 태양에 있어서, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성을 저하시키는 아미노산 변이는 아미노산 치환이다. 하나의 태양에 있어서, Fc 도메인은, E233, L234, L235, N297, P331, 및 P329의 군으로부터 선택되는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인은, L234, L235, 및 P329의 군으로부터 선택되는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 몇몇 태양에 있어서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함한다. 하나의 그와 같은 태양에 있어서, Fc 도메인은, IgG1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 하나의 태양에 있어서, Fc 도메인은, P329위에서의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정의 태양에 있어서, 아미노산 치환은, P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다. 하나의 태양에 있어서, Fc 도메인은, P329위에서의 아미노산 치환, 및 E233, L234, L235, N297, 및 P331로부터 선택되는 위치에서의 새로운 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정의 태양에 있어서, 새로운 아미노산 치환은, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, 또는 P331S이다. 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인은, P329위, L234위, 및 L235위에서의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인은, 아미노산 변이 L234A, L235A, 및 P329G(「P329G LALA」)를 포함한다. 하나의 그와 같은 태양에 있어서, Fc 도메인은, IgG1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 아미노산 치환의 「P329G LALA」의 조합은, PCT 공보 번호 WO2012/130831에 기재되어 있는 바와 같이, 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fcγ 수용체(및 보체) 결합을 거의 완전히 소실시킨다. WO2012/130831은 또한, 그와 같은 변이 Fc 도메인을 조제하는 방법, 및 Fc 수용체 결합 또는 이펙터 기능 등의 그 특성을 판정하기 위한 방법도 기재하고 있다.

[1122] IgG4 항체는, IgG1 항체와 비교하여, Fc 수용체에 대한 저하된 결합 친화성 및 저하된 이펙터 기능을 나타낸다. 따라서, 몇몇 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 T 세포를 활성화하는 이중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, IgG4 Fc 도메인, 특히 인간 IgG4 Fc 도메인이다. 하나의 태양에 있어서, IgG4 Fc 도메인은, S228위에서의 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P를 포함한다. Fc 수용체에 대한 그 결합 친화성 및/또는 그 이펙터 기능을 추가로 저하시키기 위해서, 하나의 태양에 있어서, IgG4 Fc 도메인은, L235위에서의 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 L235E를 포함한다. 다른 태양에 있어서, IgG4 Fc 도메인은, P329위에서의 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 P329G를 포함한다. 특정의 태양에 있어서, IgG4 Fc 도메인은, S228위, L235위, 및 P329위에서의 아미노산 치환, 특히 아미노산 치환 S228P, L235E, 및 P329G를 포함한다. 그와 같은 IgG4 Fc 도메인 변이체 및 그들의 Fcγ 수용체 결합 특성은, PCT 공보 번호 WO2012/130831에 기재되어 있다.

[1123] 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인의 N-글리코실화는 제거되어 있다. 하나의 그와 같은 태양에 있어서, Fc 도메인은, N297위에서의 아미노산 변이, 특히, 아스파라긴을 알라닌(N297A) 또는 아스파라긴산(N297D)에 의해 치환하는 아미노산 치환을 포함한다.

[1124] 특히 바람직한 태양에 있어서, 천연형 IgG1 Fc 도메인과 비교하여, Fc 수용체에 대한 저하된 결합 친화성을 나타내는 Fc 도메인은, 아미노산 치환 L234A, L235A, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG1 Fc 도메인이다.

[1125] 변이체 Fc 도메인은, 당 기술 분야에 있어서 주지된 유전학적 방법 또는 화학적 방법을 이용하여, 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 또는 개변에 의해 조제할 수 있다. 유전학적 방법에는, 코드 DNA 서열의 부위 특이적 변이 유발, PCR, 및 유전자 합성 등이 포함될 수 있다. 정확한 뉴클레오티드의 변화는, 예를 들어 서열 결정에 의해 검증할 수 있다.

[1126] Fc 수용체로의 결합은, 예를 들어, ELISA에 의해, 또는 BIAcore 기기(GE Healthcare) 등의 표준적인 기기 장치를 이용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 용이하게 결정할 수 있고, Fc 수용체 등은, 재조합 발현에 의해 얻어져도 된다. 적절한 그와 같은 결합 어세이가 본 명세서에 있어서 기재된다. 혹은, Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화성 또는 Fc 도메인을 포함하는 세포 활성화 이중 특이성 항원 결합 분자의 결합 친화성은, 특정의 Fc 수용체를 발현하는 것이 공지된 세포주, 예를 들어 Fcγ IIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포를 이용하여 평가될 수 있다.

[1127] Fc 수용체

[1128] 용어 「Fc 수용체」 또는 「FcR」은, 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 가리킨다. 몇몇 태양에 있어서, FcR은, 천연형 인간 FcR이다. 몇몇 태양에 있어서, FcR은, IgG 항체에 결합하는 것(감마 수용체)이고, FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII 서브 클래스의 수용체를, 이들 수용체의 대립 유전자 배리언트 및 선택적 스플라이싱에 의한 형태를 포함시켜, 포함한다. FcγRII 수용체는, FcγRIIA(「활성화 수용체」) 및 FcγRIIB(「저해 수용체」)를 포함하고, 이들은 주로 그 세포질 도메인에 있어서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는, 그 세포질 도메인에 면역 수용체 티로신 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)를 포함한다. 저해 수용체 FcγRIIB는, 그 세포질 도메인에 면역 수용체 티로신 저해 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM)를 포함한다. (예를 들어, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)를 참조.) FcR은, 예를 들어, Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med 126:330-41 (1995)에 있어서 총설되어 있다. 장래 동정되는 것을 포함하는 다른 FcR도, 본 명세서의 용어 「FcR」에 포함된다.

[1129] 용어 「Fc 수용체」 또는 「FcR」은 또한, 모체의 IgG의 태아로의 이동(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) 및 면역글로불린의 항상성의 조절을 담당하는, 신생아형 수용체 FcRn을 포함한다. FcRn으로의 결합을 측정하는 방법은 공지이다(예를 들어, Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO2004/92219 (Hinton et al.)를 참조할 것).

[1130] in vivo에서의 인간 FcRn으로의 결합 및 인간 FcRn 고친화성 결합 폴리펩티드의 혈장 반감기는, 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 혹은 트랜스펙트된 인간 세포주에 있어서 또는 배리언트 Fc 영역을 수반하는 폴리펩티드가 투여되는 영장류에 있어서 측정될 수 있다. WO2000/42072 (Presta)는, FcR에 대한 결합이 증가한 또는 감소한 항체 배리언트를 기재하고 있다. 예를 들어, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)도 참조할 것.

[1131] Fcγ 수용체

[1132] Fcγ 수용체는, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 모노클로날 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 수용체를 가리키고, 이것에는 Fcγ 수용체 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 단백질의 패밀리에 속하는 모든 멤버가 포함된다. 인간에 있어서, 이 패밀리에는, 아이소폼 FcγRIa, FcγRIb, 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI (CD64); 아이소폼 FcγRIIa(알로타입 H131 및 R131을 포함한다), FcγRIIb(FcγRIIb-1 및 FcγRIIb-2를 포함한다), 및 FcγRIIc를 포함하는 FcγRII(CD32); 및 아이소폼 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16); 및 미동정의 인간 Fcγ 수용체, Fcγ 수용체 아이소폼, 및 그들의 알로타입의 모두가 포함된다. 그렇지만, Fcγ 수용체는 이들 예로 한정되지 않는다. Fcγ 수용체에는, 이들로 한정되지 않지만, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이에서 유래하는 것이 포함된다. Fcγ 수용체는 임의의 생물에서 유래해도 된다. 마우스 Fcγ 수용체에는, 이들로 한정되지 않지만, FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), FcγRIII(CD16), 및 FcγRIII-2(CD16-2), 및 미동정의 마우스 Fcγ 수용체, Fcγ 수용체 아이소폼, 및 그들의 알로타입의 모두가 포함된다. 그와 같은 바람직한 Fcγ 수용체

에는, 예를 들어, 인간 FcγRI(CD64), FcγRIIA(CD32), FcγRIIB(CD32), FcγRIIIA(CD16), 및/또는 FcγRIIIB(CD16)가 포함된다. FcγRI의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 RefSeq 등록 번호 NM_000566.3 및 RefSeq 등록 번호 NP_000557.1에 나타나고; FcγRIIA의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 RefSeq 등록 번호 BC020823.1 및 RefSeq 등록 번호 AAH20823.1에 나타나고; FcγRIIB의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 RefSeq 등록 번호 BC146678.1 및 RefSeq 등록 번호 AAI46679.1에 나타나고; FcγRIIIA의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 RefSeq 등록 번호 BC033678.1 및 RefSeq 등록 번호 AAH33678.1에 나타나고; 및 FcγRIIIB의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은, 각각 RefSeq 등록 번호 BC128562.1 및 RefSeq 등록 번호 AAI28563.1에 나타난다. Fcγ 수용체가 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 모노클로날 항체의 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 갖는지 여부는, 상기의 FACS 및 ELISA 포맷에 더하여, ALPHA 스크린(증폭 발광 근접 호모지니어스 어세이), 표면 플라즈몬 공명(SPR) 베이스의 BIACORE법, 및 그 외에 의해 평가할 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

[1133] 그 한편으로, 「Fc 리간드」 또는 「이펙터 리간드」는, 항체 Fc 도메인에 결합하여 Fc/Fc 리간드 복합체를 형성하는 분자, 및 바람직하게는 폴리펩티드를 가리킨다. 해당 분자는 임의의 생물에서 유래해도 된다. Fc 리간드의 Fc로의 결합은, 바람직하게는 1개 또는 복수의 이펙터 기능을 유도한다. 그와 같은 Fc 리간드에는, Fc 수용체, Fcγ 수용체, Fcα 수용체, Fcβ 수용체, FcRn, C1q, 및 C3, 만난 결합 렉틴, 만노스 수용체, 스타필로코커스(Staphylococcus) 프로틴 A, 스타필로코커스 프로틴 G, 및 바이러스 Fcγ 수용체가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. Fc 리간드에는, Fcγ 수용체와 상동인 Fc 수용체의 패밀리인 Fc 수용체 상동체(FcRH)(Davis et al., (2002) Immunological Reviews 190, 123-136)도 또한 포함된다. Fc 리간드에는, Fc에 결합하는 미동정의 분자도 또한 포함된다.

[1134] Fcγ 수용체 결합 활성

[1135] FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, 및/또는 FcγRIIIB의 어느 하나의 Fcγ 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 활성이 손상되어 있는 것은, 상기의 FACS 및 ELISA 포맷, 및 ALPHA 스크린(증폭 발광 근접 호모지니어스 어세이) 및 표면 플라즈몬 공명(SPR) 베이스의 BIACORE법을 이용하는 것에 의해 평가할 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

[1136] ALPHA 스크린은, 2종류의 비즈: 도너 비즈 및 억셉터 비즈를 이용하는, 하기의 원리에 기초한 ALPHA 기술에 의해 실시된다. 도너 비즈에 연결된 분자가 억셉터 비즈에 연결된 분자와 생물학적으로 상호작용하고, 또한 2개의 비즈가 근접하여 위치하는 경우에만, 발광 시그널이 검출된다. 도너 비즈 내의 광증감제는, 레이저광에 의해 여기되어, 비즈 주변의 산소를 여기 상태의 일중항 산소로 변환한다. 일중항 산소가 도너 비즈 주변으로 확산하여, 근접하여 위치하는 억셉터 비즈에 도달하면, 억셉터 비즈 내의 화학 발광 반응이 유도된다. 이 반응에 의해 최종적으로 광이 방출된다. 도너 비즈에 연결된 분자가 억셉터 비즈에 연결된 분자와 상호작용하지 않는 것이면, 도너 비즈에 의해 생성되는 일중항 산소는 억셉터 비즈에 도달하지 않아, 화학 발광 반응은 일어나지 않는다.

[1137] 예를 들어, 비오틴 표지된 항원 결합 분자 또는 항체를 도너 비즈에 고정화하고, 글루타티온 S 트랜스페라제(GST)로 태그 붙여진 Fcγ 수용체를 억셉터 비즈에 고정화한다. 경합적 변이 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자 또는 항체의 비존재하에서는, Fcγ 수용체는, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자 또는 항체와 상호작용하여, 결과로서 520~620nm의 시그널을 유도한다. 태그 붙여져 있지 않은 변이 Fc 도메인을 갖는 항원 결합 분자 또는 항체는, 야생형 Fc 도메인을 포함하는 항원 결합 분자 또는 항체와 Fcγ 수용체의 상호작용에 관해서 경합한다. 경합의 결과로서의 형광의 감소를 정량화하는 것에 의해, 상대적 결합 친화성을 결정할 수 있다. Sulfo-NHS-비오틴 등을 이용하여 항체 등의 항원 결합 분자 또는 항체를 비오틴화하는 방법은 공지이다. GST 태그를 Fcγ 수용체에 부가하기 위한 적절한 방법에는, Fcγ 수용체를 코딩하는 폴리펩티드와 GST를 코딩하는 폴리펩티드를 인프레임으로 융합하고, 해당 융합 유전자를 보유하는 벡터가 도입된 세포를 이용하여 해당 유전자를 발현시키고, 그 다음에 글루타티온 컬럼을 이용하여 정제하는 것을 수반하는 방법이 포함된다. 유도된 시그널은 바람직하게는, 예를 들어, GRAPHPAD PRISM(GraphPad; San Diego) 등의 소프트웨어를 이용하여 비선형 회귀 분석에 기초하는 일부위 경합 모델에 적합시키는 것에 의해, 해석할 수 있다.

[1138] 상호작용을 관찰하기 위한 물질의 한쪽을, 리간드로서 센서 칩의 금 박막 상에 고정화한다. 금 박막과 유리의 경계면에서 전반사가 일어나도록 센서 칩의 이면으로부터 광을 쬐면, 어느 특정의 부위에 있어서 반사광의 강도가 부분적으로 저하된다(SPR 시그널). 상호작용을 관찰하기 위한 다른 쪽의 물질을, 분석물로서 센서 칩의 표면 상에 주입한다. 분석물이 리간드에 결합하면, 고정화 리간드 분자의 질량이 증가한다. 이것에 의해, 센서

칩의 표면 상의 용매의 굴절률이 변화한다. 굴절률의 변화는, SPR 시그널의 위치의 시프트를 일으킨다(반대로, 해리되면 시그널은 원래의 위치로 시프트하여 돌아온다). Biacore 시스템에서는, 상기의 시프트의 양(즉, 센서 칩 표면 상에서의 질량의 변화)을 세로축에 플롯하고, 그와 같이 하여 경시적인 질량의 변화를 측정 데이터로서 표시한다(센서그램). 센서그램의 곡선으로부터 동태 파라미터(회합 속도 상수(ka) 및 해리 속도 상수(kd))가 결정되고, 이들 2개의 상수의 비율로부터 친화성(KD)이 결정된다. BIACORE법에서는, 저해 어세이가 바람직하게 이용된다. 그와 같은 저해 어세이의 예는, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11), 4005-4010에 기재되어 있다.

[1139] 다중 특이성 항원 결합 분자의 산생 및 정제

[1140] 몇몇 태양에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자는, 단리된 다중 특이성 항원 결합 분자이다.

[1141] 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, Fc 도메인의 2개의 서브유닛의 한쪽 또는 다른 한쪽에 융합된, 2종류의 상이한 항원 결합 부분(예를 들어, 「제 1 항원 결합 부분」 및 「제 2 항원 결합 부분」)을 포함하고, 따라서, Fc 도메인의 2개의 서브유닛은 전형적으로는, 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드쇄에 포함된다. 이들 폴리펩티드의 재조합 동시 발현 및 계속된 이량체화는, 2개의 폴리펩티드의 복수의 조합의 가능성을 가져온다. 따라서, 재조합 산생에 있어서의 다중 특이성 항원 결합 분자의 수량 및 순도를 개선하기 위해서, 소망의 폴리펩티드의 회합을 촉진하는 개변을 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인 중에 도입하는 것은 유리해진다.

[1142] 따라서, 특정의 태양에 있어서, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인은, Fc 도메인의 제 1 서브유닛과 제 2 서브유닛의 회합을 촉진하는 개변을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 서브유닛 사이에서의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는, Fc 도메인의 CH3 도메인 중에 있다. 따라서, 하나의 태양에 있어서, 해당 개변은 Fc 도메인의 CH3 도메인 중에 있다.

[1143] 특정의 태양에 있어서, 해당 개변은, Fc 도메인의 2개 서브유닛의 한쪽에 있어서의 「노브」 개변과, Fc 도메인의 2개의 서브유닛의 다른 한쪽에 있어서의 「홀」 개변을 포함하는, 이른바 「노브-인투-홀」 개변이다. 노브-인투-홀 테크놀로지는, 예를 들어, 미국 특허 제5,731,168호; 미국 특허 제7,695,936호; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996); 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 기재되어 있다. 일반적으로, 방법은, 돌기(「노브」)가 공극(「홀」) 중에 위치하여, 헤테로이량체의 형성을 촉진하고 또한 호모이량체의 형성을 방해할 수 있도록, 돌기를 제 1 폴리펩티드의 계면에, 및 대응하는 공극을 제 2 폴리펩티드의 계면에 도입하는 단계를 수반한다. 돌기는, 제 1 폴리펩티드의 계면의 작은 아미노산 측쇄를, 보다 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 치환하는 것에 의해 구축된다. 돌기와 동일한 또는 마찬가지의 사이즈의 보상적인 공극은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 치환하는 것에 의해 제 2 폴리펩티드의 계면에 만들어진다.

[1144] 따라서, 특정의 태양에 있어서는, 다중 특이성 항원 결합 분자의 Fc 도메인의 제 1 서브유닛의 CH3 도메인에 있어서, 아미노산 잔기는, 보다 큰 측쇄 체적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되고, 그것에 의해, 제 2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 공극 중에 위치할 수 있는 제 1 서브유닛의 CH3 도메인 내의 돌기가 생성되고, Fc 도메인의 제 2 서브유닛의 CH3 도메인에 있어서, 아미노산 잔기는, 보다 작은 측쇄 체적을 갖는 아미노산 잔기로 치환되고, 그것에 의해, 제 1 서브유닛의 CH3 도메인 내의 돌기가 위치할 수 있는 제 2 서브유닛의 CH3 도메인 내의 공극이 생성된다.

[1145] 돌기 및 공극은, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 예를 들어 부위 특이적 변이 유발에 의해 변경하는 것에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해, 만들 수 있다.

[1146] 특정의 태양에 있어서, Fc 도메인의 제 1 서브유닛의 CH3 도메인에 있어서, 366위의 트레오닌 잔기는, 트립토판 잔기로 치환되고(T366W), Fc 도메인의 제 2 서브유닛의 CH3 도메인에 있어서, 407위의 티로신 잔기는, 발린 잔기로 치환된다(Y407V). 하나의 태양에 있어서, Fc 도메인의 제 2 서브유닛에 있어서, 추가로, 366위의 트레오닌 잔기는, 세린 잔기로 치환되고(T366S), 368위의 류신 잔기는, 알라닌 잔기로 치환된다(L368A).

[1147] 한편 추가적인 태양에 있어서, Fc 도메인의 제 1 서브유닛에 있어서, 추가로, 354위의 세린 잔기는, 시스테인 잔기로 치환되고(S354C), Fc 도메인의 제 2 서브유닛에 있어서, 추가로, 349위의 티로신 잔기는, 시스테인 잔기에 의해 치환된다(Y349C). 이들 2개의 시스테인 잔기의 도입은, Fc 도메인의 2개의 서브유닛 사이에 다이설파이드 가교의 형성을 가져와, 이량체를 더 안정화한다(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

[1148] 다른 태양에 있어서, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자에는, 소망의 조합을 갖는 H쇄 사이 및 L쇄 H쇄 사

이의 회합을 촉진하기 위한 다른 기술을 적용할 수 있다.

[1149] 예를 들어, 다중 특이성 항체의 회합에는, 항체 H쇄의 제 2 정상 영역 또는 제 3 정상 영역(CH2 또는 CH3)의 계면에 정전기적 반발을 도입하는 것에 의해 바람직하지 않은 H쇄 회합을 억제하는 기술을 적용할 수 있다(WO2006/106905).

[1150] CH2 또는 CH3의 계면에 정전기적 반발을 도입하는 것에 의해 의도하지 않은 H쇄 회합을 억제하는 기술에 있어서, H쇄의 다른 쪽의 정상 영역의 계면에서 접촉하는 아미노산 잔기의 예에는, CH3 영역에 있어서의 EU 넘버링 위치 356위, 439위, 357위, 370위, 399위, 및 409위의 잔기에 대응하는 영역이 포함된다.

[1151] 보다 구체적으로는, 2종의 H쇄 CH3 영역을 포함하는 항체로서, 제 1 H쇄 CH3 영역에 있어서의, 이하의 (1)~(3)에 나타내는 아미노산 잔기의 쌍으로부터 선택되는 1~3쌍의 아미노산 잔기가 동종의 전하를 갖는 항체를, 예로서 들 수 있다: (1) H쇄 CH3 영역에 포함되는, EU 넘버링 위치 356위 및 439위의 아미노산 잔기, (2) H쇄 CH3 영역에 포함되는, EU 넘버링 위치 357위 및 370위의 아미노산 잔기, 및 (3) H쇄 CH3 영역에 포함되는, EU 넘버링 위치 399위 및 409위의 아미노산 잔기.

[1152] 더욱이, 해당 항체는, 상기 제 1의 H쇄 CH3 영역과는 상이한 제 2 H쇄 CH3 영역에 있어서의 아미노산 잔기의 쌍이, 상기 (1)~(3)의 아미노산 잔기의 쌍으로부터 선택되고, 상기 제 1 H쇄 CH3 영역에 있어서 동종의 전하를 갖는 상기 (1)~(3)의 아미노산 잔기의 쌍에 대응하는 1~3쌍의 아미노산 잔기가, 상기 제 1 H쇄 CH3 영역에 있어서의 대응하는 아미노산 잔기와는 반대의 전하를 갖는 항체여도 된다.

[1153] 상기 (1)~(3)에 나타나는 각각의 아미노산 잔기는, 회합했을 때에 서로 접근하고 있다. 당업자이면, 소망의 H쇄 CH3 영역 또는 H쇄 정상 영역에 있어서, 시판되는 소프트웨어를 이용한 호몰로지 모델링 등에 의해, 상기 (1)~(3)의 아미노산 잔기에 대응하는 위치를 발견할 수 있고, 적절히, 이들 위치의 아미노산 잔기를 개변에 제공하는 것이 가능하다.

[1154] 상기 항체에 있어서, 「전하를 갖는 아미노산 잔기」는, 예를 들어, 이하의 군 중 어느 하나에 포함되는 아미노산 잔기로부터 선택되는 것이 바람직하다:

[1155] (a) 글루타민산(E) 및 아스파라긴산(D), 및

[1156] (b) 리신(K), 아르기닌(R), 및 히스티딘(H).

[1157] 상기 항체에 있어서, 어구 「동일한 전하를 갖는」이란, 예를 들어, 2개 이상의 아미노산 잔기의 모두가, 상기의 군(a) 및 (b) 중 어느 하나에 포함되는 아미노산 잔기로부터 선택되는 것을 의미한다. 어구 「반대의 전하를 갖는」이란, 예를 들어, 2개 이상의 아미노산 잔기 중 적어도 1개의 아미노산 잔기가, 상기의 군(a) 및 (b) 중 어느 하나에 포함되는 아미노산 잔기로부터 선택되는 경우에, 나머지의 아미노산 잔기가 다른 군에 포함되는 아미노산 잔기로부터 선택되는 것을 의미한다.

[1158] 바람직한 태양에 있어서 상기 항체는, 그 제 1 H쇄 CH3 영역과 제 2 H쇄 CH3 영역이 다이설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 된다.

[1159] 본 개시에 있어서, 개변에 제공하는 아미노산 잔기는, 전술한 항체 가변 영역 또는 항체 정상 영역의 아미노산 잔기에 한정되지 않는다. 당업자이면, 변이 폴리펩티드 또는 이종 다량체에 있어서, 시판되는 소프트웨어를 이용한 호몰로지 모델링 등에 의해, 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 동정할 수 있고, 그 다음에 이들 위치의 아미노산 잔기를, 회합을 제어하도록 개변에 제공하는 것이 가능하다.

[1160] 더하여, 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 형성에는 다른 공지 기술을 이용할 수도 있다. 항체의 한쪽의 H쇄 CH3의 일부를 대응하는 IgA 유래의 서열로 바꾸고, 대응하는 IgA 유래의 서열을 다른 쪽의 H쇄 CH3의 상보적인 부분에 도입하는 것에 의해 생성된 쇄교환 엔지니어링 도메인 CH3(strand-exchange engineered domain CH3)을 이용하여, 상이한 서열을 갖는 폴리펩티드의 회합을 CH3의 상보적인 회합에 의해 효율적으로 유도할 수 있다(Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010). 이 공지 기술을 이용하여 효율적으로 목적하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 형성시킬 수도 있다.

[1161] 더하여, 다중 특이성 항원 결합 분자의 형성에는, WO2011/028952, WO2014/018572 및 Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8에 기재되는 바와 같은 항체의 CH1과 CL의 회합 및 VH와 VL의 회합을 이용한 항체 제조 기술, WO2008/119353 및 WO2011/131746에 기재되는 바와 같은 따로따로 조제한 모노클로날 항체를 조합하여 사용하여

이중 특이성 항체를 제조하는 기술(Fab Arm Exchange), WO2012/058768 및 WO2013/063702에 기재되는 바와 같은 항체 중쇄 CH3 사이의 회합을 제어하는 기술, WO2012/023053에 기재되는 바와 같은 2종류의 경쇄와 1종류의 중쇄로부터 구성되는 다중 특이성 항체를 제조하는 기술, Christoph 등(Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013))에 의해 기재되는 바와 같은 1개의 H쇄와 1개의 L쇄를 포함하는 항체의 편쇄를 각각 발현하는 2개의 세균 세포주를 이용한 다중 특이성 항체를 제조하는 기술 등을 이용해도 된다.

[1162] 혹은, 목적하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 효율적으로 형성시킬 수 없는 경우에도, 산생된 분자로부터 목적하는 다중 특이성 항원 결합 분자를 분리하여 정제하는 것에 의해, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자를 얻는 것이 가능하다. 예를 들어, 2종류의 H쇄의 가변 영역에 아미노산 치환을 도입하는 것에 의해 등전점의 차이를 부여함으로써, 2종류의 호모체와 목적하는 헤테로 항체를 이온 교환 크로마토그래피로 정제하는 것을 가능하게 하는 방법이 보고되어 있다(WO2007114325). 헤테로 항체를 정제하는 방법으로서, 지금까지, 프로틴 A에 결합하는 마우스 IgG2a의 H쇄와 프로틴 A에 결합하지 않는 래트 IgG2b의 H쇄를 포함하는 헤테로2량화 항체를, 프로틴 A를 이용하여 정제하는 방법이 보고되어 있다(WO98050431 및 WO95033844). 더욱이, IgG와 프로틴 A의 결합 부위인 EU 넘버링 위치 435위 및 436위의 아미노산 잔기를, 다른 프로틴 A 친화성을 가져오는 아미노산인 Tyr, His 등으로 치환한 H쇄를 이용하여, 혹은, 다른 프로틴 A 친화성을 갖는 H쇄를 이용하여, 각 H쇄와 프로틴 A의 상호작용을 변화시키고, 그 다음에 프로틴 A 컬럼을 이용하는 것에 의해, 헤테로2량화 항체만을 효율적으로 정제할 수 있다.

[1163] 더욱이, 본 개시의 Fc 영역으로서, Fc 영역의 C말단의 헤테로제니티가 개선된 Fc 영역이 적절히 사용될 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 개시는, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 유래의 Fc 영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링에 의해 특정되는 446위의 글리신 및 447위의 리신을 결실시키는 것에 의해 생성된 Fc 영역을 제공한다.

[1164] 본 명세서에 있어서 기재되는 바와 같이 조제된 다중 특이성 항원 결합 분자는, 예를 들어, 고속 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기 영동, 어피니티 크로마토그래피, 및 사이즈 배제 크로마토그래피 등의 당 기술 분야에 있어서 공지된 기술에 의해 정제되어도 된다. 특정의 단백질을 정제하기 위해서 이용되는 실제의 조건은, 알짜 전하, 소수성, 친수성 등의 인자에 일부 의존하고, 당업자에게 분명하다. 어피니티 크로마토그래피 정제에서는, 다중 특이성 항원 결합 분자가 결합하는, 항체, 리간드, 수용체, 또는 항원을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 다중 특이성 항원 결합 분자의 어피니티 크로마토그래피 정제에서는, 프로틴 A 또는 프로틴 G를 갖는 매트릭스가 이용되어도 된다. 다중 특이성 항원 결합 분자를 단리하기 위해서, 연속한 프로틴 A 또는 G 어피니티 크로마토그래피 및 사이즈 배제 크로마토그래피를 이용할 수 있다. 다중 특이성 항원 결합 분자의 순도는, 겔 전기 영동 및 고압 액체 크로마토그래피 등을 포함하는, 다양한 주지된 분석 방법의 어느 하나에 의해 결정할 수 있다.

[1165] 항체 의존성 세포 매개성 세포 상해

[1166] 「항체 의존성 세포 매개성 세포 상해」 또는 「ADCC」는, 분비된 Ig가 특정의 세포 상해성 세포(예를 들어, NK 세포, 호중구 및 매크로파지) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합하고 그것에 의해 이들 세포 상해성 이펙터 세포가 항원을 갖는 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있고 그리고 그 후에 그 표적 세포를 세포독에 의해 살상할 수 있게 되는, 세포 상해의 한 형태를 가리킨다. ADCC를 매개하는 프라이머리 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하고, 단구는 FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR의 발현은, Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)의 제464페이지의 표 3에 정리되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, in vitro ADCC 측정법, 예를 들어 미국 특허 제5,500,362호 혹은 제5,821,337호 또는 미국 특허 제6,737,056호(Presta)에 기재된 것이 실시될 수 있다. 그와 같은 측정법으로 유용한 이펙터 세포는, PBMC 및 NK세포를 포함한다. 혹은 또는 더하여, 목적하는 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어 Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)에 개시되는 동물 모델과 같은 동물 모델에 있어서, in vivo로 평가되어도 된다.

[1167] 보체 의존성 세포 상해

[1168] 「보체 의존성 세포 상해」 또는 「CDC」는, 보체의 존재하에서의 표적 세포의 용해를 가리킨다. 고전적 보체 경로의 활성화는, (적절한 서브클래스의) 항체(대응하는 항원에 결합하고 있다)로의 보체계의 제 1 요소(C1q)의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)에 기재된 CDC 측정법이 실시될 수 있다. 개변된 Fc 영역 아미노산 서열을 수반하는 폴리펩티드 배리언트(배리언트 Fc 영역을 수반하는 폴리펩티드) 및 증가 또는 감소된 C1q 결합능은, 예를 들어,

미국 특허 제6,194,551호 B1 및 WO1999/51642에 기재되어 있다. 예를 들어, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)도 참조.

[1169] T 세포 의존성 세포 상해

[1170] 「T 세포 의존성 세포 상해」 또는 「TDCC」는, 표적 세포에 대한 세포 상해가 T 세포에 의해 유도되도록, 항원 결합 분자가, 표적 세포 상에 발현하고 있는 항원과 T 세포 상에 발현하고 있는 다른 항원의 양쪽에 결합하여, T 세포를 표적 세포의 근처에 리다이렉팅하는, 세포 상해의 형태를 가리킨다. T 세포 의존성 세포 상해를 평가하기 위한 방법인, in vitro TDCC 어세이는, 본 명세서의 「T 세포 의존성 세포 상해의 측정」의 섹션에서도 설명된다.

[1171] T 세포 의존성 세포 상해의 측정

[1172] 항원 결합 분자가 CLDN6 및 CD3/CD137의 양쪽에 결합하는 태양에 있어서, 본 개시의 항원 결합 분자를, 본 개시의 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 부위가 결합하는 CLDN6 발현 세포와 접촉시키는 것에 의해 야기되는 T 세포 의존성 세포 상해(TDCC)를 평가 또는 결정하기 위한 방법으로서, 바람직하게는, 이하에 기재하는 방법이 이용된다. 세포 상해 활성을 in vitro로 평가 또는 결정하기 위한 방법에는, 세포 상해성 T 세포 등의 활성을 결정하기 위한 방법이 포함된다. T 세포 매개성 세포 상해를 유도하는 활성을 본 개시의 항원 결합 분자가 갖는지 여부는, 공지된 방법에 의해 결정할 수 있다(예를 들어, Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)를 참조). 세포 상해 어세이에 있어서, CLDN6과 상이하고 또한 세포에 있어서 발현하고 있지 않는 항원과, CD3/CD137에 결합할 수 있는 항원 결합 분자가, 대조 항원 결합 분자로서 이용된다. 대조 항원 결합 분자는 동일하게 어세이된다. 그 다음에, 활성은, 본 개시의 항원 결합 분자가, 대조 항원 결합 분자의 것보다 강한 세포 상해 활성을 나타내는지 여부를 시험하는 것에 의해 평가된다.

[1173] 한편, in vivo 항종양 효과는, 예를 들어, 이하의 수법에 의해, 평가 또는 결정된다. 본 개시의 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 부위가 결합하는 항원을 발현하는 세포는, 비인간 동물 대상으로 피내 또는 피하 이식된다. 그 다음에, 이식한 날로부터 또는 그 후, 피험 항원 결합 분자가, 정맥내 또는 복막강내에 매일 또는 수일 간격으로 투여된다. 종양 사이즈는 경시적으로 측정된다. 종양 사이즈의 변화의 차이는 세포 상해 활성으로서 정의할 수 있다. in vitro 어세이와 마찬가지로, 대조 항원 결합 분자가 투여된다. 종양 사이즈가, 대조 항원 결합 분자가 투여된 군의 것보다, 본 개시의 항원 결합 분자가 투여된 군에서 작은 경우에, 본 개시의 항원 결합 분자는, 세포 상해 활성을 갖는다고 판단할 수 있다.

[1174] 항원 결합 분자의 항원 결합 부위가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 억제하는 본 개시의 항원 결합 분자와의 접촉의 작용을 평가 또는 결정하기 위해서, 바람직하게는, MTT법 및 세포 내로의 아이소토프 표지 티미딘 흡수의 측정이 이용된다. 한편, in vivo로 세포 증식을 억제하는 활성을 평가 또는 결정하기 위해서, 바람직하게는, in vivo 세포 상해 활성을 평가 또는 결정하기 위한 상기에 기재된 동일한 방법을 이용할 수 있다.

[1175] 본 개시의 항체 또는 항원 결합 분자의 TDCC는, 당 기술 분야에서 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, TDCC는, 락트산 탈수소산소(LDH) 방출 어세이에 의해 측정할 수 있다. 이 어세이에서는, 표적 세포(예를 들어, CLDN6 발현 세포)를 피험 항체 또는 항원 결합 분자의 존재하에서 T 세포(예를 들어, PBMC)와 함께 인큐베이트하고, T 세포에 의해 살상된 표적 세포로부터 방출된 LDH의 활성을, 적절한 시약을 이용하여 측정한다. 전형적으로는, 세포 상해 활성은, (예를 들어, Triton-X에서의 처리에 의해 용해된) 표적 세포의 100%의 사멸에 의해 생긴 LDH 활성에 대한, 항체 또는 항원 결합 분자와의 인큐베이션에 의해 생긴 LDH 활성의 비율로서 산출된다. 전술한 바와 같이 산출된 세포 상해 활성이 보다 높은 경우, 피험 항체 또는 항원 결합 분자는, 보다 높은 TDCC를 갖는다고 판정된다.

[1176] 더하여 또는 그 대신에, 예를 들어, TDCC는, 리얼타임 세포 증식 저해 어세이에 의해 측정할 수도 있다. 이 어세이에서는, 96웰 플레이트에 있어서, 표적 세포(예를 들어, CLDN6 발현 세포)를 피험 항체 또는 항원 결합 분자의 존재하에서 T 세포(예를 들어, PBMC)와 함께 인큐베이트하고, 당 기술 분야에서 공지된 방법에 의해, 예를 들어 적절한 분석 기기(예를 들어, xCELLigence 리얼타임 세포 분석 장치)를 이용하는 것에 의해, 표적 세포의 증식을 모니터한다. 세포 증식 저해율 (CGI: %)을, CGI (%) = 100 - (CI_{Ab}×100 / CI_{NoAb})로서 주어지는 식에 따라, Cell Index로부터 결정한다. 「CI_{Ab}」는, 특정의 실험 시간에 있어서의, 항체 또는 항원 결합 분자 있음의 웰의 Cell Index를 나타내고, 「CI_{NoAb}」는, 항체 또는 항원 결합 분자 없음의 웰의 평균 Cell Index를 나타낸다. 항체 또는 항원 결합 분자의 CGI율이 높은, 즉 유의한 양의 값을 갖는 경우, 그 항체 또는 항원 결

합 분자는 TDCC 활성을 갖는다고 할 수 있다.

[1177] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 항체 또는 항원 결합 분자는 T 세포 활성화 활성을 갖는다. T 세포 활성화는, 그 활성화에 응답하여 리포터 유전자(예를 들어, 루시페라제)를 발현하는 개변 T 세포주(예를 들어, Jurkat/NFAT-RE 리포터 세포주(T 세포 활성화 바이오어세이, Promega))를 이용하는 방법 등의, 당 기술 분야에서 공지된 방법에 의해 어세이할 수 있다. 이 방법에서는, 표적 세포(예를 들어, CLDN6 발현 세포)를 피험 항체 또는 항원 결합 분자의 존재하에서 T 세포와 함께 배양하고, 그 다음에 리포터 유전자의 발현 산물의 레벨 또는 활성을, T 세포 활성화의 지표로서 적절한 방법에 의해 측정한다. 리포터 유전자가 루시페라제 유전자인 경우, 루시페라제와 그 기질의 반응에 의해 생긴 발광을, T 세포 활성화의 지표로서 측정할 수 있다. 상기와 같이 측정된 T 세포 활성화가 보다 높은 경우, 피험 항체 또는 항원 결합 분자는, 보다 높은 T 세포 활성화 활성을 갖는다고 판정된다.

[1178] 하나의 국면에 있어서, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체는, 대조가 되는 다중 특이성 항체와 비교하여, 동등 또는 보다 높은(즉 그 이상의) 세포 상해 활성을 나타낸다. 세포 상해 활성의 측정 및 비교, 및 동등 또는 보다 높은(즉 그 이상의) 세포 상해 활성을 나타내는지 여부의 판정은, 상기 「T 세포 의존성 세포 상해의 측정」의 섹션에 기재되었던 바와 같이 행할 수 있다. 특정의 태양에 있어서, 대조가 되는 다중 특이성 항체는, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체와, 제 1 항원 결합 부분이 CD3에만 결합할 수 있는 점을 제외하고, 구조가 동일한 다중 특이성 항체이다. 특정의 태양에 있어서, 대조가 되는 다중 특이성 항체는, 서열 번호: 194의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 192의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 T 세포 수용체 복합체에 결합할 수 있는 항원 결합 부분 및 서열 번호: 193의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 195의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 CLDN6에 결합할 수 있는 항원 결합 부분을 포함하는 다중 특이성 항체(CS3348)이다.

[1179] 의약 조성물

[1180] 하나의 국면에 있어서, 본 개시는, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, T 세포 의존성 세포 상해를 유도하고, 바꾸어 말하면, 본 개시의 의약 조성물은, 세포 상해를 유도하기 위한 치료제이다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 암의 치료 및/또는 예방에 이용되는 의약 조성물이다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간장암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 정소암, 유방암, 자궁경암, 식도암, 췌장암, 담관암, 신장암, 두경부암, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양(AT/RT)을 포함하는, CLDN6 양성 암 또는 CLDN6 발현 암; 및 다른 CLDN6 양성 암 또는 CLDN6 발현 암의 치료 및/또는 예방에 이용되는 의약 조성물이다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 세포 증식 억제제(세포 증식 저해제)이다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은 항암제이다. 특정의 태양에 있어서, 본 개시의 의약 조성물은, 세포 상해 유도제, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역 응답 활성화제, 암 치료제 또는 암 예방제이다.

[1181] 본 개시의 의약 조성물, 본 개시의 세포 상해를 유도하기 위한 치료제, 세포 증식 억제제, 세포 상해 유도제, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역 응답 활성화제, 암 치료제, 암 예방제, 또는 항암제는, 필요에 따라서, 다양한 종류의 항원 결합 분자 또는 항체와 함께 제제화할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 복수의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체의 칵테일에 의해, 항원을 발현하는 세포에 대한 세포 상해 작용을 증강시킬 수 있다.

[1182] 본 명세서에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체를 포함하는 의약 조성물은, 소망의 순도를 갖는 항원 결합 분자 또는 항체를, 1개 또는 복수의 임의의 약학적으로 허용되는 담체(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하는 것에 의해, 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로, 조제된다. 약학적으로 허용되는 담체는, 대체로, 이용될 때의 투여량 및 농도에서는 레시피언트에 대해서 비독성이며, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 이하의 것을 포함한다: 인산염, 시트르산염, 및 다른 유기산 등의 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는, 항산화제; 보존료(옥타데실다이메틸벤질 염화 암모늄; 염화 헥사메토늄; 염화 벤잘코늄; 염화 벤제토늄; 페놀, 뷰틸, 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르신올; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸 등); 저분자(약 10잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린 등의 단백질; 폴리바이닐 피롤리돈 등의 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신 등의 아미노산; 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는, 단당, 이당, 및 다른 탄수화물; EDTA 등의 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스, 소르비톨 등의, 사

탕류; 나트륨 등의 염 형성 짝이온류; 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 등의 비이온계 표면 활성제. 본 명세서의 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는, 추가로 가용성 중성 활성형 하이알루로니다제 당단백질(sHASEGP)(예를 들어, rHuPH20(HYLENEX(등록상표), Baxter International, Inc.) 등의 인간 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질) 등의 간질성 약제 분산제를 포함한다. 특정의 예시적 sHASEGP 및 그 사용 방법은(rHuPH20을 포함한다), 미국 특허출원공개 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 하나의 국면에 있어서, sHASEGP는, 콘드로이티나제 등의 1개 또는 복수의 추가적인 글리코사미노글리카나제와 조합된다.

[1183] 예시적인 동결건조 항체 제제는, 미국 특허 제6,267,958호에 기재되어 있다. 수용액 항체 제제는, 미국 특허 제6,171,586호 및 WO2006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충액을 포함하고 있다.

[1184] 본 명세서의 제제는, 치료되는 특정의 적응증을 위해서 필요하면 하나보다 많은 유효 성분을 포함해도 된다. 서로 악영향을 주지 않는 상보적인 활성을 수반하는 것이 바람직하다. 이와 같은 유효 성분은, 의도된 목적을 위해서 유효한 양으로, 호적하게 조합되어 존재한다.

[1185] 필요에 따라서, 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체는, 마이크로캡슐(하이드록시메틸셀룰로스, 젤라틴, 폴리[메틸 메타크릴레이트] 등으로 제작된 마이크로캡슐) 중에 봉입해도 되고, 콜로이드 약물 송달계(리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노입자, 및 나노캡슐)의 구성 성분으로 해도 된다(예를 들어, 「Remington's Pharmaceutical Science 16th edition」, Oslo Ed.(1980)를 참조). 더욱이, 약제를 서방성 약제로서 조제하기 위한 방법도 공지되어 있으며, 이들은 본 개시의 항원 결합 분자에 적용할 수 있다(J. Biomed. Mater. Res.(1981) 15, 267-277; Chemtech.(1982) 12, 98-105; 미국 특허 제3773719호; 유럽 특허출원(EP) 번호 EP58481 및 EP133988; Biopolymers(1983) 22, 547-556).

[1186] 필요에 따라서, 본 개시의 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체를 대상 내에서 직접 발현시키기 위해서, 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를, 대상에게 도입해도 된다. 사용하는 것이 가능한 벡터의 예로서는, 아데노바이러스이지만, 이것으로 한정되지 않는다. 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자를 대상에게 직접 투여하는 것, 또는 일렉트로포레이션을 개재시켜 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자를 대상에게 이입하는 것, 또는 발현 및 분비시켜야 할 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 세포를 대상에게 투여하여, 대상에 있어서 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체를 연속적으로 발현 및 분비시키는 것도 가능하다.

[1187] 본 개시의 의약 조성물, 세포 증식 억제제, 또는 항암제는, 경구 또는 비경구의 어느 것으로 환자에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 비경구 투여로 환자에게 투여되고, 구체적으로는, 그와 같은 투여법에는, 주사, 경비 투여, 경폐 투여, 및 경피 투여가 포함된다. 주사에는, 예를 들어, 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 및 피하 주사가 포함된다. 예를 들어, 본 개시의 의약 조성물, 세포 상해를 유도하기 위한 치료제, 세포 증식 억제제, 또는 항암제는, 주사에 의해 국소적으로 또는 전신적으로 투여할 수 있다. 더욱이, 적절한 투여 방법이 환자의 연령 및 증상에 따라서 선택될 수 있다. 투여 용량은, 예를 들어, 각 투여에 대해 체중 1kg당 0.0001mg~1,000mg의 범위로부터 선택할 수 있다. 혹은, 용량은, 예를 들어, 1환자당 0.001mg~100,000mg의 범위로부터 선택할 수 있다. 그렇지만, 본 개시의 의약 조성물의 용량은, 이들 용량으로 한정되지 않는다.

[1188] 바람직하게는, 본 개시의 의약 조성물은, 본 명세서에 있어서 기재되는 바와 같은 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체를 포함한다. 하나의 국면에 있어서, 조성물은, 세포 상해를 유도하는 것에 있어서 사용하기 위한 의약 조성물이다. 다른 국면에 있어서, 조성물은, 암을 치료 또는 예방하는 것에 있어서 사용하기 위한 의약 조성물이다. 바람직하게는, 암은 CLDN6 발현 암이다. 본 개시의 의약 조성물은, 암을 치료 또는 예방하기 위해서 이용할 수 있다. 따라서, 본 개시는, 그 필요가 있는 환자에게 본원 명세서에 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 항체가 투여되는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[1189] 본 개시는 또한, CLDN6을 발현하는 세포를, CLDN6에 결합하는 본 개시의 항원 결합 분자와 접촉시키는 것에 의해, CLDN6을 발현하는 세포 또는 CLDN6 양성 암을 손상하기 위한, 또는 세포 증식을 억제하기 위한 방법도 제공한다. 본 개시의 항원 결합 분자가 결합하는 세포는, 그것이 CLDN6을 발현하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는, 본 개시에 있어서, 바람직한 CLDN6 발현 암 또는 CLDN6 양성 암에는, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간장암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 정소암, 유방암, 자궁경암, 식도암, 췌장암, 담관암, 신장암, 두경부암, 대장암, 방광암, 또는 비정형 기형종양 라브도이드 종양(AT/RT)이 포함된다.

[1190] 본 개시에 있어서, 「접촉」은, 예를 들어, in vitro로 배양된 CLDN6을 발현하는 세포의 배지에 본 개시의 항원 결합 분자를 첨가하는 것에 의해 행할 수 있다. 이 경우, 첨가해야 할 항원 결합 분자는, 용액, 또는 동결건조 등에 의해 조제된 고체 등의 적절한 형태로 이용할 수 있다. 본 개시의 항원 결합 분자를 수용액으로서 첨가하는 경우, 해당 용액은, 항원 결합 분자를 단독으로 함유하는 순수한 수용액, 또는 예를 들어 상기의 계면활성제, 부형제, 착색제, 착향제, 보존제, 안정화제, 완충제, 현탁제, 등장화제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 유동성 촉진제, 및 교미제를 함유하는 용액이어도 된다. 첨가 농도는 특별히 한정되지 않는다; 그렇지만, 배지 중의 최종 농도는, 바람직하게는 1pg/ml～1g/ml의 범위 내, 보다 바람직하게는 1ng/ml～1mg/ml, 및 보다 더 바람직하게는 1μg/ml～1mg/ml의 범위 내이다.

[1191] 본 개시의 다른 태양에 있어서, 「접촉」은 또한, in vivo로 CLDN6 발현 세포가 이식된 비인간 동물, 또는 CLDN6을 내인적으로 발현하는 암 세포를 갖는 동물에게 투여하는 것에 의해 행할 수도 있다. 투여 방법은, 경구 또는 비경구이면 되고, 비경구 투여가 특히 바람직하다. 구체적으로는, 비경구 투여 방법에는, 주사, 경비 투여, 경폐 투여, 및 경피 투여가 포함된다. 주사에는, 예를 들어, 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 및 피하 주사가 포함된다. 예를 들어, 본 개시의 의약 조성물, 세포 상해를 유도하기 위한 치료제, 세포 증식 억제제, 또는 항암제는, 주사에 의해 국소 투여 또는 전신 투여할 수 있다. 더욱이, 적절한 투여 방법은, 동물 대상의 연령 및 증상에 따라서 선택할 수 있다. 항원 결합 분자를 수용액으로서 투여하는 경우, 해당 용액은, 항원 결합 분자를 단독으로 함유하는 순수한 수용액, 또는 예를 들어 상기의 계면활성제, 부형제, 착색제, 착향제, 보존제, 안정화제, 완충제, 현탁제, 등장화제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 유동성 촉진제, 및 교미제를 함유하는 용액이어도 된다. 투여 용량은, 예를 들어, 각 투여에 대해 체중 1kg당 0.0001～1,000mg의 범위로부터 선택할 수 있다. 혹은, 용량은, 예를 들어, 각 환자에 대해 0.001～100,000mg의 범위로부터 선택할 수 있다. 그렇지만, 본 개시의 항원 결합 분자의 용량은, 이들 예로 한정되지 않는다.

[1192] 의약 제제, 의약 조성물

[1193] 용어 「의약 제제」 또는 「의약 조성물」은, 그 중에 포함된 유효 성분의 생물학적 활성이 효과를 발휘할 수 있는 형태에 있는 조제물로서, 또한 제제가 투여되는 대상에게 허용할 수 없을 정도로 독성이 있는 추가의 요소를 포함하지 않은, 조제물을 가리킨다.

[1194] 약학적으로 허용되는 담체

[1195] 「약학적으로 허용되는 담체」는, 대상에 대해서 무독인, 의약 제제 중의 유효 성분 이외의 성분을 가리킨다. 약학적으로 허용되는 담체는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 완충액, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함한다.

[1196] 치료

[1197] 본 명세서에서 이용되는 「치료」(및, 그 문법상의 파생어, 예를 들어 「치료하는」, 「치료하는 것」 등)는, 치료되는 개체의 자연 경과를 개변하는 것을 기도한 임상적 개재를 의미하고, 예방을 위해서도, 임상적 병태의 경과 동안에도 실시될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 질환의 발생 또는 재발의 방지, 증상의 경감, 질환에 의한 임의의 직접적 또는 간접적인 병리적 영향의 감약, 전이의 방지, 질환의 진행 속도의 저감, 질환 상태의 회복 또는 완화, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다. 몇몇 태양에 있어서, 본 개시의 항원 결합 분자 또는 항체는, 질환의 발증을 늦추거나, 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해서 이용된다.

[1198] 몇몇 태양에 있어서, 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 암을 치료하는 것을 포함하는, 특히 암 치료 중 또는 암 치료 후의, 암 화학요법 내성, 암 재발 또는 암 전이를 예방하는 방법에 관한 것이다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「치료」는, 본 발명의 항암제 또는 의약 조성물을 이용한 단제 투여 혹은 병용 요법에 의해, 개체의 암 세포수가 감소하는 것, 암 세포의 증식이 억제되는 것, 종양의 사이즈가 감소하는 것, 말초 기관으로의 암 세포의 침윤을 억제하는 것, 암 세포의 전이를 억제하는 것, 또는 암에 기인하는 다양한 증상이 개선되는 것을 의미한다. 또한, 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「예방」은, 감소된 암 세포가 재차 증식하는 것에 의한 암 세포수의 증가를 방지하는 것, 증식이 억제된 암 세포의 재증식을 방지하는 것, 감소된 종양의 사이즈가 재차 증대하는 것을 방지하는 것을 의미한다.

[1199] 암

[1200] 용어 「암」 및 「암성」은, 조절되지 않는 세포 성장/증식에 의해 전형적으로 특징지어지는 포유동물에 있어서

의 생리학적 상태를 가리키는 또는 설명하는 것이다.

[1201] 본 명세서에 기재의 「암」은, 난소암, 위암 등의 표피성의 악성 종양뿐만 아니라, 만성 림프성 백혈병이나 호지킨 림프종 등의 조혈기암을 포함하는 비표피성의 악성 종양도 의미하는 것으로 하고, 본 명세서에 있어서, 「암(cancer)」, 「암(carcinoma)」, 「종양(tumor)」, 「신생물(neoplasm)」 등의 용어는 서로 구별되지 않고, 서로 교환 가능하다. 또한, 본 명세서의 일 실시형태에 있어서, 원발 암, 진행 암, 전이 암, 재발 암 또는 그들의 조합을 포함한다.

[1202] 특정의 태양에 있어서, 암은, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간장암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 정소암, 유방암, 자궁경암, 식도암, 췌장암, 담관암, 신장암, 두경부암, 대장암, 방광암, 비정형 기형종양 라브도이드 종양(AT/RT)을 포함하는 CLDN6 발현 암 또는 CLDN6 양성 암; 및 다른 CLDN6 양성 암 또는 CLDN6 발현 암이다.

[1203] 종양

[1204] 용어 「종양」은, 악성인지 양성인지에 상관 없이, 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전(前)암성 및 암성 세포 및 조직을 가리킨다. 용어 「암」, 「암성」, 「세포 증식성 장애」, 「증식성 장애」 및 「종양」은, 본 명세서에서 말하는 경우, 서로 배타적이지 않다.

[1205] 전이

[1206] 「전이」란, 암 세포가 최초로 발생한 장소로부터, 혈관이나 림프관에 숨어들어가서, 혈액이나 림프액의 흐름을 타고 다른 장기나 기관으로 이동하여, 거기에서 증가하는 것을 가리킨다. 「파종」이란, 암이 생긴 장기로부터 암 세포가 박락되어, 근접하는 체내의 공간, 예를 들어 흉강이나 복강에 퍼지는 것을 가리킨다. 특정의 태양에 있어서는, 「복막으로 전이된」이란, 복강 내를 덮는 복막에 암 세포가 복막 파종되어 퍼진 것을 말한다. 예를 들어, 「난소암이 복막으로 전이된」이란 난소로부터 골반 외로의 복막 파종성 전이에 의해 난소암 세포가 복막으로 진전되어 뿌려진 것처럼 퍼져 있는 것을 의미한다. 복막으로 전이된 암 세포는, 예를 들어 환자의 복수 중에 존재한다.

[1207] 특정의 태양에 있어서, 암은 복막으로 전이된 암이다. 또한, 특정의 태양에 있어서, 암은 복막 파종된 암이다.

[1208] 병용 요법

[1209] 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자는, 치료에 있어서 1개 또는 복수의 다른 제와의 조합으로 투여되어도 된다. 예를 들어, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 적어도 하나의 추가의 치료제와 동시 투여되어도 된다. 또한, 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 적어도 하나의 추가의 치료제의 전후에 투여되어도 된다.

[1210] 본 명세서에서 사용되는 경우, 요법의 투여에 관련하여 「병용」이라고 하는 용어는, 하나보다 많은 요법 또는 치료약의 사용을 가리킨다. 「조합하여」라고 하는 용어의 사용은, 요법 또는 치료약을 대상에게 투여하는 순서를 한정하지 않는다. 요법 또는 치료약은, 2번째의 요법 또는 치료약의 대상으로의 투여 전, 투여와 동시 또는 투여 후에 투여할 수 있다. 바람직하게는, 요법 또는 치료약을, 요법 또는 치료약이 함께 작용할 수 있는 순서, 양 및/또는 시간 간격 내에서 대상에게 투여한다. 특정의 실시형태에서는, 요법 또는 치료약을, 그들을 다른 방법으로, 특히 서로 독립적으로 투여했을 경우보다도 높은 이익을 제공하는 순서, 양 및/또는 시간 간격 내에서 대상에게 투여한다. 바람직하게는, 높은 이익은 상승 효과이다.

[1211] 용어 「치료제」는, 그와 같은 치료의 필요가 있는 개체에 있어서 증상 또는 질환을 치료하기 위해서 투여되는 임의의 제를 포함한다. 그와 같은 추가 치료제는, 치료되는 특정의 적응증에 적합한 임의의 유효 성분, 바람직하게는, 서로 악영향을 주지 않는 상보적인 활성을 수반하는 것을 포함할 수 있다. 특정의 태양에 있어서, 추가 치료제는, 면역 조절제, 세포 분열 저해제, 세포 접착의 저해제, 세포 상해제, 세포 아포토시스의 활성화제, 또는 아포토시스 유도 인자에 대한 세포의 감수성을 증가시키는 제이다. 특정의 태양에 있어서, 추가 치료제는, 항암제, 예를 들어, 미소관파괴제, 항대사제, 토포아이소메라제 저해제, DNA 인터캘레이트제, 알킬화제, 호르몬 요법, 키나제 저해제, 수용체 안타고니스트, 종양 세포 아포토시스의 활성화제, 또는 항혈관 신생제이다.

[1212] 그와 같은 다른 제는, 의도된 목적을 위해서 유효한 양으로, 호적하게 조합하여 존재한다. 그와 같은 다른 제의 유효량은, 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 양, 장애 또는 치료의 종류, 및 위에서 논한 다른 요인에 의존한다. 다중 특이성 항원 결합 분자는 대체로, 본 명세서에 기재되는 바와 같은 투여량 및 투여 경로로, 또는 본 명세서에 기재되는 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 경험적/임상적으로 적절하다고 판단되는 임의의 투여

량 및 임의의 경로로 이용된다.

[1213] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 세포를 상해하는, 세포 증식을 억제하는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 다른 항암제의 단독 요법과 비교하여, 세포를 상해하는, 세포 증식을 억제하는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 효과가 높다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 세포를 상해하는, 세포 증식을 억제하는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역을 활성화하는, 암을 치료하는, 또는 암을 예방하는 상승 효과 또는 상가 효과를 갖는다.

[1214] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「유효량」은, 개체에 있어서의 질환을 치료 또는 예방하기 위해서 유효한 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 다른 치료제의 용량을 의미한다. 상기 질환은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 암이다. 암의 종류는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 CLDN6을 발현한 암 세포를 포함하는 종양이다.

[1215] 한편, 「유효량의 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 투여」란, 대상으로 하는 세포에 있어서 TGFβ를 유도하는 데 충분한 양의 TGFβ 유도제를 투여하는 것을 의미한다.

[1216] 또한, 「유효량의 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 투여」란, 대상으로 하는 세포에 있어서 CLDN6 발현을 유도하는 데 충분한 양의 CLDN6 발현 유도제를 투여하는 것을 의미한다.

[1217] 상기의 그와 같은 병용 요법은, 병용 투여(2종류 이상의 치료제가 동일한 또는 별도의 조성물 중에 포함되어 있다), 및 개별 투여를 포함한다. 개별 투여의 경우, 본 명세서에 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여가, 추가 치료제 및/또는 아주반트의 투여와 동시여도 되고, 상이해도 된다. 즉, 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여가 추가 치료제 및/또는 아주반트에 앞서 행해져도 되고, 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여가, 추가 치료제 및/또는 아주반트의 투여와 동시에 행해져도 되고, 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여가, 추가 치료제 및/또는 아주반트의 투여에 이어 행해져도 된다. 본 명세서에 있어서 기재되는 다중 특이성 항원 결합 분자는 또한, 방사선 요법과의 조합으로 이용할 수 있다.

[1218] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자를 사용하는 것에 의해, 적어도 하나의 다른 항암제에 의한 암의 치료 또는 예방에 있어서, 당해 적어도 하나의 다른 항암제의 치료 효과 또는 예방 효과를 증강시키는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제를 사용하는 것에 의해, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한 암의 치료 또는 예방에 있어서, 당해 다중 특이성 항원 결합 분자의 치료 효과 또는 예방 효과를 증강시키는 방법을 제공한다. 여기에서, 치료 효과 또는 예방 효과의 증강이란, 예를 들어, 치료의 성공률이 상승하는 것, 치료를 위해서 투여되는 항암제의 양이 저감되는 것, 및/또는, 항암제에 의한 치료 기간이 짧아지는 것을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시태양에 있어서는, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 제의, 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에 있어서 무증악 생존 기간을 증가시키는 방법을 제공한다.

[1219] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제의 투여를 포함한다. 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제는, 당 기술 분야에서 공지된 임의의 적절한 방법으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제를, 병행하여(즉 동시에), 및/또는 연속하여(즉 상이한 시점에서) 투여할 수 있다. 예를 들어, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 2종류 이상의 다른 항암제(예를 들어, 제 1 다른 항암제와 제 2 다른 항암제)가 조합되어 이용되는 경우, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 2종류 이상의 다른 항암제는 임의의 순서로 투여된다. 예를 들어, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 2종류 이상의 다른 항암제는 각각 연속하여(즉 모두 상이한 시점에서) 투여되어도 되고; 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 제 1 다른 항암제가 동시에 투여되고, 그 전에 또는 그 후에 제 2 다른 항암제가 투여되어도 되고; 혹은 제 1과 제 2 다른 항암제가 동시에 투여되고, 그 전에 또는 그 후에 해당 다중 특이성 항원 결합 분자가 투여되어도 된다. 몇몇 실시태양에 있어서, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제를 연속하여(즉 상이한 시점에서) 투여하는 경우, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 간격은 특별히 한정되지 않고, 투여 경로나 제형 등의 요인이 고려되어 설정될 수 있다. 예를 들어, 투여 간격은, 0시간~168시간이고, 바람직하게는 0시

간~72시간이며, 또한 바람직하게는 0~24시간이고, 더 바람직하게는 0시간~12시간이지만, 이들로 한정되지 않는다.

[1220] 또한, 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 TGFβ 유도제의 투여를 포함한다. 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 TGFβ 유도제는, 당 기술 분야에서 공지된 임의의 적절한 방법으로 투여할 수 있다. 또한, 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제의 투여를 포함한다. 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 CLDN6 발현 유도제는, 당 기술 분야에서 공지된 임의의 적절한 방법으로 투여할 수가 있다.

[1221] 몇몇 실시태양에서는, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제는 동시 투여된다. 몇몇 실시태양에서는, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자는 간헐적으로(즉 단속적으로) 투여된다. 몇몇 실시태양에서는, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자는, 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 전에 투여된다. 몇몇 실시형태에서는, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자는, 적어도 하나의 다른 항암제의 투여 후에 투여된다.

[1222] 몇몇 실시태양에서는, 적어도 하나의 다른 항암제는 간헐적으로(즉 단속적으로) 투여된다. 몇몇 실시태양에서는, 적어도 하나의 다른 항암제는, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여 전에 투여된다. 몇몇 실시태양에서는, 적어도 하나의 다른 항암제는, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여 후에 투여된다.

[1223] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 명세서에 기재의 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 공지 또는 본 명세서에 기재된 항암제가, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제의 병용 요법에 사용될 수 있다.

[1224] 또한, 몇몇 실시태양에 있어서, 본 명세서에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 공지 또는 본 명세서에 기재된 TGFβ 유도제가, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 TGFβ 유도제의 병용 요법에 사용될 수 있다.

[1225] 또한, 몇몇 실시태양에 있어서, 본 명세서에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자, 및 공지 또는 본 명세서에 기재된 CLDN6 발현 유도제가, 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 CLDN6 발현 유도제의 병용 요법에 사용될 수 있다.

[1226] 몇몇 실시태양에 있어서는, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제의 병용 요법에 더하여, 추가로 추가 요법을 행할 수 있다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 병용 요법에서 추가하는 요법에는, 추가의 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 적어도 하나의 다른 항암제의 투여를 포함해도 된다.

[1227] 본 발명의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자, 적어도 하나의 다른 항암제, 또는 해당 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이루어지는 의약 조성물 등을 제공한다. 본 의약 조성물은, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제(세포 증식 저해제), 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역 응답 활성화제, 암 치료제 또는 암 예방제이다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물 등은, 본 발명의 병용 요법에서 이용될 수 있다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물 등은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제가 병용되는 것에 의해, 이들의 단독 요법과 비교하여, 세포를 상해하는, 세포 증식을 억제하는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역을 활성화하는, 또는 암을 치료 혹은 예방하는 효과가 높다. 다른 실시태양에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제가 병용되는 것에 의해, 세포를 상해하는, 세포 증식을 억제하는, 암 세포 혹은 암 세포를 포함하는 종양 조직에 대한 면역을 활성화하는, 또는 암을 치료 혹은 예방하는 상승 효과 또는 상가 효과를 갖는다. 어느 특정의 태양에 있어서, 적어도 하나의 다른 항암제의 투여에 의해, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자에 의한 항종양 효과가 증강된다. 또한, 어느 특정의 태양에 있어서, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자의 투여에 의해, 적어도 하나의 다른 항암제에 의한 항종양 효과가 증강된다.

[1228] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이루어지는」 의약 조성물 등이란, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제를, 질환의 치료 또는 예방에 있어서 동시에, 따로따로, 및/또는, 순차적으로 투여하기 위해서 조합한 의약 조성물 등을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 의약 조성물 등은, 다중 특이성 항원 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 항암제가 함께 함유되는 배합제의 형태로 제공할 수 있다. 또한, 예를 들어, 본 발명의 의약 조성물 등은, 다중 특이성 항원 결합 분자를 함유하는 약제와 적어도 하나의 다른 항암제를 함유하는 약제가 따로따로 제공되고, 이들 약제가, 동시에, 또는 순차적으로 사용되어도 된다. 상기 질환은 특별히 한정되지 않지만, 바

람직하게는 암이다.

[1229] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는, 다른 항암제, TGFβ 유도제, 및 CLDN6 발현 유도제로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 다른 제와 병용하기 위한 의약 조성물 등을 제공한다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, 적어도 하나의 다른 항암제를 유효 성분으로서 포함하는, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용하기 위한 의약 조성물 등을 제공한다.

[1230] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자를 다른 항암제와 조합하는 것에 의해, 적어도 하나의 다른 항암제에 의한 암의 치료에 있어서, 당해 적어도 하나의 다른 항암제의 치료 효과를 증강하기 위한 의약 조성물 등을 제공한다.

[1231] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, 다른 항암제를 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 조합하는 것에 의해, 다중 특이성 항체에 의한 암의 치료에 있어서, 당해 다중 특이성 항원 결합 분자의 치료 효과를 증강하기 위한 의약 조성물 등을 제공한다.

[1232] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 적어도 하나의 다른 항암제를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물 등을 제조하기 위한 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 그 외의 항암제의 사용을 제공한다.

[1233] 한편, 본 발명에 있어서, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 적어도 하나의 다른 항암제를 유효 성분으로서 포함한다는 것은, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 적어도 하나의 다른 항암제를 주요한 활성 성분으로서 포함한다고 하는 의미이며, 해당 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 적어도 하나의 다른 항암제의 함유율을 제한하는 것은 아니다.

[1234] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 명세서에 기재의 다중 특이성 항원 결합 분자 및 공지 또는 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 다른 항암제가, 상기 의약 조성물 등에 사용될 수 있다.

[1235] 본 명세서에 있어서, 「적어도 하나의 다른 항암제」란, 1종, 2종, 3종, 4종, 5종, 또는 그 이상의 항암제이다.

[1236] 한편, 본 명세서에 있어서, 「적어도 하나의 다른 항암제」 또는 「다른 항암제」란, 당해 항암제가, 본 명세서에 기재의 다중 특이성 항원 결합 분자와는 상이한 것을 유효 성분으로 하는 항암제임을 의미하고 있다. 즉 「다른 항암제」라고 있는 경우, 당해 항암제가 당해 다중 특이성 항원 결합 분자와는 상이한 것을 유효 성분으로 하는 항암제임을 특정하고 있는 것에 불과하고, 적어도 하나의 다른 항암제와 병용되는 당해 다중 특이성 항원 결합 분자가 항암제로서 이용되는 것으로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 하나의 다른 항암제를 병용하는(조합하여 이용하는) 것을 특징으로 하는, 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트, 방법, 또는 사용은, 당해 적어도 하나의 다른 항암제 이외의 항암제를 이용하지 않는 태양도 포함되고, 그 경우, 당해 다중 특이성 항원 결합 분자는, 예를 들어 당해 적어도 하나의 다른 항암제의 증강제, 병용제, 또는 첨가제 등으로서 이용하는 태양이 포함된다.

[1237] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양에 있어서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제로서는, 나이트로젠 마스터드 아날로그(Nitrogen mustard analogues), 설폰산 알킬(Alkyl sulfonates), 에틸렌 이민(Ethylene imines), 나이트로소유레아(Nitrosoureas), 에폭시 화합물(Epoxides), 그 외 알킬화제, 엽산 아날로그(Folic acid analogues), 퓨린 아날로그(Purine analogues), 피리미딘 아날로그(Pyrimidine analogues), 그 외 대사길항제, 빈카 알칼로이드 혹은 그의 아날로그(Vinca alkaloids or analogues), 포도필로톡신 유도체(Podophyllotoxin derivatives), 캄프토테신 아날로그(Camptothecin analogs), 콜히친 유도체(Colchicine derivatives), 탁세인(Taxanes), 그 외 알칼로이드 혹은 식물 알칼로이드 혹은 천연 물질, 토포아이소메라제 저해제, 악티노마이신(Actinomycines), 안트라사이클린 혹은 그의 관련 물질(Anthracyclines or related substances), 그 외의 세포 상해성 항생 물질, 백금 제제(Platinum compounds), 메틸하이드라진(Methylhydrazines), 키나제 저해제(Kinase inhibitors), 혈관 신생 저해제, 호르몬제, DNA 수식 효소 저해제, 면역 활력제, 프로테오솜 저해제, 효소(Enzymes), 히스톤 데아세틸라제 저해제(Histone Deacetylase Inhibitors), DNA 수식 효소 저해제, 사이토카인 제제, 레티노이드(Retinoids), 면역 체크포인트 저해제, Indoleamine 2,3-Dioxygenase(IDO) 저해제, co-stimulatory 분자 활성화제, 내추럴 킬러 세포 활성화제, 폴리 ADP-리보스 폴리메라제(PARP) 저해제, 모노클로날 항체, 그 외 분자 표적약, 또는 그 이외의 항암제를 들 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다. 비한정의 일 태양으로서, 본 발명에 있어서의 적어도 하나의 다른 항암제의 예로서는, WO2015/174439나 WO2015/156268에 기재되어 있는 항체 등을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다.

[1238] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「면역 체크포인트 분자」란, 면역 담당 세포(T 세포를 포함한다) 또는 암 세포 상에 발현하여, 리간드와 결합하는 것에 의해, 당해 면역 담당 세포에 대해 면역 응답을 저해하는 시그널을 전달하는 분자를 말한다. 면역 체크포인트 분자 및 그의 리간드에는, 예를 들어, PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTNL2, B7-H3, B7-H4, CD48, CD80, 2B4, BTLA, CD160, CD60, CD86i, 또는 VISTA 등의 분자가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 「면역 체크포인트 저해제」란, 면역 체크포인트 분자와 그의 리간드의 결합을 저해하는 것에 의해, 당해 면역 체크포인트 분자에 의한 시그널 전달을 저해하는 약제를 말한다.

[1239] 몇몇 실시예에 있어서, 본 발명에 있어서의 「PARP 저해」란, 폴리(ADP-리보스)폴리메라제(PARP), 특히 PARP-1 및 PARP-2를 저해하는 것에 의해, 1본쇄 절단의 수복을 방해하는 것을 말한다. PARP 저해제란, PARP를 저해하는 것에 의해, 1본쇄 절단의 수복을 방해하는 기능을 갖는 약제이다. 유방암이나 난소암 등의 일부의 암에서는, BRCA 유전자 변이에 의해 2본쇄 절단의 수복에 이상이 있음이 알려져 있고, PARP 저해제는, 이들 암에 대해, 합성 치사에 의한 항종양 효과를 갖는 약제를 말한다.

[1240] 본 발명의 비한정의 일 태양으로서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, PARP 저해제, T 세포 활성화 아고니스트제, 및/또는 혈관 신생 저해제인, 즉 상기 적어도 하나의 다른 항암제가, 화학요법제, 면역 체크포인트 저해제, PARP 저해제, T 세포 활성화 아고니스트제, 및 혈관 신생 저해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 또는 복수종의 항암제인, 의약 조성물 등이 제공된다. 한편, 다른 항암제가 복수인 경우, 동일 타입의 항암제로부터 복수종 선택되어도 되고, 상이한 타입의 항암제에 대해 복수종 선택되어도 된다. 예를 들어, 화학요법제로부터 복수종 선택되어도 되고, 화학요법제와 면역 체크포인트 저해제로부터 각각 1종 이상 선택되어도 된다. 다른 타입의 항암제로부터 복수종 선택하는 경우에 있어서도 마찬가지이다.

[1241] 본 발명의 비한정의 일 태양으로서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제는, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제를 포함한다. CLDN6의 발현이 증강되는 세포로서는 암 세포, 종양 조직 중의 세포, 및/또는 종양 조직 부근의 세포를 들 수 있다. 즉, 상기 적어도 하나의 다른 항암제로서는, 투여에 의해, 암 세포, 종양 조직 중의 세포, 및/또는 종양 조직 부근의 세포의 CLDN6의 발현이, 유도 또는 증강되는 것이 포함된다.

[1242] 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제는, 대상의 세포주로의 제의 투여 전후의 CLDN6 발현 변화를 해석함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어, qPCR, FACS, Western Blotting 해석과 같은 일반적인 수법에 의해, 대상의 세포주로의 제의 투여 전후의 CLDN6 발현량의 변화를 해석하고, CLDN6의 발현량이 증가하고 있는 경우에는, 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제임이 확인된다.

[1243] 구체적으로는, 예를 들어 암 세포주에 제를 첨가하고, 회수한 세포로부터 RNA를 정제하고, 계속해서 cDNA 합성을 행하고, 이것을 주형으로 하여 CLDN6 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고, CLDN6의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 예를 들어 암 세포주에 제를 첨가하고, 항CLDN6 항체로 세포를 염색하고, Flow cytometer로 세포막 상에 발현하는 CLDN6을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 예를 들어 암 세포주에 제를 첨가하고, 세포의 lysate를 이용하여, 항CLDN6 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 CLDN6의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 한편, 이들 수법은 각각 일반적으로 알려진 프로토콜에 의해 실시 가능하다(https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western(CST), https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt2.pdf(다카라 바이오), https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html(ThermoFisher)).

[1244] 암 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제로서, 예를 들어, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 겜시타빈 등의 화학요법제를 들 수 있다.

[1245] 본 발명의 비한정의 일 태양으로서, 상기 적어도 하나의 다른 항암제는, 세포의 TGFβ의 발현을 유도하는 제를 포함한다. TGFβ의 발현이 유도되는 세포로서는 암 세포, 종양 조직 중의 세포, 및/또는 종양 조직 부근의 세포를 들 수 있다. 즉, 상기 적어도 하나의 다른 항암제로서는, 투여에 의해, 암 세포, 종양 조직 중의 세포, 및/또는 종양 조직 부근의 세포의 TGFβ의 발현이, 유도 또는 증강되는 것이 포함된다. 예를 들어, 상기 적어도 하나의 다른 항암제는, 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도한다. 또한, 예를 들어, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여에 의해, 종양 조직 중의 TGFβ1의 발현이 유도된다. 또한, 예를 들어, 상기 적어도 하나의 다른 항암제의 투여에 의해, 종양 조직 부근의 TGFβ1의 발현이 유도된다.

[1246] 암 세포의 TGFβ의 발현을 증강하는 제는, 예를 들어, 암 세포주에 제를 첨가하고, TGFβ의 발현 변화에 대해 해석함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어, qPCR이나 세포 상청 중에 분비된 TGFβ 농도의 ELISA 측정과 같은 일반적인 수법에 의해, 대상의 세포주로의 제의 투여 전후의 TGFβ 발현량의 변화를 해석하고, TGFβ 발현량이 증가하고 있는 경우에는, 세포의 TGFβ의 발현을 증강하는 제임이 확인된다.

[1247] 구체적으로는, 암 세포주에 제를 첨가하고, 회수한 세포로부터 RNA를 정제하고, 계속해서 cDNA 합성을 행하고, 이것을 주형으로 하여 TGFβ 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고, TGFβ의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 암 세포주에 제를 첨가하고, 암 세포의 배양 상청 중에 분비된 TGFB의 농도를 ELISA로 측정하고, 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 한편, 이들 수법은 각각 일반적으로 알려진 프로토콜에 의해 실시 가능하고, 공지의 수법이다(예를 들어, https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western(CST), Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA (https://www.rndsystems.com/products/human-mouse-rat-porcine-canine-tgf-beta-1-quantikine-elisa_db100b(R&D system))).

[1248] 암 세포의 TGFβ1의 발현을 유도하는 제로서, 예를 들어, 독소루비신, 파클리탁셀, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 겜시타빈 등의 화학요법제나, 방사선 조사를 들 수 있다.

[1249] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 화학요법제로서는, 대사 길항제, 식물 알칼로이드, 안트라사이클린, 또는 백금 제제를 들 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[1250] 대사 길항제의 호적한 예로서, 에노시타빈, 카페시타빈, 카모푸르, 겜시타빈, 시타라빈, 테가푸르, 테가푸르·우라실, 네라라빈, 플루오로우라실, 후르다라빈, 페메트레키세드, 펜트스타틴, 메토트렉세이트를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 특히 바람직한 대사 길항제의 예로서는, 겜시타빈을 들 수 있다.

[1251] 알칼로이드의 일례로서는 식물 알칼로이드를 들 수 있다. 식물 알칼로이드의 호적한 예로서, 이리노테칸, 에토포시드, 소부족세인 도세탁셀, 노기테칸, 파클리탁셀, 비노렐빈, 빈크리스틴, 빈데신, 빈블라스틴을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 특히 바람직한 식물 알칼로이드의 예로서는, 토포아이소메라제 저해제를 들 수 있다. 특히 바람직한 식물 알칼로이드의 예로서는, 파클리탁셀, 이리노테칸을 들 수 있다.

[1252] 백금 제제의 호적한 예로서, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 시스플라틴, 네다프라틴을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 특히 바람직한 백금 제제의 예로서, 카보플라틴, 시스플라틴을 들 수 있다.

[1253] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 면역 체크포인트 저해제의 호적한 예로서는, 항PD-1 항체, 항PD-L1 항체, 항CTLA-4 항체, 항TIM3 항체 또는 항LAG3 항체를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 예를 들어, 항PD-1 항체의 예로서는, Pembrolizumab(CAS 등록 번호: 1374853-91-4), Nivolumab(CAS 등록 번호: 946414-94-4), MEDI0680, PDR001, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, PF-06801591이나 여러 가지 공지된 항PD-1 항체를 들 수 있다. 항PD-L1 항체의 예로서는, Atezolizumab(CAS 등록 번호: 1380723-44-3), Avelumab(CAS 등록 번호: 1537032-82-8), Durvalumab(CAS 등록 번호: 1428935-60-7), MDX-11 05나 여러 가지 공지된 항PD-L1 항체를 들 수 있다. 항CTLA-4 항체의 예로서는, Ipilimumab(CAS 등록 번호: 477202-00-9), Tremelimumab(CAS 등록 번호: 745013-59-6)나 여러 가지 공지된 항CTLA-4 항체를 들 수 있다. 항TIM3 항체의 예로서는, MBG452나 여러 가지 공지된 항TIM3 항체를 들 수 있다. 항LAG3 항체의 예로서는, BMS-986016s LAG525나 여러 가지 공지된 항LAG3 항체를 들 수 있다. 특히 바람직한 면역 체크포인트 저해제의 예로서, 항PD-L1 항체를 들 수 있다.

[1254] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, PARP 저해제의 호적한 예로서는, PARP 저해제가, 올라파리브, 루카파리브, 니라파리브, 벨리파리브, 파미파리브, 혹은 탈라조파리브를 들 수 있다. 특히 바람직한 PARP 저해제의 예로서, 올라파리브를 들 수 있다.

[1255] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, T 세포 활성화 아고니스트제로서는, TNF 수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF)의 아고니스트 항체, 혹은 co-stimulatory 분자의 아고니스트 항체를 들 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다. 「TNF 수용체 슈퍼패밀리의 아고니스트 항체」의 표적 분자로서는, TNF 수용체 슈퍼패밀리를 발현하는 세포(예를 들어, T 세포나 NK 세포 등)를 활성화하는 인자인 한 특별히 제한되지 않지만, 바람직하게는, 「TNF 슈퍼패밀리」 또는 「TNF 수용체 슈퍼패밀리」에 속하는 인자이다. 「TNF 슈퍼패밀리」 또는 「TNF 수용체 슈퍼패밀리」에 속하는 인자로서는, 다양한 면역 세포의 활성화에 기여하는, 삼량체 구조를 갖는 리간드와 당해 리간드가 결합하는 삼량체 구조의 리셉터가 알려져 있다(Nat. Rev. Immunol., 2012,12, 339-51). TNF 슈퍼패밀리 또는 TNF 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 인자로서는, 예를 들어, CD137, CD137L, CD40, CD40L, OX40,

OX40L, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, RANK, RANKL, CD30, CD153, GITR, GITRL, TNFRSF25, TL1A를 들 수 있다. 바람직한 인자로서는, 예를 들어 CD137을 들 수 있다. 예를 들어, CD137 아고니스트 항체의 예로서는, Urelumab(CAS 등록 번호: 934823-49-1), PF-05082566이나 여러 가지 공지된 CD137 아고니스트 항체를 들 수 있다.

[1256] co-stimulatory 분자에 속하는 인자로서는, TMIGD2, HHLA2, ICOS, ICOS Ligand, CD28, CD80, CD86 등을 들 수 있다. OX40 아고니스트 항체의 예로서는, MOXR0916, MEDI6469, MEDI0562, MEDI6383, PF-04518600s GSK-3174998이나 여러 가지 공지된 OX40 아고니스트 항체를 들 수 있다. CD40 아고니스트 항체의 예로서는, RG-7876, ADC-1013, SEA-CD40, APX005M, Dacetuzumab나 여러 가지 공지된 CD40 아고니스트 항체를 들 수 있다. GITR 아고니스트 항체의 예로서는, AMG228, AMK-1248, MK-4166, BMS-986156s TRX518이나 여러 가지 공지된 GITR 아고니스트 항체를 들 수 있다. CD27 아고니스트 항체의 예로서는, Varlilumab(CAS 등록 번호: 1393344-72-3)나 여러 가지 공지된 CD27 아고니스트 항체를 들 수 있다.

[1257] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 혈관 신생 저해제의 호적한 예로서는, VEGFR2 항체를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 몇몇 실시예에 있어서, 본 발명에 있어서의 혈관 신생 저해제는, 종양이 생존하는 데 필요한 혈관의 광범위한 성장(혈관 신생)을 방지한다. 예를 들어 종양 세포의 영양 및 산소 요구의 증대를 만족시키기 위해서 종양 세포에 의해 촉진되는 혈관 신생은, 여러 가지 분자를 표적으로 하는 것에 의해 블록할 수 있다. 예를 들어, 혈관 신생 저해제의 예로서는, 베바시주마브, 소라페니브, 에베롤리무스, 템시롤리무스나 여러 가지 공지된 혈관 신생 저해제를 들 수 있다.

[1258] 본 명세서에 있어서, 「TGFβ를 유도하는 방법」이란 세포의 TGFβ를 유도하는 방법을 의미한다. 구체적으로는, 투여에 의해 세포의 TGFβ1, TGFβ2, 및/또는 TGFB3을 유도하는 방법이다. 「TGFβ를 유도하는 방법」은 「TGFβ 유도제」의 투여를 포함한다. 「TGFβ를 유도하는 방법」은, 세포주에 해당 방법을 행하는 것에 의해, TGFβ의 발현을 증강시킨다.

[1259] 「TGFβ 유도제」란, 세포의 TGFβ를 유도하는 제를 의미한다. 구체적으로는, 투여에 의해 세포의 TGFβ1, TGFβ2, 및/또는 TGFB3을 유도하는 제이다. TGFβ 유도제는, 세포주에 제를 첨가하는 것에 의해, TGFβ의 발현이 증강한다.

[1260] TGFβ 유도제는, 예를 들어, 세포주에 제를 첨가하고, TGFβ의 발현 변화에 대해 해석함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어, qPCR이나 세포 상청 중에 분비된 TGFβ 농도의 ELISA 측정과 같은 일반적인 수법에 의해, 대상의 세포주로의 제의 투여 전후의 TGFβ 발현량의 변화를 해석하여, TGFβ 발현량이 증가하고 있는 경우에는, 세포의 TGFβ의 발현을 증강하는 제임이 확인된다.

[1261] 구체적으로는, 세포주에 제를 첨가하고, 회수한 세포로부터 RNA를 정제하고, 계속해서 cDNA 합성을 행하고, 이것을 주형으로 하여 TGFβ 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고, TGFβ의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 세포주에 제를 첨가하고, 세포의 배양 상청 중에 분비된 TGFB의 농도를 ELISA로 측정하고, 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 한편, 이들 수법은 각각 일반적으로 알려진 프로토콜에 의해 실시 가능하고, 공지된 수법이다.(예를 들어, https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western(CST), Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA (https://www.rndsystems.com/products/human-mouse-rat-porcine-canine-tgf-beta-1-quantikine-elisa_db100b)(R&D system))

[1262] 본 명세서에 있어서, 「CLDN6 발현 유도제」란 세포의 CLDN6 발현을 유도하는 제를 의미한다. 구체적으로는, 투여에 의해 세포의 CLDN6을 증강하는 방법이다.

[1263] 구체적으로는, 예를 들어 세포주에 제를 첨가하고, 회수한 세포로부터 RNA를 정제하고, 계속해서 cDNA 합성을 행하고, 이것을 주형으로 하여 CLDN6 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고, CLDN6의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 예를 들어 세포주에 제를 첨가하고, 항CLDN6 항체로 세포를 염색하고, Flow cytometer로 세포막 상에 발현하는 CLDN6을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 또한, 예를 들어 세포주에 제를 첨가하고, 세포의 lysate를 이용하여, 항CLDN6 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 CLDN6의 발현을 비첨가 세포와 비교하여 해석한다. 한편, 이들 수법은 각각 일반적으로 알려진 프로토콜에 의해 실시 가능하다(예를 들어, https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western(CST), https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt2.pdf(다카라 바이오), https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-

cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html(ThermoFisher)).

[1264] CLDN6 발현 유도제로서는, 예를 들어, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 겜시타빈 등의 화학요법제를 들 수 있지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다.

[1265] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명에 있어서의 적어도 하나의 다른 항암제는, 본 발명의 다중 특이성 항원 결합 분자와 병용했을 경우에, 당해 다른 항암제의 치료 혹은 예방 효과가 증강되는 것, 또는 당해 다중 특이성 항원 결합 분자의 치료 혹은 예방 효과가 증강되는 것이면 모두 사용할 수 있고, 특별히 한정되지 않는다. 어느 특정의 태양에 있어서, 해당 치료 혹은 예방 효과는, 항종양 효과이다.

[1266] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 다른 치료약, 면역 조절약, 암치료 백신, 양자 T 세포 요법, Treg 제거 등을 포함해도 되지만, 이들로 한정되지 않는다. 호적한 암치료 백신으로서는, 전종양 세포 백신, 종양 항원 백신, 벡터 베이스의 백신, 종양 용해성 바이러스 백신 및 수상 세포 백신을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. 전술한 요법 외에, 외과적 수술, 방사선 요법 등을 병용하는 집학적 치료를 해도 된다.

[1267] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명의 병용 요법은, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와, 항종양 면역 응답 증강약으로서 사이토카인을 사용한 사이토카인 요법과 아울러 행해져도 되고, 이와 같은 요법으로서는, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-21, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFNα(인터페론-α), IFNα-2b, IFNβ, IFNɣ 등의 사이토카인을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

[1268] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 전술한 의약 조성물을 포함하는, 세포 상해 유도제, 세포 증식 억제제, 세포 증식 저해제, 면역 응답 활성화제, 암 치료제 또는 암 예방제를 제공한다.

[1269] 몇몇 실시태양에 있어서, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 다른 항암제를 투여하는 「개체」는, 인간 또는 비인간 포유동물, 예를 들어 소, 말, 개, 양, 또는 고양이를 포함하는 포유동물을 의미한다. 바람직하게는, 개체는 인간이다. 개체에는 환자(인간 및 비인간 포유동물을 포함한다)가 포함된다. 몇몇 실시태양에 있어서, 당해 개체는, 암 세포 또는 암 세포를 포함하는 종양 조직을 갖는 환자이다. 본 발명에 있어서의 항암제, 또는 병용 요법의 대상이 되는 암 세포 또는 암 세포를 포함하는 종양 조직은, CLDN6이 발현하고 있는 한은, 특별히 한정되지 않는다. 본 발명에 있어서의 바람직한 CLDN6 발현 세포, 즉 CLDN6 양성의 세포는, 암 세포이다. 보다 바람직한 암종으로서, 예를 들어, 난소암(Ovary), 비소세포 폐암(NSCLC), 위암(Gastric), 식도암(Esophageal), 간장암(Liver), 유방암(Breast), 대장암(결장암(Colon) 및 직장암(Rectum)을 포함한다), 배세포 종양 (Germ cell tumor, Germinoma), 정소암(Testis), 자궁암(Uterine), 자궁경암(Cervical), 담관암(Cholangiocarcinoma), 신장암(Kidney), 두경부암(Head and Neck), 췌장암(PDAC), 방광암(Urinary bladder), 비정형 기형종양 라브도이드 종양(AT/RT)을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다. 더 바람직한 암종으로서는, 난소암, 비소세포 폐암, 위암, 간암, 자궁 내막암, 배세포성 종양, 대장암, 방광암, 비정형 기형종양 라브도이드 종양을 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다.

[1270] 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는, 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자와 다른 항암제의 병용 요법보다 전에, 해당 다중 특이성 항체 및/또는 어떠한 항암제 치료를 받았던 적이 있는 환자이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 환자는, 표준 요법을 받을 수 없는, 또는 표준 요법이 유효하지 않은 환자이다. 몇몇 실시태양에 있어서, 환자가 갖는 암은 초기 또는 말기이다.

[1271] 또한, 몇몇 실시형태에 있어서, 본 발명에 있어서의 항암제에 의한 치료, 또는 의약 조성물을 이용한 병용 요법의 대상이 되는 암종으로서는, 1세포당의 세포 표면상의 CLDN6 항원수가 100 이상인 암종이 바람직하고, 1세포당의 세포 표면 상의 CLDN6 항원수가 200 이상, 300 이상, 400 이상, 500 이상, 600 이상, 700 이상, 800 이상, 900 이상, 1000 이상, 1200 이상, 1400 이상, 1600 이상, 1800 이상, 2000 이상인 암종이 보다 바람직하고, 1세포당의 세포 표면 상의 CLDN6 항원수가 3000 이상, 4000 이상, 5000 이상, 6000 이상, 7000 이상, 8000 이상, 9000 이상, 10000 이상, 20000 이상, 30000 이상, 40000 이상, 50000 이상인 암종이 더 바람직하다.

[1272] 1세포당의 세포 표면 상의 CLDN6 항원수를 측정하는 수법은, 본 명세서에 기재된 방법 외, 당업자 공지된 수법을 이용하여 적절히 측정하는 것이 가능하지만, 예를 들어, 세포 표면 상의 CLDN6의 antibody binding capacity(ABC)를 QIFIKIT(DAKO)를 이용하여 플로 사이토메트리에 의해 산출할 수도 있다. 본 발명의 항암제 또는, 의약 조성물이 투여되는 대상인지 여부를 결정하기 위해서, 대상의 후보로부터 단리된 조직 표품에 있어서의, 1세포당의 세포 표면 상의 CLDN6 항원수가 결정될 수 있다. 당해 표품에 있어서, 1세포당의 세포 표면 상의 CLDN6 항원수가 전술한 기준을 만족시키는 경우는, 당해 표품이 유래하는 대상이 본 발명에 있어서의

항암제, 또는 의약 조성물(병용 요법)이 투여되는 대상이 될 수 있다.

[1273] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명의 항암제는, 다른 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다.

[1274] 예를 들어, 본 발명의 항암제는, 화학요법제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다. CLDN6 양성의 암을 갖는 환자로서, 화학요법제의 투여에 의해 소망의 약효가 인정되지 않았던 환자, 화학요법제의 투여에 대해서 암의 재발이 나타났던 환자, 혹은, 화학요법제에 대해 내성이 확인된 환자에 대해서, 본 발명의 항암제에 의한 치료를 할 수 있다. 바꾸어 말하면, 화학요법제에 의한 요법 기(旣)치료의 CLDN6 양성의 암에 대해서, 본 발명의 항암제에 의한 치료를 할 수 있다.

[1275] 또한, 예를 들어, 본 발명의 항암제는, 면역 체크포인트 저해제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다. 예를 들어, CLDN6 양성의 암을 갖는 환자로서, 면역 체크포인트 저해제의 투여에 의해 소망의 약효가 인정되지 않았던 환자, 면역 체크포인트 저해제의 투여에 대해서 암의 재발이 나타났던 환자, 혹은, 면역 체크포인트 저해제에 대해서 내성이 확인된 환자에 대해서, 본 발명의 항암제에 의한 치료를 할 수 있다. 바꾸어 말하면, 면역 체크포인트 저해제에 의한 요법 기치료의 CLDN6 양성의 암에 대해서, 본 발명의 항암제에 의한 치료를 할 수 있다.

[1276] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)은, 다른 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용할 수 있다.

[1277] 예를 들어, 본 발명의 의약 조성물은, 화학요법제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다. CLDN6 양성의 암을 갖는 환자로서, 화학요법제의 투여에 의해 소망의 약효가 인정되지 않았던 환자, 화학요법제의 투여에 대해서 암의 재발이 나타났던 환자, 혹은, 화학요법제에 대해 내성이 확인된 환자에 대해서, 본 발명의 의약 조성물에 의한 치료를 할 수 있다. 바꾸어 말하면, 화학요법제에 의한 요법 기치료의 CLDN6 양성의 암에 대해서, 본 발명의 의약 조성물에 의한 치료를 할 수 있다. 해당 의약 조성물에 포함되는 다른 항암제의 호적한 예로서는, 화학요법제를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다.

[1278] 또한, 예를 들어, 본 발명의 의약 조성물은 면역 체크포인트 저해제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다. 예를 들어, CLDN6 양성의 암을 갖는 환자로서, 면역 체크포인트 저해제의 투여에 의해 소망의 약효가 인정되지 않았던 환자, 면역 체크포인트 저해제의 투여에 대해서 암의 재발이 나타났던 환자, 혹은, 면역 체크포인트 저해제에 대해서 내성이 확인된 환자에 대해서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)에 의한 치료를 할 수 있다. 바꾸어 말하면, 면역 체크포인트 저해제에 의한 요법 기치료의 CLDN6 양성의 암에 대해서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)에 의한 치료를 할 수 있다. 해당 의약 조성물에 포함되는 다른 항암제의 호적한 예로서는, 면역 체크포인트 저해제를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다.

[1279] 본 발명에 있어서의 비한정의 일 태양으로서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)은, 본 발명의 항암제에 의한 처치에 대해서 불응성의 암을 갖는 환자를 치료하기 위해서 이용될 수 있다. 예를 들어, CLDN6 양성의 암을 갖는 환자로서, 본 발명의 항암제를 투여 후에 해당 항암제에 대해서 내성이 된 환자, 본 발명의 항암제의 투여에 의해 소망의 약효가 인정되지 않았던 환자, 혹은, 본 발명의 항암제에 대해서 내성이 확인된 환자에 대해서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)에 의한 치료를 할 수 있다. 바꾸어 말하면, 본 발명의 항암제 요법 기치료의 CLDN6 양성의 암에 대해서, 본 발명의 의약 조성물(병용 요법)에 의한 치료를 할 수 있다. 해당 의약 조성물에 포함되는 다른 항암제의 호적한 예로서는, 면역 체크포인트 저해제나 화학요법제를 들 수 있지만, 이것으로 한정되지는 않는다.

[1280] CLDN6 양성의 암(CLDN6의 발현이 확인된 암)에 관해서는, 면역 조직 염색법이나 플로 사이토메트리법, in situ 하이브리다이제이션법 등의 당업자 공지된 방법에 의해 당업자가 적절히 검사하여, CLDN6 양성이라고 판단하는 것이 가능하다.

[1281] 이 태양에 있어서, 본 발명의 항암제 이외의 다른 항암제에 의한 치료 경험이 있는 CLDN6 양성의 암이, 다른 항암제에 내성을 갖는 CLDN6 양성 암으로서 예시된다. 예를 들어, 백금 제제에 의한 치료 경험이 있는 CLDN6 양성의 암은 백금 제제 내성 CLDN6 양성 암, 면역 체크포인트 저해제에 의한 치료 경험이 있는 CLDN6 양성 암은 면역 체크포인트 저해제 내성 CLDN6 양성 암으로서 예시된다. 「내성」은 「저항성」으로 치환할 수 있다.

[1282] 예로서, 백금 제제를 포함하는 치료를 행한 후에 재발한 CLDN6 양성 암이, 해당 백금 제제 치료 경험이 있는 CLDN6 양성 암에 포함된다. 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 치료를 행한 후에 재발한 CLDN6 양성 암이, 해

당 면역 체크포인트 저해제에 의한 치료 경험이 있는 CLDN6 양성 암에 포함된다.

[1283] 여기에서, 본 명세서에 있어서, 「내성」은, 세포나 개체가, 질환의 처치나 치료에 대해 응답성(감수성이라고도 한다)이 없고, 또한/또는 유의한 응답(예를 들어, 부분 주공(奏功) 및/또는 완전 주공)을 산출하는 능력이 저하되어 있는 상태이면 한정되지 않는다. 예를 들어, 다른 항암제에 대해서 내성이 있는 암이란, 본 발명의 항암제 이외에 의한 처치 후에 생긴 내성이어도 된다. 예를 들어, 치료 초기에는 유효해도 반복 치료를 계속하면, 이윽고 당해 치료에 대해, 암이 내성을 획득하는 경우가 있어, 다른 항암제의 존재하에서 이미 퇴축되지 않거나, 또는 진행마저 되는 경우가 있다.

[1284] 또한, 예를 들어 다른 항암제에 내성을 갖는 CLDN6 양성 암의 다른 예시로서, 본 발명의 항암제 이외의 항암제 투여에 의한 치료 후에 재발한 암을 들 수 있다.

[1285] 본 개시는 또한, 본 개시의 항원 결합 분자 또는 본 개시의 방법에 의해 산생된 항원 결합 분자를 함유하는, 본 개시의 방법에 있어서 사용하기 위한 키트도 제공한다. 해당 키트는, 추가의 약학적으로 허용되는 담체 혹은 매체, 또는 키트의 사용 방법을 기재한 취급 설명서 등과 함께 포장될 수 있다.

[1286] 본 발명의 다른 국면에 있어서, 전술한 장애의 치료, 예방, 및/또는 진단에 유용한 기재를 포함하는 제품이, 제공된다. 제품은, 용기, 및 당해 용기 상의 라벨 또는 당해 용기에 부속되는 첨부 문서를 포함한다. 바람직한 용기로서는, 예를 들어, 보틀, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등이 포함된다. 용기류는, 유리나 플라스틱 등의, 다양한 재료로부터 형성되어 있어도 된다. 용기는 조성물을 단체(單體)로 보유해도 되고, 증상의 치료, 예방, 및/또는 진단을 위해 유효한 다른 조성물과 조합하여 보유해도 되고, 또한, 무균적인 액세스 포토를 갖고 있어도 된다(예를 들어, 용기는, 피하 주사바늘에 의해 꿰뚫을 수 있는 스토퍼를 갖는 정맥내 투여용 용액 백 또는 바이알이어도 된다). 조성물 중의 적어도 하나의 유효 성분은, 본 개시에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자이다. 라벨 또는 첨부 문서는, 조성물이 선택된 증상을 치료하기 위해서 사용되는 것임을 나타낸다. 더욱이 제품은, (a) 제 1 용기로서, 그 중에 수납된 본 개시에 기재된 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 조성물을 수반하는, 제 1 용기; 및, (b) 제 2 용기로서, 그 중에 수납된 추가적인 세포 상해제(적어도 하나의 다른 항암제, 복수 종류의 다른 항암제가 병용되는 경우, 제 1 다른 항암제) 또는 그 이외로 치료적인 제를 포함하는 조성물을 수반하는, 제 2 용기를 포함해도 된다. 더욱이 제품은, (c) 제 3 용기로서, 그 중에 수납된 추가적인 세포 상해제(복수 종류의 다른 항암제가 병용되는 경우, 제 2 다른 항암제) 또는 그 이외로 치료적인 제를 포함하는 조성물을 수반하는, 제 3 용기를 포함해도 된다. 본 발명의 이 태양에 있어서의 제품은, 추가로 조성물이 특정의 증상을 치료하기 위해서 사용될 수 있음을 나타내는, 첨부 문서를 포함해도 된다. 혹은 또는 더하여, 제품은 추가로 주사용 제균수(BWFI), 인산 완충 생리 식염수, 링거 용액, 및 덱스트로스 용액 등의, 약학적으로 허용되는 완충액을 포함하는, 제 2(또는 제 3 혹은 제 4) 용기를 포함해도 된다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 및 시린지 등의, 다른 상업적 관점 또는 유저의 입장에서 바람직한 기재를 추가로 포함해도 된다.

[1287] 첨부 문서

[1288] 용어 「첨부 문서」는, 치료용 제품의 시판 패키지에 통상 포함되는 설명서를 가리키기 위해서 이용되고, 그와 같은 치료용 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여 방법, 병용 요법, 금기, 및/또는 경고에 대한 정보를 포함한다.

[1289] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 발명은, (1) 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자, (2) 용기, (3) 개체에 있어서의 암을 치료하기 위해서 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 적어도 1종의 항암제를 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨을 포함하는 키트를 제공한다.

[1290] 다른 실시태양에 있어서, 본 발명은, (1) 적어도 하나의 다른 항암제, (2) 용기, (3) 개체에 있어서의 암을 치료하기 위해서 상기 적어도 하나의 다른 항암제와 적어도 1종의 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자를 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨을 포함하는 키트를 제공한다.

[1291] 다른 실시태양에 있어서, 본 발명은, (1) 전술한 다중 특이성 항원 결합 분자, (2) 적어도 하나의 다른 항암제, (3) 용기, (4) 개체에 있어서의 암을 치료하기 위해서 상기 다중 특이성 항원 결합 분자와 상기 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 개체에게 투여할 것을 나타내는 지시서 또는 라벨을 포함하는 키트를 제공한다.

[1292] 몇몇 실시형태에 있어서, 키트는, 추가로 의약적으로 허용될 수 있는 담체를 포함한다. 키트는 추가로, 바람직하게는 별도의 추가 용기 중에 보존되어 있는 멸균 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 키트는, 추가로, 주사용 제균수(BWFI), 인산 완충 생리 식염수, 링거 용액, 및 덱스트로스 용액 등의, 약학적으로 허용되는 완충액

을 포함하는, 제 2(또는 제 3) 용기를 포함해도 된다.

[1293] 본 개시에 있어서의 키트는 또한, 추가로, 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 및 시린지 등의, 다른 상업적 관점 또는 유저의 입장에서 바람직한 기재를 추가로 포함해도 된다. 키트는, 추가로, 암을 치료 또는 예방하기 위한 병용 요법에 관한 지시서를 포함할 수 있다.

[1294] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 키트에 있어서, 다중 특이성 항원 결합 분자 및/또는 항암제는 용기에 충전되어 있을 수 있다.

[1295] 몇몇 실시태양에 있어서, 「지시서」는, 의약품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 용량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 포함할 수 있는, 의약품의 시판되는 상자 중에 통상 들어가 있는 지시서를 가리킨다.

[1296] 몇몇 실시태양에 있어서, 본 개시에 있어서의 키트는, 예를 들어, 치료 용품으로서 상용 패키지로서 제공된다.

[1297] 한편 당해 키트는, 본 발명의 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이용하는 용도에만 이용되는 키트여도 되지만, 본 발명의 다중 특이성 항원 결합 분자와, 적어도 하나의 다른 항암제를 조합하여 이용하는 용도에 이용되는 한, 그 외의 용도에도 이용되는 키트여도 된다. 예를 들어 본 발명의 키트의 지시서 또는 라벨에는, 조합하여 개체에게 투여하는 것이 나타나 있는 한, 그 이외의 태양, 예를 들어 당해 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 당해 적어도 하나의 다른 항암제를, 단독으로 이용하는 것에 대하여 나타나 있어도 된다.

[1298] 본 명세서에 있어서 「및/또는」이라는 용어가 사용되는 경우, 「및/또는」의 전후에 기재되는 각 대상 또는 그들의 임의의 조합을 나타낸다. 구체적으로는, 예를 들어, 「A, B, 및/또는 C」에는, 이하의 7방법의 배리에이션이 포함된다; (i) A, (ii) B, (iii) C, (iv) A 및 B, (v) A 및 C, (vi) B 및 C, (vii) A, B, 및 C.

[1299] 「하나의(a)」 및 「1개의(an)」라고 하는 부정관사는, 본 발명에 있어서, 1개의 또는 2개 이상의(즉 적어도 하나의) 그 부정관사의 문법상의 대상을 말한다. 예를 들어 「하나의(a) 요소」는, 1개의 요소 또는 2개 이상의 요소를 의미한다.

[1300] 본 명세서에 기재된 1 또는 복수의 태양을 임의로 조합한 것도, 당업자의 기술 상식에 기초하여 기술적으로 모순되지 않는 한 본 발명에 포함되는 것이 당업자에게는 당연하게 이해된다.

[1301] 본 명세서에 있어서 인용한 모든 문헌은, 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[1302] 이하는, 본 개시의 방법 및 조성물의 실시예이다. 전술한 일반적인 기재에 비추어, 여러 가지 다른 태양이 실시될 수 있음이, 이해될 것이다.

[1303] **실시예**

[1304] [실시예 1] 각종 암 조직에 있어서의 CLDN6의 발현

[1305] TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터를 기초로, 각종 암 조직에 있어서의 CLDN6의 발현을 비교했다.

[1306] 도 1에 나타내는 바와 같이, CLDN6은 난소암(Ovary), 폐선암(비소세포 폐암, NSCLC), 배세포종(Germinoma), 자궁체암(Uterus)에서 발현이 항진하고 있음이 확인되었다. 또한 빈도는 높지 않기는 하지만, 담관암(Cholangiocarcinoma), 자궁경암(Cervix Uteri), 유방암(Breast), 대장암(결장암(Colon) 및 직장암(Rectum)), 간장암(Liver), 신장암(Kidney), 식도암(Esophagus), 췌장암(Pancreas), 위암(Stomach), 방광암(Urinary Bladder), 두경부암(상기도 소화관암, Upper Aerodigestive Tract) 등에서도 발현이 인정되었다.

[1307] [실시예 2] 종양 세포에 대한 in vitro 세포 상해 활성의 개선을 위한, 친Dual-Fab H183L072에 유래하는 친화성 성숙 배리언트의 스크리닝

[1308] 2.1. 친화성 성숙 배리언트의 서열

[1309] 친Dual-Fab H183L072(중쇄: 서열 번호: 90; 경쇄: 서열 번호: 142)의 결합 친화성을 증가시키기 위해서, H183L072를 주형으로서 이용하여, 가변 영역에 단일의 또는 복수의 변이를 도입하는 것에 의해, 1,000개보다도 많은 Dual-Fab 배리언트를 창출했다. 항체를, Expi293(Invitrogen)을 이용하여 발현시켜, 프로틴 A 정제, 계속해서, 겔 여과가 필요한 경우에는 겔 여과에 의해 정제했다. 복수의 변이를 갖는 15개의 대표적인 배리언트의 서열을, 표 1에 열기하고, 결합 키네틱스를, 실시예 2.2.2에 후술하는 바와 같이 Biacore T200 기기(GE Healthcare)를 이용하여 25℃ 및/또는 37℃에서 평가했다.

표 1

[1310]

배리언트명	VH명	VL명	서열 번호								
			VH	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	VL	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
H183/L072	dBBDu183H	dBBDu072L	90	103	116	129	142	147	152	157
H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	91	104	117	130	143	148	153	158
H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	92	105	118	131	144	149	154	159
H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	93	106	119	132	143	148	153	158
H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	94	107	120	133	143	148	153	158
H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	94	107	120	133	145	150	155	160
H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	95	108	121	134	143	148	153	158
H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	96	109	122	135	143	148	153	158
H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	97	110	123	136	143	148	153	158
H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	97	110	123	136	146	151	156	161
H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	98	111	124	137	143	148	153	158
H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	99	112	125	138	146	151	156	161
H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	100	113	126	139	146	151	156	161
H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	100	113	126	139	143	148	153	158
H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	101	114	127	140	143	148	153	158
H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	102	115	128	141	143	148	153	158
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	162				163			
CD137	CD137VH	CD137VL	164				165			

[1311] 2.2. 친화성 성숙 배리언트의 결합 키네틱스 정보

[1312] 2.2.1. 인간 CD3 및 CD137의 발현 및 정제

[1313] 인간 CD3 복합체의 γ 서브유닛 및 ε 서브유닛(인간 CD3eg 링커)을 29-mer 링커에 의해 연결하고, Flag-태그를 γ 서브유닛의 C말단에 융합시켰다(서열 번호: 169). 이 구축물을, FreeStyle293F 세포주(Thermo Fisher)를 이용하여 일과성으로 발현시켰다. 인간 CD3eg 링커를 발현하는 배양 상청을, Q HP 수지(GE healthcare)를 충전한 컬럼을 이용하여 농축하고, 그 다음에, FLAG-태그 친화성 크로마토그래피에 적용했다. 인간 CD3eg 링커를 함유하는 획분을 수집하고, 계속해서, 1×D-PBS로 평형화한 Superdex 200 겔 여과 컬럼(GE healthcare)에 제공했다. 그 다음에, 인간 CD3eg 링커를 함유하는 획분을 풀링하고, -80℃에서 보관했다.

[1314] 그 C말단에 헥사히스티딘(His-태그) 및 비오틴 억셉터 펩티드(BAP)를 갖는 인간 CD137 세포외 도메인(ECD)(서열 번호: 179)을, FreeStyle293F 세포주(Thermo Fisher)를 이용하여 일과성으로 발현시켰다. 인간 CD137 ECD를 발현하는 배양 상청을 HisTrap HP 컬럼(GE healthcare)에 부하하고, 이미다졸(Nacalai)을 함유하는 완충액으로 용출했다. 인간 CD137 ECD를 함유하는 획분을 수집하고, 계속해서, 1×D-PBS로 평형화한 Superdex 200 겔 여과 컬럼(GE healthcare)에 제공했다. 그 다음에, 인간 CD137 ECD를 함유하는 획분을 풀링하고, -80℃에서 보관했다.

[1315] 2.2.2. 인간 CD3 및 CD137에 대한 친화성 측정

[1316] 인간 CD3에 대한 Dual-Fab 항체(Dual-Ig)의 결합 친화성을, Biacore T200 기기(GE Healthcare)를 이용하여 25℃에서 평가했다. 항인간 Fc(GE Healthcare)를, 아민 커플링 키트(GE Healthcare)를 이용하여 CM4 센서 칩의 모든 플로 셀 상에 고상화했다. 항체를 항Fc 센서 표면 상에 포착하고, 그 다음에, 재조합 인간 CD3 또는 CD137을 플로 셀에 인젝트했다. 모든 항체 및 애널라이트를, 20mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, 및 0.005% NaN_3을 함유하는 ACES pH 7.4를 이용하여 조제했다. 센서 표면은, 3M $MgCl_2$로 사이클마다 재생했다.

결합 친화성은, Biacore T200 Evaluation software, version 2.0(GE Healthcare)을 이용하여, 데이터를 프로세싱하여, 1:1 결합 모델에 피팅시키는 것에 의해 결정시켰다. CD137 결합 친화성 어세이를, 어세이 온도를 37℃로 설정한 것을 제외하고, 동일한 조건에서 행했다. 재조합 인간 CD3 및 CD137에 대한 Dual-Fab 항체의 결합 친화성을 표 2에 나타낸다(표 중, K_{on}, K_{off}, 및 KD치를 나타내기 위해서 이용되는 표시 E는, 「10의 멱」을 의미하고, 예를 들어, 3.54E+04 = 3.54×10^4이다).

표 2

[1317]

	CD3			CD137		
	Kon (M-1·s-1)	Koff (s-1)	KD (M)	Kon (M-1·s-1)	Koff (s-1)	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

[1318] [실시예 3] H0868L0581/hCD137 복합체의 X선 결정 구조 해석

[1319] 3.1. 공결정 해석을 위한 항체의 조제

[1320] H0868L581을, hCD137 단백질과의 공결정 해석을 위해서 선택했다. 2가 항체를, Expi293 Expression system(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 일과성으로 트랜스펙트하여, 발현시켰다. 배양 상청을 채취하고, MabSelect SuRe 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare) 및 그 후의 Superdex200(GE Healthcare)을 이용한 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여, 항체를 상청으로부터 정제했다.

[1321] 3.2. 인간 CD137의 세포외 도메인(24~186)의 발현 및 정제

[1322] 제Xa 인자 절단 가능 링커를 개재시켜 Fc에 융합한 인간 CD137의 세포외 도메인(CD137-FFc, 서열 번호: 166)을, 키푸넨신의 존재하에서 HEK293 세포에 있어서 발현시켰다. 배양 배지 유래의 CD137-FFc를, 친화성 크로마토그래피(HiTrap MabSelect SuRe column, GE Healthcare) 및 사이즈 배제 크로마토그래피(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg column, GE healthcare)에 의해 정제했다. Fc를 제Xa 인자로 절단하고, 결과로서 CD137 세포외 도메인을, 탠덤으로 접속된 겔 여과 컬럼(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare) 및 프로틴 A 컬럼(HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare)으로 추가로 정제하고, 그 후, Benzamidine Sepharose 수지(GE Healthcare)를 이용하여 정제했다. CD137 세포외 도메인을 함유하는 획분을 풀링하고, -80℃에서 보관했다.

[1323] 3.3. H0868L0581 및 항CD137 대조 항체의 Fab 단편의 조제

[1324] 결정 구조 해석을 위한 항체를, Expi293 Expression system(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 일과성으로 트랜스펙트하여, 발현시켰다. 배양 상청을 채취하고, MabSelect SuRe 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare)

및 그 후의 Superdex200(GE Healthcare)을 이용한 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여, 항체를 상청으로부터 정제했다. H0868L0581 및 공지된 항CD137 대조 항체(이하 137Ctrl로 불림, 중쇄는 서열 번호: 167, 경쇄는 서열 번호: 168)의 Fab 단편을, Lys-C(Roche)로의 제한 소화와, 그것에 계속되는, Fc 단편을 제거하기 위한 프로틴 A 컬럼(MabSlect SuRe, GE Healthcare), 양이온 교환 컬럼(HiTrap SP HP, GE Healthcare), 및 겔 여과 컬럼(Superdex200 16/60, GE Healthcare) 상으로의 로딩을 이용한, 종래의 방법에 의해 조제했다. Fab 단편을 함유하는 획분을 풀링하고, -80℃에서 보관했다.

[1325] 3.4. H0868L0581 Fab, 137Ctrl, 및 인간 CD137 복합체의 조제

[1326] 정제된 CD137을, 탈글리코실화를 위해서 GST-태그 융합 엔도글리코시다제 F1(사내)과 혼합하고, 계속해서, 겔 여과 컬럼(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare) 및 프로틴 A 컬럼(HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare)을 이용한 CD137의 정제를 행했다. 정제된 CD137을, H0868L0581 Fab와 혼합했다. 복합체를, 겔 여과 컬럼(Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE healthcare)에 의해 정제하고, 그 후, 정제된 H0868L0581 Fab 및 CD137 복합체를, 137Ctrl과 혼합했다. 3성분 복합체를, 25mM HEPES pH7.3, 100mM NaCl로 평형화된 컬럼을 이용한 겔 여과 크로마토그래피(Superdex200 10/300 increase, GE Healthcare)에 의해 정제했다.

[1327] 3.5. 결정화

[1328] 정제된 복합체를, 약 10mg/mL까지 농축하고, 21℃에서의 시팅 드롭 증기 확산법에 의해 결정화를 실시했다. 리저버 용액은, 0.1M 트리스염산염 pH8.5, 25.0% v/v 폴리에틸렌 글라이콜 모노메틸 에터 550으로 이루어졌다.

[1329] 3.6. 데이터 수집 및 구조 결정

[1330] X선 회절 데이터를, SLS에서의 X06SA에 의해 측정했다. 측정의 한중간에는, 결정을, -178℃의 질소류에 항상 놓아 동결 상태로 유지하고, 결정을 1회에 0.25도 회전시키면서, 빔 라인에 부속된 Eiger X16M(DECTRIS)을 이용하여 합계로 1440매의 X선 회절 화상을 수집했다. 셀 파라미터의 결정, 회절 스포트의 지수 붙이기 및 회절 화상으로부터 얻어진 회절 데이터의 프로세싱은, autoPROC program(Acta. Cryst. 2011, D67: 293-302), XDS Package(Acta. Cryst. 2010, D66: 125-132), 및 AIMLESS(Acta. Cryst. 2013, D69: 1204-1214)를 이용하여 행하여, 최종적으로, 최대로 3.705옹스트롬 해상도의 회절 강도 데이터가 얻어졌다. 결정학 데이터의 통계를, 표 3에 나타낸다.

[1331] 구조를, 프로그램 Phaser에서의 분자 치환에 의해 결정했다(J. Appl. Cryst. 2007, 40: 658-674). 검색 모델은, 공개된 결정 구조(PDB 코드: 4NKI 및 6MI2)에서 유래했다. 모델은, Coot 프로그램(Acta Cryst. 2010, D66: 486-501)으로 만들고, 프로그램 Refmac5(Acta Cryst. 2011, D67: 355-367) 및 PHENIX(Acta Cryst. 2010, D66: 213-221)로 정밀화했다. 77.585~3.705옹스트롬의 회절 강도 데이터에 대한 결정학적 신뢰도 인자(R)는, 22.33%이며, 프리 R치는 27.50%였다. 구조 정밀화의 통계를, 표 3에 나타낸다.

표 3

X선 데이터 수집 및 정밀화 통계

데이터 수집	
공간군	*C2*
단위 격자	
a,*b*,*c* (Å)	233.795, 74.019, 81.986
α,β,γ (°)	90.000, 108.858, 90.000
해상도(Å)	77.585–3.705
전반사	99,488
유니크한 반사	14,221
완전성 (최고 해상도 셸)(%)	99.2 (99.7)
$R_{머지}$[a] (최고 해상도 셸)	0.161 (1.052)
정밀화	
해상도(Å)	48.822–3.705
반사	14,195
R인자[b] ($R_{프리}$[c]) (%)	22.33 (27.50)
rms이상으로부터의 편차	
결합 길이(Å)	0.003
결합각 (°)	0.618

a; $R_{머지} = \sum hkl \sum j |Ij(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum j |Ij(hkl)|$

식 중, $Ij(hkl)$ 및 $\langle I(hkl) \rangle$은, 각각, 지수 hkl에 관한 측정치 j의 강도 및 반사의 평균 강도이다.

b; R인자 $= \sum hkl |F_{calc}(hkl)| - |F_{obs}(hkl)| / \sum hkl |F_{obs}(hkl)|$

식 중, F_{obs} 및 F_{calc}은, 각각, 관찰된 구조 인자의 진폭 및 산출된 구조 인자의 진폭이다.

[1332] c; $R_{프리}$는, 랜덤으로 보류되는 5%의 반사에서 산출된다.

[1333] 3.7. H0868L0581 Fab 및 CD137의 상호작용 부위의 특정

[1334] H0868L0581 Fab, 137Ctrl, 및 CD137의 3성분 복합체의 결정 구조를, 3.705옹스트롬 해상도로 결정했다. 도 2 및 3에서는, H0868L0581 Fab 접촉 영역의 에피토프를, 각각 CD137 아미노산 서열에 있어서 및 결정 구조에 있어서 매핑하고 있다. 에피토프는, 결정 구조에 있어서 H0868L0581 Fab의 임의의 부분으로부터 4.5옹스트롬의 거리 내에 위치하는 1개 또는 복수개의 원자를 함유하는 CD137의 아미노산 잔기를 포함한다. 더하여, 3.0옹스트롬 내의 에피토프를, 도 2 및 3에 있어서 강조 표시하고 있다.

[1335] 도 2 및 3에 나타내는 바와 같이, 결정 구조에 의해, H0868L0581 Fab의 중쇄와 경쇄 사이에 형성되는 포켓에 결합한 CD137의 CRD1에 있어서의 L24～N30, 특히 L24～S29가, CD137의 N말단이 포켓의 심부에 대해서 향해지는 양식으로 깊게 묻어져 있음이 나타났다. 더하여, CD137 중의 CRD1에 있어서의 N39～I44 및 CRD2에 있어서의 G58～I64가, H0868L0581 Fab의 중쇄 CDR에 의해 인식되었다. CRD란, WO2015/156268에 기재되어 있는 바와 같이 CRD 참조로 불리는, Cys-Cys에 의해 형성되는 구조에 의해 띄워지는 도메인의 명칭이다.

[1336] 본 발명자들은, 인간 CD137의 N말단 영역, 특히 L24～N30을 인식하는 항인간 CD137 항체를 특정하고, 이 영역에 대한 항체가 세포 상의 CD137을 활성화할 수 있음도 또한 특정했다.

[1337] [실시예 4] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 생성

[1338] FAST-Ig(WO2013065708) 또는 CrossMab 테크놀로지(도 4)를 이용하는 것에 의해, 클로딘 6을 표적으로 하는 1개의 암(arm)과, CD3 및 CD137에 대한 듀얼 타게팅 기능을 가지는 다른 1개의 암을 가지는 삼중 특이성 항체를 생성했다. 삼중 특이성 항체 중의 각 Fv 영역의 표적 항원을 표 4에 나타냈다. 각 쇄의 명명 규칙을 도 4에 나타냈다. 서열 번호를 표 5에 나타낸다. 각 가변 영역의 서열을 표 6에 나타낸다.

[1339] Fc 영역은, FcγR 사일런트이며, 또한 탈글리코실화되어 있었다. FcRn 증강 변이 Act5(M428L, N434A, Q438R, S440E)를 적용하여, 항체의 PK를 개선했다. 각 항체에 적용한 엔지니어링 구성 요소를 표 7-1 및 7-2에 나타내고, FAST06, FAST22, 및 FAST30의 상세를 표 8에 나타냈다. 모든 항체를, Expi293 세포(Invitrogen)에서의 일과성 발현에 의해 삼중 특이성 형태로서 발현시키고, 참고 실시예 1에 따라 정제했다.

표 4

항체명 및 Fv명

항체 ID	항체명	항체 형식	Fv A (항 CLDN6)	Fv B (Dual Fab)
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE05KE
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE15KE
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE05KE
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25EK	DualAE15KE
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE05
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	Fast-Ig	CLDN6AE25	DualAE15
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE05
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11	CrossMab	xCLDN6AE25	DualAE15

[1340]

표 5

항체명 및 서열 번호

항체 ID	항체명	서열 번호			
		쇄 1	쇄 2	쇄 3	쇄 4
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326	41	50	54	68
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326	41	50	55	68
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326	42	51	56	69
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326	42	51	57	69
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11	44	52	60	70
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11	44	52	61	70
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	45	50	62	68
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	45	50	63	68
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	46	51	64	69
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	46	51	65	69
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	47	52	66	70
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	47	52	67	70
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326	48	53	56	71
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326	48	53	57	71
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	49	53	64	71
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	49	53	65	71
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11	43	52	58	70
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11	43	52	59	70

[1341]

표 6

Fv명, VH, VL, 및 그들의 CDR1~3의 서열 번호

Fv명	중쇄 정상 영역과 동일한 폴리펩티드쇄의 가변 영역	경쇄 정상 영역과 동일한 폴리펩티드쇄의 가변 영역	서열 번호								
			중쇄 정상 영역과 동일한 폴리펩티드쇄의 가변 영역				경쇄 정상 영역과 동일한 폴리펩티드쇄의 가변 영역				
			가변 영역	CDR1	CDR2	CDR3	가변 영역	CDR1	CDR2	CDR3
CLDN6AE25EK	65HQ39E	54L0532Q38K	2	8	14	20	26	30	34	38
CLDN6AE25	65H	54L0532	1	7	13	19	25	29	33	37
xCLDN6AE25	54L0532	65H	25	29	33	37	1	7	13	19
DualAE05KE	dBBDu183H1643.Q39K	dBBDu072L0581.Q38E	3	9	15	21	27	31	35	39
DualAE15KE	dBBDu183H2594.Q39K	dBBDu072L0581.Q38E	4	10	16	22	27	31	35	39
DualAE05	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	5	11	17	23	28	32	36	40
DualAE15	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	6	12	18	24	28	32	36	40

[1342]

[1343] [표 7-1]

각 항체에 적용된 엔지니어링 구성 요소

항체 ID	항체명	FcRn결합 증강	H/L 페어링	중쇄 페어링
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326		FAST6	S3
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326		FAST6	S3
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11		Cross-mab	Knob into Hole
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11		Cross-mab	Knob into Hole
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	Knob into Hole
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	Knob into Hole
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326		FAST30	S3
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326		FAST30	S3
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3

[1344]

[1345] [표 7-2]

[1346] 표7-1의 계속

항체 ID	항체명	FcRn결합 증강	H/L 페어링	중쇄 페어링
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350kI349hV11		Cross-mab	Knob into Hole
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350kI349hV11		Cross-mab	Knob into Hole

표 8

가변 영역에 있어서의 FAST-Ig 엔지니어링의 상세

No.	Dual Fab측 (쇄3 및 쇄4)									항CLDN6측 (쇄1 및 쇄2)									
	중쇄 (쇄3)			경쇄 (쇄4)						중쇄 (쇄1)					경쇄 (쇄2)				
	Q39	K147	Q175	K213	Q38	E123	S131	Q160	T180	Q39	K147	Q175	K213	Q38	E123	S131	Q160	T180	
FAST06	-	-	K	-	-	-	E	E			E	E				K	K		
FAST22	K	-	K	-	E	-	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K	K		
FAST30		-	K	-		-	E	E	E		E	E	E		K	K	K		

[1347]

[1348] [실시예 5] CLDN 패밀리에 대한 특이성의 FACS 분석

[1349] CLDN3, CLDN4, CLDN6, 및 CLDN9 사이에서, 아미노산 서열은 고도로 보존되어 있다. 따라서, 발명자들은, FACS 분석에 의해, VH로서 65HQ39E 및 VL로서 54L0532Q38K를 포함하는 CLDN6 결합 Fv의 CLDN6 결합 특이성을 조사했다. hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF, 및 hCLDN9/BaF를, CLDN6 결합 Fv CLDN6AE25EK 및 CD3 결합 Fv(중쇄 가변 영역의 서열 번호: 184, 경쇄 가변 영역의 서열 번호: 185)를 포함하는 15μg/ml의 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체(CS2961)와 함께 인큐베이트했다. 염색 대조로서, 다른 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체(6PHU3/TR01) 및 CLDN6으로의 결합능을 갖지 않는 항체(KLH/TR01)를 이용했다. 6PHU3/TR01 및 KLH/TR01은, 동일한 CD3 결합 Fv(중쇄 가변 영역의 서열 번호: 188, 경쇄 가변 영역의 서열 번호: 189)를 포함한다. 6PHU3/TR01의 CLDN6 결합 Fv는, 서열 번호: 190에 나타내는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 191에 나타내는 경쇄 가변 영역을 포함한다. KLH/TR01은, KLH 결합 Fv(중쇄 가변 영역의 서열 번호: 186, 경쇄 가변 영역의 서열 번호: 187)를 포함한다.

[1350] 각 항체의 결합을, Alexa Fluor 488 컨주게이트 항인간 IgG(Invitrogen)에 의해 검출했다. 사(死) 세포를 eFlour 780(Invitrogen) 염색에 의해 구별했다.

[1351] 도 5에 나타내는 바와 같이, CS2961은, 6PHU3/TR01과 비교하여, CLDN6에 대한 보다 양호한 특이성을 나타냈다.

[1352] [실시예 6] 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체 및 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 T 세포 의존성 세포 상해

의 측정

[1353] 도 6은, NIH:OVCAR-3(고CLDN6 발현 난소암 세포주) 및 A2780 및 COV413A(저CLDN6 발현 난소암 세포주)에 대한, 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체(CS3348) 및 5종류의 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체(PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137, 및 PPU4138)의 T 세포 의존성 세포 상해를 나타낸다. 항체의 서열을 표 9에 나타낸다.

표 9

[1354]

항체명	별명	서열 번호			
		쇄 1	쇄 2	쇄 3	쇄 4
CS3348	-	193	195	194	192
PPU4134	Ab01	41	50	54	68
PPU4135	Ab03	42	51	56	69
PPU4136	Ab04	42	51	57	69
PPU4137	Ab17	43	52	58	70
PPU4138	Ab18	43	52	59	70

[1355] 세포 상해를, 인간 PBMC를 이용한 LDH 어세이에 의해 평가했다. 15,000개의 표적 세포 및 150,000개의 인간 PBMC(E/T = 10)를 96웰 U바닥 플레이트의 각 웰에 파종하고, 여러 가지 농도의 항체와 함께 37℃ 및 5% CO_2에서 하룻밤 인큐베이트했다. 표적 세포의 사멸을 LDH 세포 상해 검출 키트(Takara Bio)에 의해 측정했다. 각 항체의 세포 상해 활성(%)을 이하의 식을 이용하여 계산했다.

[1356] 세포 상해 활성 (%) = (A - B - C)×100 / (D - C)

[1357] 「A」는, 항체 및 PBMC로 처리한 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 「B」는, 이펙터 세포 PBMC만을 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 「C」는, 미처리 표적 세포만을 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 또한 「D」는, Triton-X로 용해한 표적 세포를 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타낸다. 더욱이, 항체 없이 PBMC 및 표적 세포를 함유하는 웰에서 계산한 세포 상해를 0%로 설정했다. 모든 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체는, CLDN6 발현 세포에 대한 T 세포 의존성 세포 상해를 나타냈다.

[1358] [실시예 7] CD137/CD3 더블 인간화 마우스의 생성

[1359] 인간 CD137 노크인(KI) 마우스 계통을, 마우스 배성 줄기세포를 이용하여 마우스 내재성 Cd137 게놈 영역을 인간 CD137 게놈 서열로 치환하는 것에 의해 생성했다. 인간 CD3 EDG 치환 마우스는, CD3 복합체의 3개의 성분 CD3e, CD3d, 및 CD3g가 모두, 그의 인간 카운터파트 CD3E, CD3D, 및 CD3G로 치환될 수 있는 계통으로서 수립되었다(Scientific Rep. 2018; 8: 46960). CD137/CD3 더블 인간화 마우스 계통을, 인간 CD137 KI 마우스를 인간 CD3 EDG 치환 마우스와 교배하는 것에 의해 수립했다.

[1360] [실시예 8] hCD3/hCD137 마우스에서의 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 in vivo 유효성의 평가

[1361] 실시예 4에 있어서 조제된 항체를, 그 in vivo 유효성에 대해 담암 모델을 이용하여 평가한다.

[1362] in vivo 유효성 평가를 위해서, 이하 「hCD3/hCD137 마우스」라고 불리는, 실시예 6에 있어서 수립된 CD3/CD137 더블 인간화 마우스를 이용한다. 인간 CLDN6의 안정된 발현을 갖는 세포를, hCD3/hCD137 마우스 중에 이식하고, 종양 형성이 확인된 hCD3/hCD137 마우스를, 항체의 투여에 의해 처치한다.

[1363] 보다 구체적으로는, 담암 모델을 이용한 항체의 약물 유효성 시험에 있어서, 하기의 시험을 행한다. CLDN6 발현 세포(1×10^6세포)를, hCD3/hCD137 마우스의 서경부 피하 영역 중에 이식한다. 이식한 날을, 0일째라고 정의한다. 이식 후 9일째에, 마우스를, 그 체중 및 종양 사이즈에 따라 랜덤화하여 군나누기한다. 랜덤화한 날에, 항체를, 6mg/kg으로 꼬리 정맥을 통해서 정맥내 투여한다. 항체는, 1회만 투여한다. 종양 체적 및 체중을, 3~4일마다 항종양 시험 시스템(ANTES version 7.0.0.0)으로 측정한다.

[1364] 다른 in vivo 유효성 평가에 있어서, CLDN6 발현 세포를, hCD3/hCD137 마우스의 우측 복부 중에 이식한다. 9일째에, 마우스를, 그 종양 체적 및 체중에 기초하여 랜덤화하여 군나누기하고, 용매 또는 실시예 3에 있어서 조제된 항체를 i.v. 주사한다. 종양 체적을, 주 2회 측정한다. IL-6 해석을 위해서, 처치의 2시간 후에 마우스로부터 채혈한다. 혈장 샘플을, Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 Panel에 의해 제조업자의 프로토콜에 따라 해석한다.

[1365] [실시예 9] 락트산 데하이드로제나제 방출 어세이를 이용한 세포 상해 활성의 in vitro 어세이

[1366] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 PPU4135의 세포 상해 활성을, 락트산 데하이드로제나제(LDH) 방출 어세이에 의해 평가했다.

[1367] 인간 CLDN6을 발현하는, 인간 위암 세포주 NUGC-3(JCRB), 인간 기형 암 세포주 PA-1(ATCC), 인간 자궁암 세포주 SNG-M(JCRB), 인간 정소 배세포성 종양 세포주 NEC8(JCRB), 인간 난황낭 종양 세포주 NEC14(JCRB), 인간 비정형 기형 종양 라브도이드 종양 세포주 CHLA-02-ATRT(ATCC), 인간 방광암 세포주 HT-1197(ATCC) 및 인간 대장암 세포주 OUMS-23(JCRB)을 표적 세포로서 이용했다.

[1368] 동결된 PBMC(CTL)를, CTL anti-aggregate wash 및 10%FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지(SIGMA)(10%FBS/RPMI로 불린다)에 의해 세정하여, PBMC를 3×10^6세포/mL로 조정했다. 이들 PBMC를 이펙터 세포로서 이용했다.

[1369] 표적 세포를 배양 플라스크로부터 박리하고, U바닥 투명 96웰 플레이트(Corning)에, 100μL/웰로 1.5×10^4세포씩 파종했다. 인간 PMBC 용액 50μL(1.5×10^5세포) 및 0.004, 0.04, 0.4, 4, 또는 40nM로부터 선택되는 농도의 조제한 항체 50μL을, 각각 웰 내에 첨가했다. 37℃에서 하룻밤의 인큐베이션 후, 플레이트를 원심분리하고, 각 웰로부터의 배양 상청 100μL를 새로운 평저 투명 96웰 플레이트로 옮겼다. 그 다음에, LDH 검출 시약(촉매를 함유하는 색소 용액, TaKaRa) 100μL를 각 웰에 첨가하고, 계속해서 실온에서 30분간 인큐베이트했다. 490nm 및 620nm에서의 흡광도를 EnVision(PerkinElmer Japan)에 의해 측정했다.

[1370] 이하의 식에 의해, 세포 상해 활성률(%)을, 490nm의 흡광도와 620nm의 흡광도의 차로부터 계산했다.

[1371] 세포 상해 활성 (%) = (A - B - C)×100 / (D - C)

[1372] 「A」는, 항체 및 PBMC로 처리한 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 「B」는, 이펙터 세포 PBMC만을 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 「C」는, 미처리의 표적 세포만을 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타내고, 또한 「D」는, Triton-X로 용해한 표적 세포를 갖는 웰의 평균 흡광도치를 나타낸다. 배양 배지 웰의 평균 흡광도치를, 모든 흡광도치로부터 감산했다. 더욱이, 항체 없이 PBMC 및 표적 세포를 함유하는 웰에서 계산한 세포 상해를 0%로 설정했다. 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체는, 이용한 모든 세포주에 대해서 T 세포 의존성 세포 상해를 나타냈다.

[1373] 결과를 도 8에 나타낸다.

[1374] [실시예 10] 리얼타임 세포 증식 저해 어세이(xCELLigence 어세이)

[1375] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체에 의해 매개되는 T 세포 의존성 증식 저해를, xCELLigence RTCA MP 기기(ACEA Biosciences)를 이용한 세포 증식 어세이에 의해 평가했다.

[1376] 인간 CLDN6을 발현하는, 인간 난소암 세포주 NIH:OVCAR-3(ATCC) 및 인간 폐암 세포주 NCI-H1435(ATCC)를, 표적 세포로서 이용했다.

[1377] 1,000단위/mL의 헤파린 용액(NovoNordisk)을 미리 500μL 충전한 주사기에 의해, 건상(健常)한 성인 볼런티어로부터 말초혈 50mL를 채취했다. PBS(-)로 희석하고 4등분한 말초혈에, Ficoll-Paque PLUS 15mL를 주입하고, Leucosep 림프구 분리관(Greiner Bio-One) 중에서 원심분리했다. 분리관을 원심분리(실온에서 2150rpm으로 10분간)한 후, 말초혈 단핵 세포(이하, PBMC라고 칭한다) 획분층을 분리했다. 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지(SIGMA)(10%FBS/RPMI라고 부른다)로 PBMC를 1회 세정한 후, PBMC를 4×10^5세포/mL로 조정했다. 이들 PBMC를 이펙터 세포로서 이용했다.

[1378] 100μL/웰로, 1×10^4개의 표적 세포를 E-Plate 96 플레이트(Roche Diagnostics)에 플레이팅했다. 하룻밤 배양 후, 0.004, 0.04, 0.4, 4, 또는 40nM로부터 선택되는 농도의 항체와 함께 2×10^4개의 T 세포를 각각, 50μL/웰로 첨가했다. 플레이트의 인큐베이션 동안, 72시간에 걸쳐서 15분마다 세포 증식을 xCELLigence를 이용하여 모니터했다. 세포 증식 저해율(CGI: %)을, CGI (%) = 100 - ($CI_{Ab}\times100$ / CI_{NoAb})으로서 주어지는 식에 따라, Cell Index치로부터 결정했다. 「CI_{Ab}」는, 특정의 실험 시간에 있어서의, 항체 있음의 웰의 Cell Index치를 나타내고, 「CI_{NoAb}」는, 동일한 실험 시간에 있어서의, 항체 없음의 웰의 평균 Cell Index치를 나타낸다.

[1379] 이 결과로부터, 모든 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체가, CLDN6을 발현하는 암 세포주(OVCAR-3 및 NCI-

H1435)의 세포 증식을 용량 의존적으로 저해했음이 나타났다.

[1380] 결과를 도 9에 나타낸다.

[1381] [실시예 11] CLDN6 발현 종양 세포와 공배양한 NFAT-luc2 Jurkat 세포주에 있어서의 T 세포 활성화

[1382] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체에 의한 CD3 결합을 통한 T 세포 활성화를, 이펙터 세포로서 GloResponse NFAT-luc2 Jurkat 세포(Promega, J1601)를 이용한 루시페라제 어세이 시스템에 의해 측정했다. 클로딘 6을 내인적으로 발현하는 세포로서, 인간 난소암 세포주 OVCAR-3(ATCC) 및 폐선암 세포주 NCI-H1435(ATCC)를 이용했다. CLDN6 음성 세포로서, 인간 방광암 세포주 5637(ATCC)을 이용했다.

[1383] 어세이를 이하와 같이 행했다. 처음에, 상기 암 세포주를 배양 플라스크로부터 박리하고, 25μL/웰(2×10^4세포)로 백색 평저 96웰 플레이트(Coster #3917)에 플레이팅했다. 다음에, 0.003, 0.03, 0.3, 3, 또는 30nM로부터 선택되는 농도의 항체와 함께 1×10^5개의 Jurkat/NFAT-RE 리포터 세포주를 각각, 25μL/웰로 첨가했다. 37℃에서 하룻밤 배양 후, Bio-Glo 시약(Promega #G7941)을 75μL/웰로 첨가하고, 계속해서, 실온에서 10분간 추가로 인큐베이트했다. 그 다음에, 활성화 Jurkat 세포로부터 생긴 발광을 EnSpire(PerkinElmer Japan)에 의해 측정했다. 각 웰의 발광 배율을, 항체 있음의 웰과 항체 없음의 웰 사이에서 비교를 행하는 것에 의해 계산했다.

[1384] 표적 세포로서 CLDN6 발현 인간 세포주(OVCAR3 및 NCI-H1435) 및 CLDN6 음성 세포주(5637)를 이용한, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 및 CS3348의 NFAT 시그널 활성화 특성의 결과를, 도 10에 나타낸다.

[1385] 클로딘 6 양성 세포주의 존재하에서, 모든 항체에 의한 NFAT 활성화가 용량 의존적으로 관찰되었다. 한편으로, 클로딘 6 음성 세포주 5637의 존재하에서는, 고농도의 항체에서도 활성화는 거의 관찰되지 않았다.

[1386] [실시예 12] CLDN6 발현 종양 세포와 공배양한 인간 4-1BB 및 루시페라제를 발현하는 Jurkat 리포터 세포주에 있어서의 NFκB 활성화

[1387] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체에 의한 CD137 결합을 통한 NFκB 활성화를, GloResponse(상표) NFκB luc2/4-1BB Jurkat(Promega, CS196004)를 이용하여 평가했다. 클로딘 6을 내인적으로 발현하는 세포로서, 인간 난소암 세포주 OVCAR-3(ATCC) 및 폐선암 세포주 NCI-H1435(ATCC)를 이용했다. CLDN6 음성 세포로서, 인간 방광암 세포주 5637(ATCC)을 이용했다.

[1388] 어세이를 이하와 같이 행했다. 처음에, 상기의 암 세포주를 배양 플라스크로부터 박리하고, 25μL/웰(2.5×10^4세포)로 백색 평저 96웰 플레이트(Coster #3917)에 플레이팅했다. 다음에, 5×10^4개의 NFκB luc2/4-1BB Jurkat 리포터 세포주를 옮기고, 점증량의 항체를 함유하는 25μl 배지를 혼합했다. 어세이 플레이트를 37℃에서 6시간 인큐베이트하고, 그 다음에, Bio-Glo 시약(Promega #G7941)을 75μL/웰로 첨가하고, 계속해서, 실온에서 10분간 추가로 인큐베이트했다. 그 다음에, 활성화 Jurkat 세포로부터 생긴 발광을 EnVision(PerkinElmer Japan)에 의해 측정했다. 각 웰의 발광 배율을, 각 항체(0.003, 0.03, 0.3, 3, 및 30nM) 있음의 웰과 항체 없음의 웰 사이에서 비교를 행하는 것에 의해 계산했다.

[1389] 표적 세포로서 CLDN6 발현 인간 세포주(OVCAR3 및 NCI-H1435) 및 CLDN6 음성 세포주(5637)를 이용한, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 및 CS3348의 NFκB 시그널 활성화 특성의 결과를, 도 11에 나타낸다.

[1390] 클로딘 6 양성 세포주의 존재하에서, 모든 항체에 의한 NFκB 활성화가 용량 의존적으로 관찰되었다. 특히, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 존재하에서 훨씬 높은 활성화가 확인되었다. 한편으로, 클로딘 6 음성 세포주 5637의 존재하에서는, 고농도의 항체에서도 활성화가 관찰되지 않았다.

[1391] [실시예 13] in vivo 항종양 효과 시험

[1392] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 in vivo 항종양 효과를, 담암 마우스 모델을 이용하여 평가했다. 제대혈 유래의 인간 줄기세포를 이식한 인간화 NOG 마우스(HuNOG 마우스 모델)의 피하에, 인간 CLDN6을 발현하는 인간 암 세포주(NCI-H1435 또는 OV-90)를 이식했다. 담암 마우스는, 랜덤화하여 처치군으로 나누고, 항체, 또는 대상으로서 용매를 투여했다(표 10).

[1393] 이식 후 8일째(NCI-H1435) 또는 16일째(OV90)의 종양 사이즈 및 체중에 의해 마우스를 랜덤화하고 또한 군나누기한 후, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체를 정맥 내에 투여했다. 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체는 1

회만 투여되었다. 종양괴의 길이(L) 및 폭(W)을 측정하여, 종양 체적(TV)을 TV = (L×W×W) / 2로서 계산했다.

[1394] 용매 투여 대조군과 비교하여 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 투여군에 있어서, 항종양 효과가 관찰되었다(도 12 및 13).

표 10

in vivo항종양 효과의 각 시험군의 상세
a. NCI-H1434/HuNOG마우스 모델의 각 시험군

군	항체	용량
1	용매	-
2	CS3348	1 mg/kg
3	PPU4134	1 mg/kg
4	PPU4135	1 mg/kg
5	PPU4136	1 mg/kg
6	PPU4137	1 mg/kg
7	PPU4138	1 mg/kg

b. OV-90/HuNOG마우스 모델의 각 시험군

군	항체	용량
1	용매	-
2	CS3348	0.05 mg/kg
3	CS3348	0.2 mg/kg
4	PPU4135	0.05 mg/kg
5	PPU4135	0.2 mg/kg

[1395]

[1396] [실시예 14] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 독성 연구

[1397] PPU4135 항체(항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체)의 잠재적인 독성을, 필리핀원숭이를 이용한 독성 연구에 있어서 CS3348 항체(항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체)와 비교하여 평가했다. PPU4135 항체 및 CS3348 항체는 양쪽 모두, 필리핀원숭이의 그들의 항원과 교차 반응하므로, in vivo 독성 연구에 있어서의 평가를 위한 동물종으로서 필리핀원숭이를 선택했다. 단회 투여 독성 연구의 개요를 표 11에 나타낸다. CS3348을 이용한 독성 연구에서는, 암컷보다 수컷의 동물에서 보다 독성학적 소견에 대한 감수성이 높다고 생각되었기(도 14) 때문에, PPU4135 유래 독성의 평가에서는 2마리의 수컷이 이용되었다. 이들 연구에 있어서, 설정한 용량 레벨은, 100(CS3348) 또는 90(PPU4135)μg/kg이며, 이들은, 최대 반응의 80%를 일으키는 유효 농도의 대략 2.57배였다.

표 11

독성 연구의 개요

연구의 종류	종	처치/ 관찰 기간	동물	용량 (μg/kg)
단회 투여 독성:				
[CS3348] 단회 투여	필리핀원숭이 (3~4세)	단회 IV투여、 8일간	수컷 1마리 및 암컷 1마리	100
[PPU4135] 단회 투여	필리핀원숭이 (4세)	단회 IV투여、 29일간	수컷 2마리	90

[1398]

[1399] IV = 정맥 내

[1400] CS3348 또는 PPU4135로 처치한 수컷 동물에서는, 혈장 폭로 레벨은, 8일째까지 PPU4135 처치군과 CS3348 처치군 사이에서 동등했다. 이들 항체의 단회 투여 후에, AST(아스파라긴산 아미노트랜스페라제), ALT(알라닌 아미노트랜스페라제), 및 GLDH(글루타민산 데하이드로제나제)(간 효소); ALP(알칼리 포스파타제), TBIL(총 빌리루빈), GGT(γ글루타밀 트랜스펩티다제), 및 TBA(총담즙산)(간담도 장애 파라미터); 및 CRP(C반응성 단백질)(염증 마커)의 증가가 기록되었다(도 14). 본 연구로부터, 이들 항체로 처치한 수컷 동물 사이에서의 간 효소 레벨의 차이는 적었지만(도 14), 간담도 장애 파라미터 및 염증 마커의 상승은, CS3348 투여와 비교하여 PPU4135의 투여로 극적으로 경감되었다(도 14). 이들 결과는, 피험 물질 유래의 간 독성, 주로 간담도 장애는, 항CLDN6/CD3 이중 특이성 항체를 이용하는 것보다 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체를 이용하는 것에 의해 감약됨을 시사

하고 있다.

[1401] [실시예 15] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 특징 짓기

[1402] pH 7.4에서의 인간 및 필리핀원숭이(cyno) CLDN6 VLP(바이러스양 입자)에 대한 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 결합 친화성을, Biacore T200 기기(GE Healthcare)를 이용하여 25℃에서 결정했다. 항인간 CD81(BD Pharmingen) 항체를, 아민 커플링 키트(GE Healthcare)를 이용하여 C1 센서 칩의 모든 플로 셀 상에 고상화했다. 인간 및 필리핀원숭이 CLDN6 VLP를, 항인간 CD81 항체에 의해 센서 표면 상에 포착했다. 각 VLP는, 완충액(20mM 인산 Na, 150mM NaCl, 0.1mg/mL BSA, 0.005% NaN_3, pH 7.4)에 의해 5배 희석했다. 피험 항체를 완충액(20mM 인산 Na, 150mM NaCl, 0.1mg/mL BSA, 0.005% NaN_3, pH 7.4)에 있어서 조제했다. 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체를 50 및 200nM로 인젝트하고, 계속해서 해리시켰다. 센서 표면은, 사이클마다 0.1% SDS 및 100mM H_3PO_4로 재생했다. 표 12에 나타내는 바와 같이, 필리핀원숭이 CLDN6에 대한 PPU4135의 결합 친화성은, 인간 CLDN6에 대한 것과 동등하다. 결합 친화성은, Biacore T200 Evaluation software, version 2.0(GE Healthcare)을 이용하여, 데이터를 프로세싱하여, 1:1 결합 모델에 피팅시키는 것에 의해 결정했다.

[1403] pH 7.4에서의 재조합 인간 및 필리핀원숭이 CD3eg(CD3의 γ 및 ε 서브유닛)에 대한 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 결합 친화성을, Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 이용하여 25℃에서 결정했다. pH 7.4에서의 재조합 인간 및 필리핀원숭이 CD137에 대한 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 결합 친화성을, Biacore 8K 기기(GE Healthcare)를 이용하여 37℃에서 결정했다. 항인간 Fc(GE Healthcare) 항체를, 아민 커플링 키트(GE Healthcare)을 이용하여 CM4 센서 칩의 모든 플로 셀 상에 고상화했다. 피험 항체 및 애널라이트를, 20mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.005% NaN_3을 함유하는 ACES pH 7.4에 있어서 조제했다. 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체를 항인간 Fc에 의해 센서 표면 상에 포착했다. 항체 포착 레벨은, 300레조넌스 유닛(RU)를 목표로 했다. 재조합 CD3eg 및 CD137을 500 및 2000nM의 양쪽으로 인젝트하고, 계속해서 해리시켰다. 센서 표면은, 사이클마다 3M $MgCl_2$로 재생했다. 표 12에 나타내는 바와 같이, 필리핀원숭이 CD3eg 및 필리핀원숭이 CD137에 대한 PPU4135의 결합 친화성은 각각, 인간 CD3eg 및 CD137에 대한 것과 동등하다. 결합 친화성은, Biacore Insight Evaluation 소프트웨어(GE Healthcare)를 이용하여, 데이터를 프로세싱하여, 1:1 결합 모델에 피팅시키는 것에 의해 결정했다.

표 12

인간 및 필리핀원숭이 항원에 대한 PPU4135의 결합 친화성

[1404]

항원	친화성		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
인간CLDN6	2.17E+05	7.94E-04	3.65E-09
필리핀원숭이CLDN6	2.18E+05	8.21E-04	3.77E-09
인간 CD3eg	7.80E+04	2.66E-02	3.41E-07
필리핀원숭이CD3eg	1.01E+05	3.32E-02	3.29E-07
인간 CD137	1.26E+04	5.91E-04	4.68E-08
필리핀원숭이CD137	8.35E+03	1.46E-03	1.74E-07

[1405] (표 중에서 ka(1/Ms), kd(1/s), 및 KD치를 나타내기 위해서 이용되는 표시 E는, 「10의 멱」을 의미하고, 예를 들어, 2.17E+05 = 2.17×10^5이다)

[1406] [실시예 16] 복막 파종 모델의 in vivo 약효 평가 시험

[1407] 난소암의 복막 전이에 대한 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135(전술한 실시예 6의 표 9에 기재된 PPU4135와 동일한 항체)의 효과를 평가하기 위해, 마우스 복막 파종 모델을 이용하여 약효를 평가했다. 표적 세포로서, 인간 난소암 세포주 OV-90(ATCC)을 이용했다. NOD/ShiJic-scid Jcl 마우스 복강 내에 5×10^6개/500μL/마리의 OV-90 세포가 이식되었다. 이식 3일 후에, 인간 PBMC로부터 분리되어 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28(Gibco)에 의해 확대 배양된 인간 T 세포 3×10^7개/400μL가 정맥내 투여되었다. 추가로, 용매(0.05% Tween-20 함유 PBS) 또는 CS4135 항체의 용액 5mg/kg이 정맥내 투여되었다.

[1408] 종양 이식 후 2~7일마다 마우스를 관찰하고, 인도적 엔드 포인트에 따라 마우스 상태를 평가했다. 각 군의 생

존율을 도 15에 나타낸다.

[1409] 그 결과, 용매 투여군에서는 이식 48일 후부터 상태 악화를 나타내는 마우스가 보이고, 이식 55일 후까지에서 전체 예의 상태 악화가 인정되었다. 한편, CS4135 항체 투여군에서는 이식 57일 후부터 상태 악화를 나타내는 마우스가 보였지만, 이식 66일 후에 있어서의 생존율은 78%이며, 이식 80일 후에 있어서의 생존율은 22%였다. 50% 생존율은 이식 71일 후였다. 이 결과로부터, CS4135 항체에 의한 난소암의 복막 전이에 대한 치료 효과가 인정되었다.

[1410] [실시예 17] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135와 화학요법제의 병용에 관한 약효 평가 시험

[1411] 17.1. 각종 암 세포에 있어서의 백금 제제 처리에 의한 CLDN6 발현량의 변화

[1412] 인간 난소암 세포주(NIH-OVCAR3, ATCC), 인간 폐암 세포주(NCI-H1435, ATCC), 및 인간 자궁체암 세포주(SNG-M, Health Science Research Resources Bank)에 대해, 시스플라틴(CDDP, 니치이코), 혹은 카보플라틴(CBDCA, 산도)을 처리하여, CLDN6의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 해석했다.

[1413] 각 세포에 대해, 시스플라틴은 0.1μg/ml(OVCAR3), 또는 0.6μg/ml(H1435, SNG-M)를, 카보플라틴은 0.5μg/ml(OVCAR3), 또는 5μg/ml(H1435, SNG-M)를 첨가하고, 5일간 배양했다. 그 후 세포를 회수하고, CLDN6의 발현을 FACS로 해석했다.

[1414] FACS 해석에서는, 세포를 배양 플라스크로부터 박리하고, 항CLDN6 항체(AE3-20 mIgG2a, 일본 특허 제5848863호), 혹은, 아이소타입 항체(mIgG2a, BioLegend)를 2μg/ml로 4℃, 1시간 반응했다. 계속해서, Alexa Flour 488 표지 항마우스 IgG(ThermoFisher)를 10μg/ml로 4℃, 1시간 반응하고, CLDN6의 발현량을 플로 사이토미터(FACSVerse, BD Biosciences)로 해석했다.

[1415] 도 16은, 시스플라틴 또는 카보플라틴으로 5일간 처리한 각종 세포와 비처리의 각종 세포에 있어서의 CLDN6의 발현을 FACS로 해석한 결과이다. 어느 세포도 시스플라틴, 카보플라틴을 작용시킴으로써, CLDN6의 발현이 상승함이 확인되었다. 즉, 시스플라틴 및 카보플라틴이 암 세포의 CLDN6의 발현을 증강하는 제임이 확인되었다.

[1416] 다음에, 화학요법제에 의한 처리의 유무에 의해, CS4135 항체의 CD3 결합을 통한 T 세포 활성화능이 변화되는지를, GloResponse NFAT-luc2 Jurkat 세포(Promega, J1601)를 이용한 루시페라제 어세이 시스템에 의해 측정했다.

[1417] 어세이는 이하와 같이 행했다. 처음에, 상기와 같이, 5일간 화학요법제로 처리한 OVCAR3 및 H1435 세포를 배양 플라스크로부터 박리하고, 25μL/웰(2×10^4세포)로 백색 평저 96웰 플레이트(Coster #3917)에 플레이팅했다. 다음에, 0.003, 0.03, 0.3, 3, 또는 30nM로부터 선택되는 농도의 CS4135 항체와 함께 1×10^5개의 Jurkat/NFAT-RE 리포터 세포주를 각각, 25μL/웰로 첨가했다. 37℃에서 하룻밤 배양 후, Bio-Glo 시약(Promega #G7941)을 75μL/웰로 첨가하고, 계속해서, 실온에서 10분간 추가로 인큐베이트했다. 그 다음에, 활성화 Jurkat 세포로부터 생긴 발광을 EnSpire(PerkinElmer Japan)에 의해 측정했다. 각 웰의 발광 배율을, 항체 있음의 웰과 항체 없음의 웰 사이에서 비교를 행하는 것에 의해 계산했다.

[1418] 도 17은, 시스플라틴 또는 카보플라틴으로 5일간 처리한 세포, 비처리의 세포에 대한 CS4135의 CD3을 개재시키는 T 세포 활성화능을 Jurkat 루시페라제 어세이로 해석한 결과이다. 시스플라틴 또는 카보플라틴으로 5일간 처리한 세포에 대해서는, CS4135에 의한 T 세포 활성화능이 보다 강해지고 있음이 확인되어, 화학요법제가 CS4135의 cytotoxicity를 증강시킬 가능성이 시사되었다.

[1419] 17.2. vivo 이식 종양에 있어서의 카보플라틴 투여에 의한 CLDN6의 발현 유도

[1420] NOD/scid 마우스(닛폰 클레아)에 SNG-M(1×10^7세포)을 피하에 이식했다. 종양이 생착 후, 용매(생리 식염액) 혹은 카보플라틴 40mg/kg 및 80mg/kg를, 이식 당일(day 0), 3일 후(day 3)에 복강내 투여하고, 6일 후(day 6)에 종양을 샘플링했다.

[1421] 종양으로부터 RNA를 정제하고(RNeasy Mini Kit, QIAGEN), 계속해서 cDNA 합성을 행했다(Suprescript IV VILO Master Mix, ThermoFisher). 이것을 주형으로 하여, CLDN6 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하여(Power SYBR(등록상표) Green Master Mix, ThermoFisher), CLDN6의 발현을 해석했다(QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher).

[1422] 인간 CLDN6에 대한 프라이머, 및 인터널 컨트롤로서 이용한 인간 GAPDH에 대한 프라이머의 서열은 이하와 같다.

[1423] hCLDN6-1: GGG TGG ACG TCT TAT CAG GA(서열 번호: 206)

[1424] hCLDN6-2: GAG CTC CTC TCT TCA CCC CT(서열 번호: 207)

[1425] hGAPDH-F: GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC(서열 번호: 208)

[1426] hGAPDH-R: ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC TT(서열 번호: 209)

[1427] 도 18은, SNG-M 종양이 생착된 마우스에, 용매, 혹은 카보플라틴을 40mg/kg, 및 80mg/kg로 2회 투여한 후, 종양을 채재(採材)하고, 종양 중의 CLDN6의 발현을 qPCR로 해석한 결과이다. 용매 투여군에 대해, 카보플라틴 투여군에서는, 종양 내에 있어서의 CLDN6의 발현이 상승하고 있음이 확인되었다.

[1428] 17.3. huNOG 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 의한 CS4135 항체의 항종양 활성의 평가

[1429] 17.3.1. 세포주 및 xenograft 이식 모델의 제작, 및 항종양 활성의 평가 방법

[1430] 본 시험에 있어서, 인간 자궁체암 세포주 SNG-M과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스(전술한 실시예 13에 기재)가 사용되었다. SNG-M 세포주는 마우스의 우측 복부 피하에 이식되고, 군나누기는 이식 13일 후에 행했다. 종양 체적이 130~244mm^3이 된 개체를 이용하여 군나누기를 행했다. 용매 1 및 CS4135는 이식 13일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매 1로서 0.05% Tween-20 함유 PBS가 사용되었다. 용매 2 및 카보플라틴(브리스톨 마이어스 스퀴브 주식회사)은 이식 13, 16, 20일 후에 마우스 복강 내에 투여되었다. 용매 2로서 생리 식염액이 사용되었다.

표 13

[1431]

군	마리	약제	용량	투여일	투여 경로
1	8	용매 1 (0.05% Tween 20 PBS)	-	13	꼬리 정맥내
		용매 2 (생리 식염수)	-	13,16,20	복강내
2	8	CS4135	0.5 mg/kg	13	꼬리 정맥내
		용매 2	-	13,16,20	복강내
3	8	용매 1	-	13	꼬리 정맥내
		카보플라틴	40 mg/kg	13,16,20	복강내
4	8	CS4135	0.5 mg/kg	13	꼬리 정맥내
		카보플라틴	40 mg/kg	13,16,20	복강내

[1432] 종양 체적은, 이식 13, 16, 20, 23, 26, 30일 후에 측정하여, 각 군의 평균 종양 체적을 나타냈다.

[1433] 종양 체적은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1434] 종양 체적(mm^3)=장경(mm)×단경(mm)×단경(mm)/2

[1435] 종양 증식 억제 작용(Tumor Growth Inhibition: TGI)은, 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1436] TV change (mm^3) = 이식 30일 후의 종양 체적-군나누기 시의 종양 체적

[1437] TGI (%) = (1-(각 군마다의 TV change 평균치/용매 대조군의 TV change 평균치))×100

[1438] 그 결과, 이식 30일 후의 CS4135 항체와 카보플라틴의 병용 투여군의 TGI는 65%였지만, CS4135 항체 단제 투여군과 카보플라틴 단제 투여군의 TGI는 각각 35%, 44%였다. 따라서, CS4135 항체와 카보플라틴의 병용 투여군은, CS4135 항체 단제 투여군이나 카보플라틴 단제 투여군보다도 강한 항종양 효과를 가짐이 나타났다(도 19, 표 14).

표 14

이식 30일 후의 종양 증식 억제율(Tumor growth inhibition: TGI (%))

[1439]

	용매 대조	CS4135	카보플라틴	CS4135 + 카보플라틴
TGI	-	35	44	65

[1440] 17.3.2. 세포주 및 xenograft 이식 모델의 제작, 및 항종양 활성의 평가 방법

[1441] 본 시험에 있어서, 난소암 세포주 OVCAR3과 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG(huNOG) 마우스(전술한 실시예 13에 기재)가 사용되었다. OVCAR3 세포주는 마우스의 우측 복부 피하에 이식되고, 군나누기는 이식 38일 후에 행했다. 종양 체적이 119~210mm^3이 된 개체를 이용하여 군나누기를 행했다. 용매 1 및 CS4135는 이식 38, 45일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매 1로서 0.05% Tween-20 함유 PBS가 사용되었다. 용매 2 및 카보플라틴(브리스톨 마이어스 스퀴브 주식회사)은 이식 38, 45일 후에 마우스 복강 내에 투여되었다. 용매 2로서 생리 식염액이 사용되었다.

표 15

[1442]

군	마리	약제	용량	투여일	투여 경로
1	5	용매 1 (0.05% Tween 20 PBS)	-	38, 45	꼬리 정맥내
		용매 2 (생리 식염수)	-	38,45	복강내
2	5	CS4135	0.1mg/kg	38, 45	꼬리 정맥내
		용매 2	-	38,45	복강내
3	5	용매 1	-	38, 45	꼬리 정맥내
		카보플라틴	60mg/kg	38,45	복강내
4	5	CS4135	0.1mg/kg	38, 45	꼬리 정맥내
		카보플라틴	60mg/kg	38, 45	복강내
5	5	CS4135	0.1mg/kg	48,55	꼬리 정맥내
		카보플라틴	60mg/kg	38, 45	복강내

[1443] 종양 체적은 이식 38, 42, 45, 48, 52, 56일 후에 측정하여, 각 군의 평균 종양 체적을 나타냈다. 종양 체적은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1444] 종양 체적(mm^3) = 장경(mm)×단경(mm)×단경(mm)/2

[1445] 종양 증식 억제 작용(Tumor Growth Inhibition: TGI)은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1446] TV change (mm^3) = 이식 56일 후의 종양 체적-군나누기 시의 종양 체적

[1447] TGI (%) = (1-(각 군마다의 TV change 평균치/용매 대조군의 TV change 평균치))×100

[1448] 그 결과, 이식 56일 후의 CS4135 항체와 카보플라틴의 병용 투여군(동시)의 TGI는 180%였지만, CS4135 항체 단제 투여군과 카보플라틴 단제 투여군의 TGI는 각각 18%, -9%였다. 따라서, CS4135 항체와 카보플라틴의 병용군은, CS4135 항체 단제 투여군이나 카보플라틴 단제 투여군보다도 강하고 또한 상승적인 항종양 효과를 가짐이 나타났다(도 20, 표 16).

[1449] 더욱이, 카보플라틴 투여 후에 CS4135를 연속적으로 투여하면 이식 56일 후의 TGI는, 카보플라틴과 CS4135의 동시 투여군과 마찬가지로 180%였다. 따라서, CS4135는 카보플라틴과의 동시 투여만이 아니라, 카보플라틴 투여 후의 연속적 투여에 있어서도 마찬가지의 효과를 가짐이 나타났다(도 21, 표 16).

표 16

이식 56일 후의 종양 증식 억제율(Tumor growth inhibition: TGI (%))

[1450]

	용매 대조	CS4135	카보플라틴	CS4135 + 카보플라틴	카보플라틴 → CS4135
TGI	-	18	-9	180	180

[1451] 17.4 huNOG 마우스를 이용한 xenograft 이식 모델에 의한 CS4135 항체의 항종양 활성의 평가

[1452] 17.4.1 세포주 및 xenograft 이식 모델의 제작, 및 항종양 활성의 평가 방법

[1453] 본 시험에 있어서 난소암 세포주 NIH:OVCAR-3(OVCAR3, ATCC)과, 인간 CD34 양성 세포를 이식한 NOG (huNOG) 마우스(전술한 실시예 13에 기재)가 사용되었다. OVCAR3 세포주는 마우스의 우측 복부 피하에 이식되고, 군나누기는 이식 39일 후에 행했다. 종양 체적이 160-263mm^3가 된 개체를 이용하여 군나누기를 행했다. 용매 1 및 CS4135는 이식 39, 46일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매 1로서 0.05% Tween-20 함유 PBS가 사용되었다. 용매 2 및 이리노테칸 염산염(사와이 제약 주식회사)은 이식 39, 46일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매 2로서 생리 식염액이 사용되었다.

표 17

[1454]

군	마리	약제	용량	투여일	투여 경로
1	5	용매 1 (0.05% Tween 20 PBS)	-	39, 46	꼬리 정맥내
		용매 2 (생리 식염액)	-	39, 46	꼬리 정맥내
2	5	CS4135	0.1 mg/kg	39, 46	꼬리 정맥내
		용매 2	-	39, 46	꼬리 정맥내
3	5	용매 1	-	39, 46	꼬리 정맥내
		이리노테칸 염산염	25 mg/kg	39, 46	꼬리 정맥내
4	5	CS4135	0.1 mg/kg	39, 46	꼬리 정맥내
		이리노테칸 염산염	25 mg/kg	39, 46	꼬리 정맥내

[1455] 종양 체적은 이식 39, 42, 46, 49, 53, 57, 60일 후에 측정하고, 각 군의 평균 종양 체적을 나타냈다. 종양 체적은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1456] 종양 체적(mm^3) = 장경(mm)×단경(mm)×단경(mm)/2

[1457] 종양 증식 억제 작용(Tumor Growth Inhibition: TGI)은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1458] TV change (mm^3) = 이식 60일 후의 종양 체적-군나누기 시의 종양 체적

[1459] TGI (%) = (1-(각 군마다의 TV change 평균치/용매 대조군의 TV change 평균치))×100

[1460] 그 결과, 이식 60일 후의 CS4135 항체와 이리노테칸 염산염의 병용군의 TGI는 106%였지만, CS4135 항체 단제 투여군과 이리노테칸 염산염 단제 투여군의 TGI는 각각 -2%, 65%였다. 더욱이, 이식 60일 후의 CS4135 항체와 이리노테칸 염산염의 병용군과 이리노테칸 염산염 단제 투여군의 종양 체적 사이에는 통계학적으로 유의차가 인정되었다. 따라서, CS4135 항체와 이리노테칸 염산염의 병용군은, CS4135 항체 단제 투여군이나 이리노테칸 염산염 단제 투여군보다도 강하고 또한 상승적인 항종양 효과를 가짐이 나타났다(도 22, 표 18).

표 18

이식60일 후의 종양 증식 억제율 (Tumor growth inhibition: TGI (%))

	용매 대조	CS4135	이리노테칸 염산염	CS4135 + 이리노테칸 염산염
TGI	–	-2	65	106

[1461]

[1462] [실시예 18] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135와 면역 체크포인트 저해제의 병용에 관한 약효 평가 시험

[1463] 18.1.1 세포주 및 syngenic 이식 모델의 제작, 및 항종양 활성의 평가 방법

[1464] 본 시험에 있어서, 클로딘 6(CLDN6)을 강제 발현한 폐암 세포주 LLC1(CLDN6-LLC1)과 hCD137 KI/hCD3Tg 마우스(전술한 실시예 7에 기재)가 사용되었다. CLDN6-LLC1 세포주는 마우스의 우측 복부 피하에 이식되고, 군나누기는 이식 7일 후에 행했다. 종양 체적이 262~353mm^{3}이 된 개체를 이용하여 군나누기를 행했다. 용매 및 CS4135는 이식 8일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매로서 0.05% Tween-20 함유 PBS가 사용되었다.

표 19

군	마리	약제	용량	투여일	투여 경로
1	5	용매(0.05% Tween 20 PBS)	-	8	꼬리 정맥내
2	5	CS4135	0.25 mg/kg	8	꼬리 정맥내
3	5	용매	-	8	꼬리 정맥내
4	5	CS4135	0.25 mg/kg	8	꼬리 정맥내

[1465]

[1466] 종양 체적은 이식 7, 10, 14일 후에 측정하여, 각 군의 평균 종양 체적을 나타냈다. 종양 체적은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1467] 종양 체적(mm^3) = 장경(mm)×단경(mm)×단경(mm)/2

[1468] 종양 증식 억제 작용(Tumor Growth Inhibition: TGI)은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1469] TV change (mm^3) = 이식 14일 후의 종양 체적-군나누기 시의 종양 체적

[1470] TGI (%) = (1-(각 군마다의 TV change 평균치/Vehicle control군의 TV change 평균치))×100

[1471] 결과를 도 23에 나타낸다. 이식 14일 후에 있어서의 CS4135 투여군의 TGI는 71%였다. 이식 10, 14일 후(각각 투여 2, 6일 후(Day2, Day6)에 종양을 적출하고, 이하와 같이 종양 조직 중의 CD8 양성 T 세포수를 검출했다.

표 20

이식 14일 후의 종양 증식 억제율(Tumor growth inhibition: TGI (%))

	용매 대조	CS4135
TGI	-	71

[1472]

[1473] 18.1.2. CLDN6-LLC1 세포주 이식 마우스로부터의 종양 조직의 적출과 림프구 획분의 조제

[1474] 적출된 종양 조직에 대해, 중량이 측정된 후에, 림프구 획분 단리가 실시되었다. 림프구 획분은 Tumor Dissociation Kit, mouse(Miltenyi Biotec)를 이용하여 조직 파쇄 후, 셀 스트레이너를 이용하여 얻어진 림프구 획분이 사용되었다. 얻어진 종양 유래 림프구 획분은 플로 사이토메트리(FCM) 해석이 실시되었다.

[1475] 18.1.3. 플로 사이토메트리(FCM) 해석에 의한 종양 중량당의 CD8 양성 T 세포수의 산출

[1476] 종양 유래의 T 세포수에 대해 FCM을 이용하여 해석을 실시했다. 종양 중량당의 CD8 양성 T 세포수 산출에는, 종양 중량치와 FCM에 의한 CD8 양성 T 세포수가 이용되었다. FCM 해석에서는 항CD45 항체(BD Biosciences), 항CD3 항체(BioLegend), 항CD8 항체(BioLegend), 항CD4 항체(BioLegend)가 이용되었다. 측정에는, BD

LSRFortessa X-20(BDBiosciences)이 이용되었다.

[1477] 그 결과, 종양 이식 14일 후(투여 6일 후(Day 6))의 CS4135 투여군에 있어서, 종양 중량당의 CD8 양성 T 세포수의 현저한 증가가 인정되었다(도 24).

[1478] 18.2.1. 세포주 및 syngenic 이식 모델의 제작, 및 항종양 활성의 평가 방법

[1479] 본 시험에 있어서, 클로딘 6(CLDN6)을 강제 발현한 폐암 세포주 LLC1(CLDN6-LLC1)과, hCD137 KI/hCD3Tg 마우스(전술한 실시예 7에 기재)가 사용되었다. CLDN6-LLC1 세포주는 마우스의 우측 복부 피하에 이식되고, 군나누기는 이식 6일 후에 행했다. 종양 체적이 104~140mm^3이 된 개체를 이용하여 군나누기를 행했다. 용매 및 CS4135 항체는 이식 6일 후에 마우스 꼬리 정맥 내에 투여되었다. 용매로서 0.05% Tween-20 함유 PBS가 사용되었다. 용매 및 항마우스 PD-L1 항체(Bio X cell)는 이식 6, 8, 10, 12, 14, 17일 후에 마우스 복강 내에 투여되었다.

표 21

[1480]

군	마리	약제	용량	투여일	투여 경로
1	5	용매 (0.05% Tween 20 PBS)	-	6	꼬리 정맥내
		용매	-	6, 8, 10, 12, 14, 17	복강내
2	5	CS4135	0.2 mg/kg	6	꼬리 정맥내
		용매	-	6, 8, 10, 12, 14, 17	복강내
3	5	용매	-	6	꼬리 정맥내
		항마우스 PD-L1 항체	10 mg/kg	6, 8, 10, 12, 14, 17	복강내
4	5	CS4135	0.2 mg/kg	6	꼬리 정맥내
		항마우스 PD-L1 항체	10 mg/kg	6, 8, 10, 12, 14, 17	복강내

[1481] 종양 체적은, 이식 6, 10, 12, 14, 17일 후에 측정하여, 각 군의 평균 종양 체적을 나타냈다. 종양 체적은 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1482] 종양 체적(mm^3) = 장경(mm)×단경(mm)×단경(mm)/2

[1483] 종양 증식 억제 작용(Tumor Growth Inhibition: TGI)은, 이하의 계산식으로 산출되었다.

[1484] TV change (mm^3) = 이식 17일 후 시점의 종양 체적-군나누기 시의 종양 체적

[1485] TGI (%) = (1-(각 군마다의 TV change 평균치/Vehicle control군의 TV change 평균치))×100

[1486] 그 결과, 이식 17일 후의 CS4135 항체와 항마우스 PD-L1 항체의 병용 투여군의 TGI는 108%였지만, CS4135 항체 단제 투여군과 항마우스 PD-L1 항체 단제 투여군의 TGI는 각각 71%, -1%였다. 따라서, CS4135 항체와 항마우스 PD-L1 항체의 병용 투여군은, CS4135 항체 단제 투여군이나 항마우스 PD-L1 항체 단제 투여군보다도 강하고 또한 상승적인 항종양 효과를 가짐이 나타났다(도 25, 표 22).

표 22

이식17일 후 시점에 있어서의 종양 증식 억제율(Tumor growth inhibition: TGI (%))

[1487]

	용매 대조	CS4135	항마우스 PD-L1 항체	CS4135 + 항마우스 PD-L1 항체
종양 증식 억제 (TGI)	-	71	-1	108

[1488] [실시예 19] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135와 PARP 저해제의 병용에 관한 약효 평가 시험

[1489] 19.1. PARP 저해제의 투여에 의한 CLDN6 발현 유도의 평가

[1490] PARP 저해제(올라파리브(Olaparib))에 의한 CLDN6 발현 유도를 평가했다. 인간 CLDN6을 발현하는 BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289(ATCC) 또는 BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90(ATCC)을 이용했다.

[1491] 3mL/웰로, 3×10^5개의 표적 세포를 6웰 플레이트에 플레이팅했다. 하룻밤 배양 후, 최종 농도가 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3μM가 되도록 올라파리브를 첨가했다. 컨트롤 웰에는 DMSO를 첨가했다. 플레이트를 3일간 배양 후, 세포를 회수하고 항CLDN6 항체를 이용한 FACS 해석에 의해 세포 표면의 CLDN6 발현량을 측정했다. 컨트롤 웰로부터 회수한 표적 세포에 있어서의 형광치를 1로 했을 때의, 올라파리브 각 농도 첨가 웰로부터 회수한 표적 세포에 있어서의 형광치를 도 26에 나타낸다.

[1492] BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289에서는 올라파리브 농도 의존적으로 CLDN6 발현 유도 항진이 보였다. 한편, BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90에서는 올라파리브의 농도에 관계없이 CLDN6 발현 유도 항진은 보이지 않았다.

[1493] 19.2. PARP 저해제 투여 세포에 대한, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135의 세포 상해 활성

[1494] BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289에 대한 PARP 저해제(올라파리브)에 의한 CLDN6 발현 유도 항진이, 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체 CS4135의 세포 상해 활성에 주는 영향을 평가했다.

[1495] 인간 CLDN6을 발현하는 BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289(ATCC) 또는 BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90(ATCC)을 표적 세포로서 이용했다.

[1496] 3×10^5개의 각각의 표적 세포를 $25cm^2$ 플라스크에 5mL 파종했다. 플라스크는 2개 준비했다. 하룻밤 배양 후, 한쪽의 플라스크에는 최종 농도가 3μM이 되도록 올라파리브를 첨가했다. 다른 쪽의 플라스크에는 DMSO를 첨가했다. 플라스크를 3일간 배양 후에 표적 세포를 회수하고, 인간 PBMC를 이펙터 세포로 하여 락트산 데하이드로제나제(LDH) 방출 어세이에 의해 CS4135 항체의 세포 상해 활성을 평가했다. 그 결과를 도 27에 나타낸다.

[1497] BRCA1 결손 난소암 세포주 UWB1.289에서는 올라파리브 첨가에 의한 PPU4135의 세포 상해 활성의 항진이 보였다. 한편, BRCA1 야생형 난소암 세포주 OV-90에서는 올라파리브의 첨가는 세포 상해 활성에 영향을 주지 않았다.

[1498] [실시예 20] 리얼타임 세포 증식 저해 어세이(xCELLigence 어세이)를 이용한 CS4135 항체의 메카니즘 해석

[1499] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체에 의해 매개되는 T 세포 의존성 증식 저해의 메카니즘을 xCELLigence RTCA MP 기기(ACEA Biosciences)를 이용한 세포 증식 어세이에 의해 해석했다.

[1500] 인간 CLDN6을 발현하는, 마우스 결장암 세포주 MC38/CLDN6을, 표적 세포로서 이용했다. hCD3 트랜스제닉 마우스, hCD3/hCD137 노크인 마우스의 비장을 무균적으로 채취했다. 10% FBS를 함유하는 RPMI-1640 배지 중에서 비장을 갈아 으깨고, 70μm의 Cell strainer에 통과시킨 후, 원심분리(실온에서 1200rpm으로 10분간)함으로써 비장 세포를 단리했다. 단리된 비장 세포를 용혈하고, 추가로 CD3 MicroBeads(Miltenyi Biotec)를 이용하여 T 세포만 분리하여 이펙터 세포로서 이용했다.

[1501] E-Plate 96 플레이트(Roche Diagnostics)에 50μL/웰로 배지를 가하여 백그라운드를 측정한 후, 50μL/웰로, 5×10^3개의 표적 세포를 플레이팅했다. 하룻밤 배양 후, 1nM(종농도)의 CS4135와 100nM, 500nM(종농도)로부터 선택되는 KLH/CD137 이중 특이성 항체를 각각 25μL/웰로 첨가했다. 추가로 2.5×10^4개의 이펙터 세포를 50μL/웰로 첨가했다. 플레이트의 인큐베이션 동안, 48시간에 걸쳐서 10분마다 세포 증식을 xCELLigence를 이용하여 모니터했다. 세포 증식 저해율(CGI: %)을,

[1502] $CGI\ (\%) = 100 - (CI_{Ab}\times100 / CI_{NoAb})$

[1503] 로서 주어지는 식에 따라, Cell Index치로부터 결정했다. 「CI_{Ab}」는, 특정의 실험 시간에 있어서의, 항체 있음의 웰의 Cell Index치를 나타내고, 「CI_{NoAb}」는, 동일한 실험 시간에 있어서의 항체 없음의 웰의 평균 Cell Index치를 나타낸다. 한편, 각 Cell Index치는 항체 및 이펙터 세포 첨가 전의 각 웰의 Cell Index치를 1로 하여 보정한 값을 이용했다.

[1504] hCD3/hCD137 노크인 마우스 유래의 T 세포를 이용했을 경우에 있어서, KLH/CD137 이중 특이성 항체 무첨가 시의 CS4135 항체는 hCD3 트랜스제닉 마우스 유래의 T 세포를 이용했을 경우에 비해 훨씬 높은 세포 증식 저해율을 나타냈지만, KLH/CD137 이중 특이성 항체 용량 의존적으로 세포 증식 저해율은 저하되고, KLH/CD137 이중 특이성 항체를 500nM(종농도) 첨가했을 때에는 hCD3 트랜스제닉 마우스 유래의 T 세포를 이용했을 경우와 동일한 정도까지 세포 증식 저해율이 저하되었다. 이 결과로부터, CS4135 항체에 의한 CD137 시그널이 세포 상해 활성을 항진시키고 있음이 나타났다. 결과를 도 28에 나타낸다.

[1505] [실시예 21]

[1506] 21.1. 화학요법제에 의한 CLDN6 발현 유도

[1507] 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3, ATCC)에 각종 화학요법제를 첨가하고, CLDN6의 발현 변화에 대해 해석했다. 배양 플레이트에 파종한 NIH:OVCAR-3 세포에 대해, 약제 비첨가(무처리)의 세포로부터, 혹은, 카보플라틴(0.5μg/ml) 시스플라틴(0.1μg/ml), 이리노테칸(0.25μg/ml), 또는 겜시타빈(2ng/ml)을 첨가하고 6일 후에 회수된 세포로부터, RNA를 정제했다(RNeasy Mini Kit, QIAGEN). 계속해서 cDNA 합성을 행하고(Superscript IV VILO Master Mix, ThermoFisher), 이것을 주형으로 하여, CLDN6 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고(Power SYBR(등록상표) Green Master Mix, ThermoFisher), CLDN6의 발현을 해석했다(QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher).

[1508] 인간 CLDN6에 대한 프라이머, 및 인터널 컨트롤로서 이용한 인간 GAPDH에 대한 프라이머의 서열은 이하와 같다.

[1509] hCLDN6-1: GGG TGG ACG TCT TAT CAG GA(서열 번호: 206)

[1510] hCLDN6-2: GAG CTC CTC TCT TCA CCC CT(서열 번호: 207) hGAPDH-F: GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC(서열 번호: 208)

[1511] hGAPDH-R: ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC TT(서열 번호: 209)

[1512] 도 29는, NIH:OVCAR-3 세포에 대해, 약제 비첨가(무처리)의 세포, 혹은, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 또는 겜시타빈 첨가의 세포의, CLDN6의 발현을 qPCR로 해석한 결과이다. 약제 비첨가의 세포에 비해, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 및 겜시타빈 처리 세포에서는, CLDN6의 발현이 상승하고 있음이 확인되었다.

[1513] 21.2 화학요법제에 의한 TGFβ1의 발현 유도

[1514] 계속해서, 실시예 21.1에서 사용한, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 또는 겜시타빈으로 처리한 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3, ATCC)로부터 조제한 cDNA를 주형으로 하여, TGFβ1 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고(Power SYBR(등록상표) Green Master Mix, ThermoFisher), TGFβ1의 발현을 해석했다(QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher).

[1515] 인간 TGFβ1에 대한 프라이머의 서열은 이하와 같다.

[1516] hTGFβ1-F : AGTGGTTGAGCCGTGGAG (서열 번호: 214)

[1517] hTGFβ1-R : CGGTAGTGAACCCGTTGAT (서열 번호: 215)

[1518] 인터널 컨트롤로서 이용한 인간 GAPDH에 대한 프라이머는, 상기 실시예 21.1과 동일한 것을 사용했다.

[1519] 도 30은 NIH:OVCAR-3 세포에 대해, 약제 비첨가(무처리)의 세포, 혹은, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 또는 겜시타빈을 첨가한 세포의, TGFβ1의 발현을 qPCR로 해석한 결과이다. 약제 비첨가의 세포에 비해, 카보플라틴, 시스플라틴, 이리노테칸, 및 겜시타빈 처리 세포에서는, TGFβ1의 발현이 상승하고 있음이 확인되었다.

[1520] 21.3 TGFβ에 의한 CLDN6 발현 유도

[1521] 실시예 21.1에 있어서, 세포를 화학요법제로 처리하면 CLDN6의 발현이 상승함을 확인했다.

[1522] 또한, 실시예 21.2에 있어서, 화학요법제에 의한 암 세포의 TGFβ1의 발현 유도가 확인되었다. 실시예 21.2에 있어서 확인된 화학요법제 이외에도, 항암제에 의한 TGFβ1의 발현 유도는 알려져 있다. 예를 들어, 독소루비신이나 파클리탁셀 등의 화학요법제나, 방사선 조사에 의해, 암 세포의 TGFβ1의 발현이 유도됨이 보고되어 있다(Barcellos-Hoff et al., J Clin Invest. 1994 Feb;93(2):892-9. 및 Bhola et al., J Clin Invest. 2013 Mar;123(3):1348-58.).

[1523] 이것으로부터, 항암제 처리로 유도된 TGFβ1이 CLDN6의 발현에 영향을 줄 가능성이 추측되었다. 그래서 인간 난소암 세포주(NIH:OVCAR-3, ATCC)에 대해서 TGFβ1이 CLDN6의 발현을 유도하는지 해석했다. 배양 플레이트에 파종한 NIH:OVCAR-3 세포에 대해, 무처리의 세포로부터, 혹은 TGFβ1(R&D Systems, 10ng/ml)을 첨가하고 5일 후에 회수한 세포로부터, RNA를 정제했다(RNeasy Mini Kit, QIAGEN). 계속해서 cDNA 합성을 행하고(Superscript IV VILO Master Mix, ThermoFisher), 이것을 주형으로 하여, CLDN6 특이적인 프라이머에 의해 리얼타임 PCR을 행하고(Power SYBR(등록상표) Green Master Mix, ThermoFisher), CLDN6의 발현을 해석했다(QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, ThermoFisher).

[1524] 인간 CLDN6에 대한 프라이머 및 인터널 컨트롤로서 이용한 인간 GAPDH에 대한 프라이머는, 상기 실시예 21.1과 동일한 것을 사용했다.

[1525] 도 31은, NIH:OVCAR-3 세포에 대해, 무처리의 세포, 혹은 TGFβ1 첨가 세포의, CLDN6의 발현을 qPCR로 해석한 결과이다. 무처리의 세포에 비해, TGFβ1 첨가 세포에서는, CLDN6의 발현이 상승하고 있음이 확인되었다.

[1526] 다음에 다른 난소암 세포주에 대해서도 TGFβ1이 CLDN6의 발현을 유도하는지 해석을 행했다. NIH:OVCAR-3 세포에 더하여 COV413A 세포(ECACC), COV413B(ECACC), COV362(ECACC)를 배양 플레이트에 파종하고, TGFβ1을 10ng/ml로 첨가했다. 4일 후에 세포를 회수하고, FACS 해석에 의해 CLDN6의 발현을 해석했다.

[1527] FACS 해석에서는, 세포를 배양 플라스크로부터 박리하고 세포 현탁액을 Alexa Flour 488 표지(Alexa Fluor 488 antibody labeling kit, ThermoFisher Scientific)로 표지한 항CLDN6 항체(CS4135 mIgG1: 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은, 각각 서열 번호: 210 및 서열 번호: 211에 나타나고, 중쇄 및 경쇄 뉴클레오티드 서열은, 각각 서열 번호: 212 및 서열 번호: 213에 나타난다)로 염색하고, CLDN6의 발현량을 플로 사이토미터(FACSlyric, BD Biosciences)로 해석했다. CS4135 mIgG1 항체는, CS4135 항체의 Fab에 마우스 IgG1의 Fc 영역을 연결한 키메라 항체이다.

[1528] 도 32는, TGFβ1로 자극한 각종 세포와 비처리의 각종 세포에 있어서의 CLDN6의 발현을 FACS로 해석한 결과이다. 어느 세포도 TGFβ1 자극에 의해, CLDN6의 발현이 상승함이 확인되었다. 즉, TGFβ1이 각종 암 세포에 대해서 CLDN6의 발현을 유도하는 제임이 확인되었다. 이것으로부터, 특정의 이론에 얽매이는 것을 바라는 것은 아니지만, TGFβ1 발현을 유도하는 제에 의해, CLDN6의 발현이 증강된다고 생각되고, 또한, TGFβ1 발현을 유도하는 제와 CLDN6 결합 항체의 병용에 의해, 상가적·상승적인 항암 작용이 발휘된다고 생각된다.

[1529] [참고 실시예 1] 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 정제

[1530] 헤테로이량체화를 위한 각 변이를 갖는 중쇄 정상 영역 및 경쇄 정상 영역을 함유하는 발현 벡터 내에, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 클로닝했다.

[1531] in vitro 및 in vivo 연구 전용의 항CLDN6/Dual-Fab 삼중 특이성 항체의 대규모 조제를 위해서, 제조자의 지시에 따라, Expi293F 세포(Life technologies)를 이용하여, 항체를 일과성으로 발현시켰다. 최초에, 재조합 항체를 함유하는 배양 배지를 MabSelect Sure(GE healthcare) 컬럼으로 정제하고, 50mM 아세트산으로 용출했다. 용출된 항체를 1.5M Tris HCl/1M 아르기닌 HCl 완충액으로 중화했다. 그 다음에, ProA 용출물을, 20mM 인산 나트륨, pH6 완충액 중, 양이온 교환 HiTrap SP-HP(GE healthcare) 컬럼 상에 첨가하고, 20mM 인산 나트륨, 1M NaCl, pH6 완충액으로 용출했다. 이중 특이성 항체를 함유하는 획분을 풀링하고, 농축했다. 고분자량 및/또는 저분자량의 구성 성분을 제거하기 위해서, 사이즈 배제 크로마토그래피를, P1 완충액(20mM 히스티딘, 150mM 아르기닌, 162.1mM Asp, pH6.0) 중, Superdex 200 컬럼(GE healthcare)을 이용하여 실시했다. 정제한 이중 특이성 항체를 농축하고, -80℃의 냉동고에서 보관했다.

[1532] [참고 실시예 2] 클로딘 발현 세포의 생성

[1533] 인간 CLDN6, 인간 CLDN9(서열 번호: 198), 인간 CLDN3(서열 번호: 199), 인간 CLDN4(서열 번호: 200), 마우스 CLDN6(서열 번호: 201), 마우스 CLDN9(서열 번호: 202), 마우스 CLDN3(서열 번호: 203), 및 마우스 CLDN4(서열 번호: 204) 발현 벡터를 각각 마우스 프로 B 세포주 Ba/F3에 트랜스펙트하는 것에 의해, 인간 CLDN6을 발현하는 Ba/F3 세포(hCLDN6/BaF), 인간 CLDN9를 발현하는 Ba/F3 세포(hCLDN9/BaF), 인간 CLDN3을 발현하는 Ba/F3 세포(hCLDN3/BaF), 인간 CLDN4를 발현하는 Ba/F3 세포(hCLDN4/BaF), 마우스 CLDN6을 발현하는 Ba/F3 세포(mCLDN6/BaF), 마우스 CLDN9를 발현하는 Ba/F3 세포(mCLDN9/BaF), 마우스 CLDN3을 발현하는 Ba/F3 세포(mCLDN3/BaF), 및 마우스 CLDN4를 발현하는 Ba/F3 세포(mCLDN4/BaF)를 수립했다.

[1534] 클로딘 패밀리 단백질은, 항체에 있어 액세스 가능한 2개의 세포외 도메인을 갖는다. 인간 CLDN6과 인간 CLDN9에서의 세포외 도메인 사이의 아미노산 서열 유사성에 관해서, 제 1 세포외 도메인은 거의 동일하고, 제 2 세포외 도메인에서는, 상이한 아미노산이 2개만 존재한다(도 18). 인간 클로딘 6의 156위의 글루타민(서열 번호: 196 또는 197에 나타나는 서열에서의 156위)을, 류신으로 치환하여, 156위에 인간 클로딘 9와 동일한 아미노산을 포함하는 인간 CLDN6 변이체를 제작했다. 이 인간 CLDN6 변이체를 hCLDN6(Q156L)(서열 번호: 205)라고 이름 붙였다. hCLDN6(Q156L)을 안정적으로 발현하는 Ba/F3 트랜스펙턴트를, 상기에 기재한 것과 유사한 방법을 이용하여 생성했다. 수립한 Ba/F3 트랜스펙턴트를 hCLDN6(Q156L)/BaF라고 이름 붙였다.

[1535] 293fectin(Invitrogen)을 이용하여 인간 및 마우스 CLDN(CLDN6, CLDN9, CLDN3, 및 CLDN4를 포함한다)의 발현

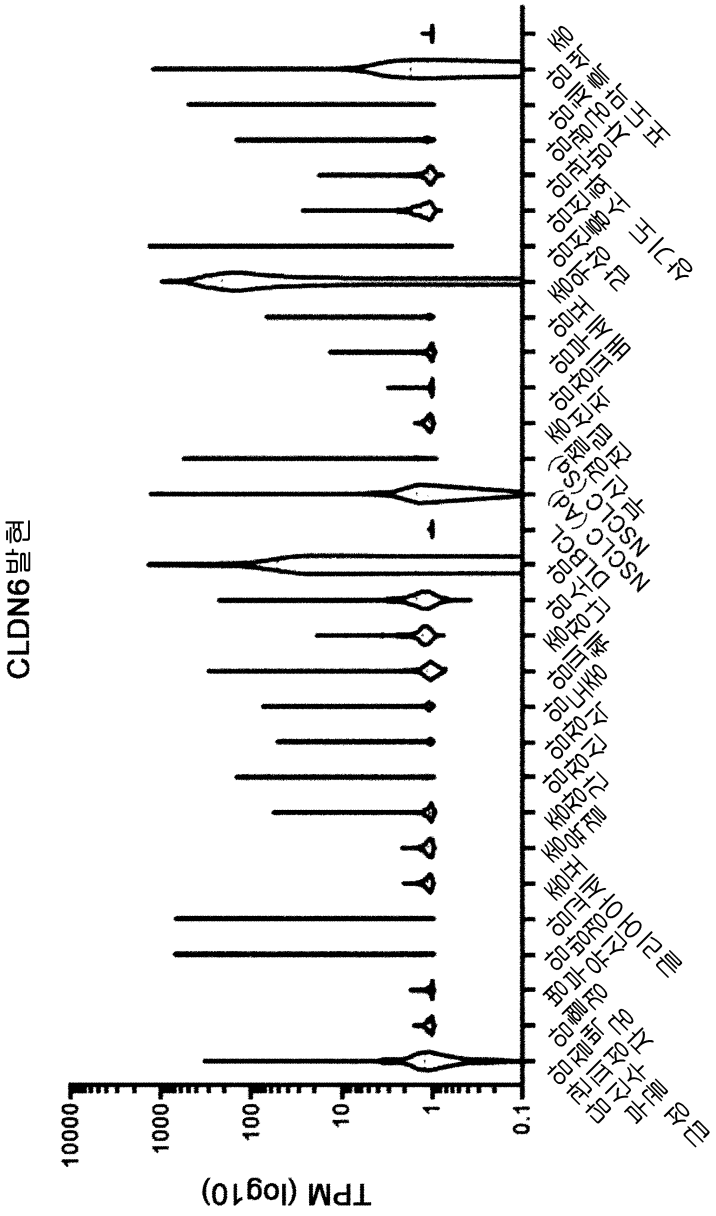
벡터를 FreeStyle(상표) 293-F 세포(Invitrogen)에 도입하는 것에 의해, 인간 및 마우스 CLDN3, 4, 6, 및 9를 일과성으로 발현하는 FreeStyle(상표) 293-F 트랜스펙턴트 세포를 생성했다. 생성된 FreeStyle(상표) 293-F 트랜스펙턴트 세포를 각각, hCLDN3/FS293, hCLDN4/FS293, hCLDN6/FS293, hCLDN9/FS293, mCLDN3/FS293, mCLDN4/FS293, mCLDN6/FS293, 및 mCLDN9/FS293이라고 이름 붙였다.

산업상 이용가능성

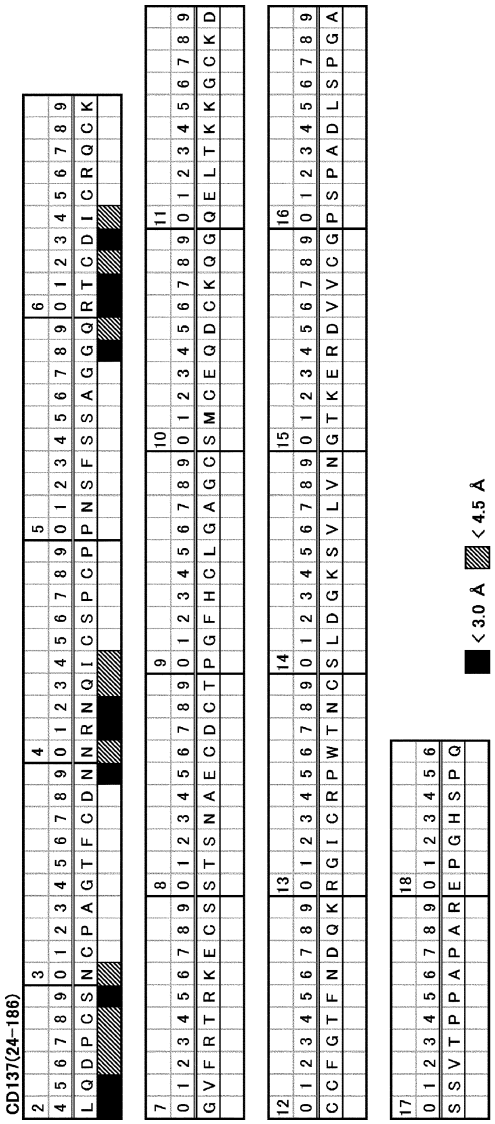
[1536] 본 개시는, CD3 및 CD137(4-1BB)에 결합할 수 있고, CD3 또는 CD137 중 어느 하나에 결합하며, 또한 CLDN6에 결합할 수 있는, 다중 특이성 항원 결합 분자를 포함하는 항암제, 당해 항암제와 적어도 하나의 다른 항암제의 병용 요법, 및 당해 병용 요법에 이용하기 위한 의약 조성물 등을 제공한다. 본 개시의 항암제, 의약 조성물, 조합, 키트에 포함되는, 또는 본 개시의 방법 혹은 사용에 이용되는 다중 특이성 항원 결합 분자는, 여러 가지 암, 특히, CLDN6 양성 암 등의 CLDN6에 관련된 암을 치료하기 위한 면역 요법에 있어서 사용하기 위해서, CLDN6을 발현하는 세포를 표적으로 하는 데 이용할 수 있다.

도면

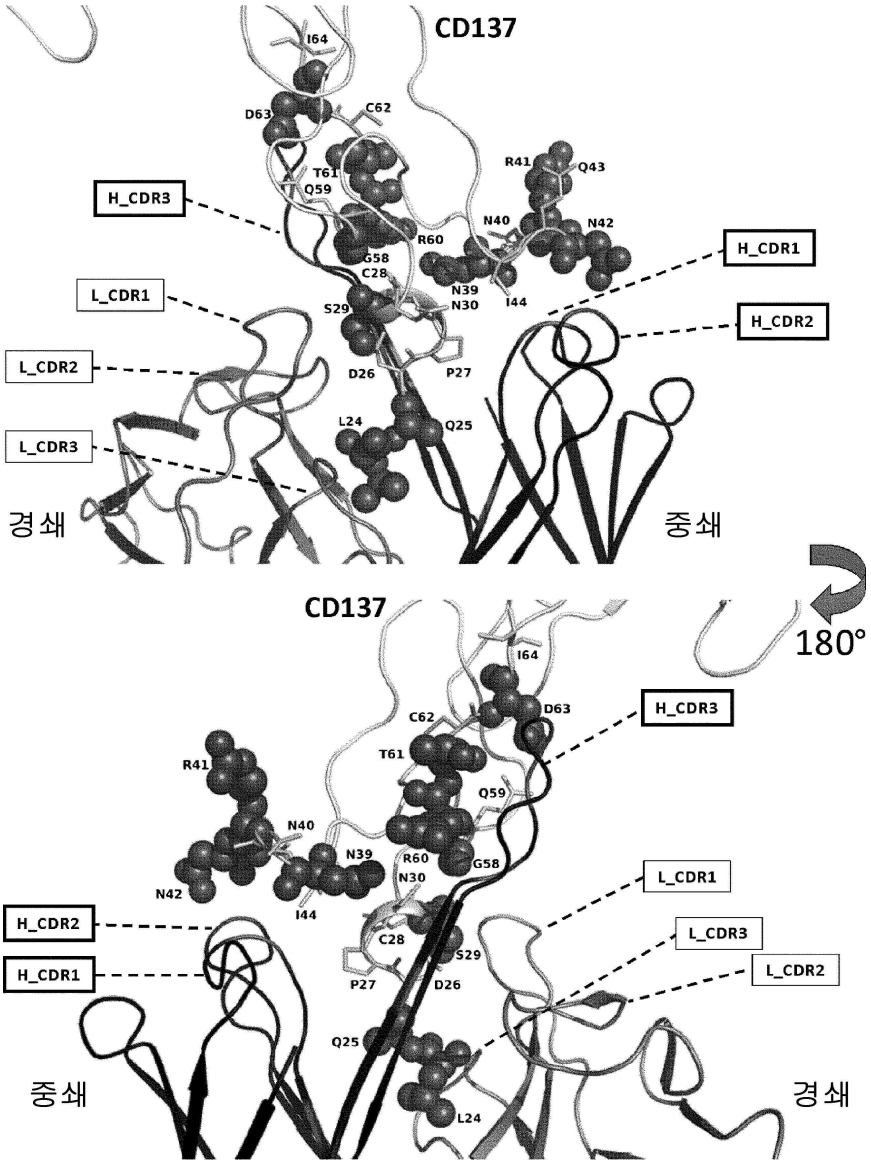
도면1



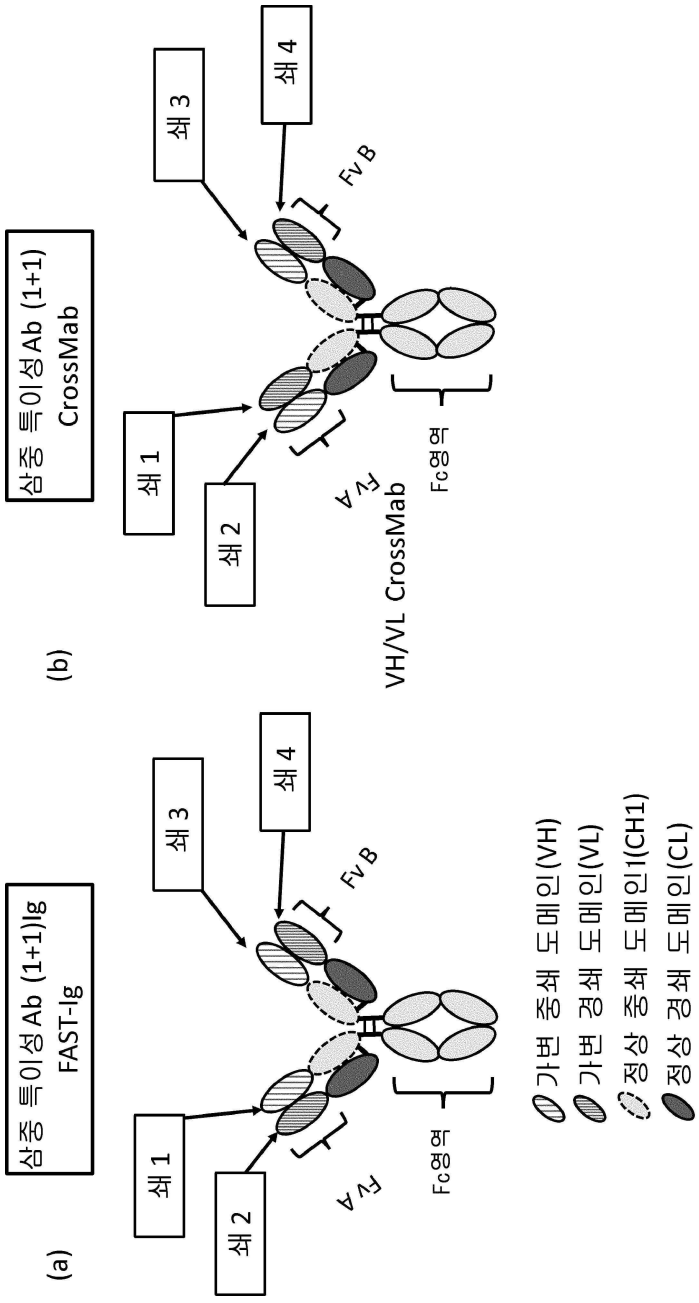
도면2



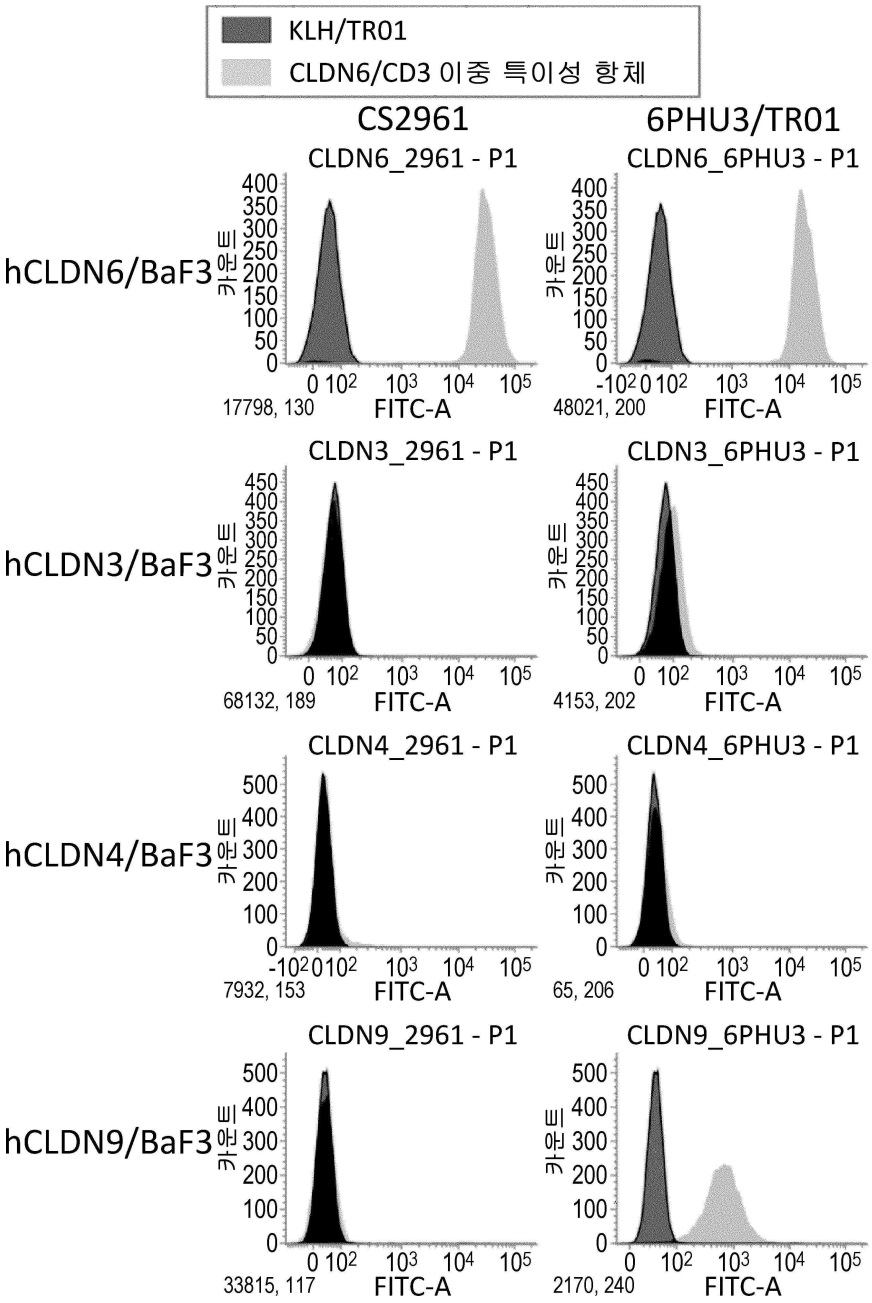
도면3


CD137
I64
D63
C62
T61
Q59
R41
Q43
N40
N42
R60
G58
C28
N39
N30
I44
S29
D26
P27
L24
Q25
H_CDR3
H_CDR1
H_CDR2
L_CDR1
L_CDR2
L_CDR3
경쇄
중쇄
180°
CD137
I64
D63
C62
T61
Q59
R41
N40
N39
R60
G58
N30
N42
I44
C28
S29
P27
D26
Q25
L24
H_CDR3
H_CDR2
H_CDR1
L_CDR1
L_CDR3
L_CDR2
중쇄
경쇄

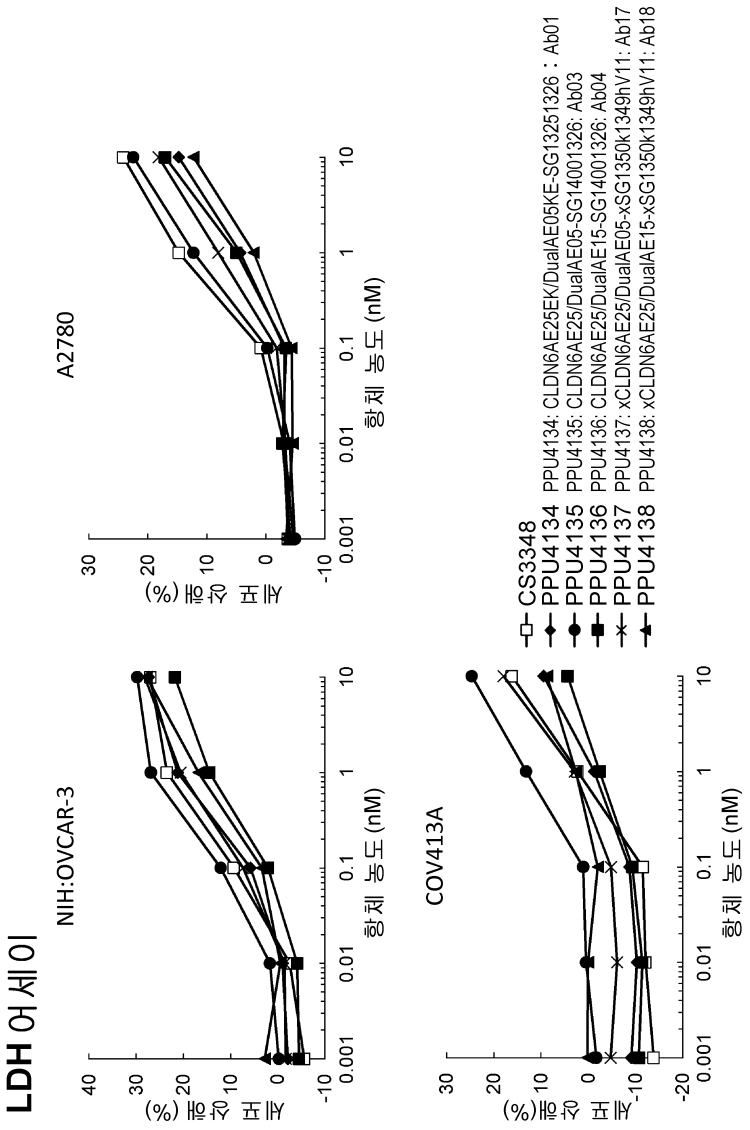
도면4


(a)
삼중 특이성Ab (1+1)Ig
FAST-Ig
쇄 1
쇄 2
쇄 3
쇄 4
FvA
FvB
Fc영역
(b)
삼중 특이성Ab (1+1)
CrossMab
쇄 1
쇄 2
쇄 3
쇄 4
FvA
FvB
Fc영역
VH/VL CrossMab
가변 중쇄 도메인(VH)
가변 경쇄 도메인(VL)
정상 중쇄 도메인1(CH1)
정상 경쇄 도메인(CL)

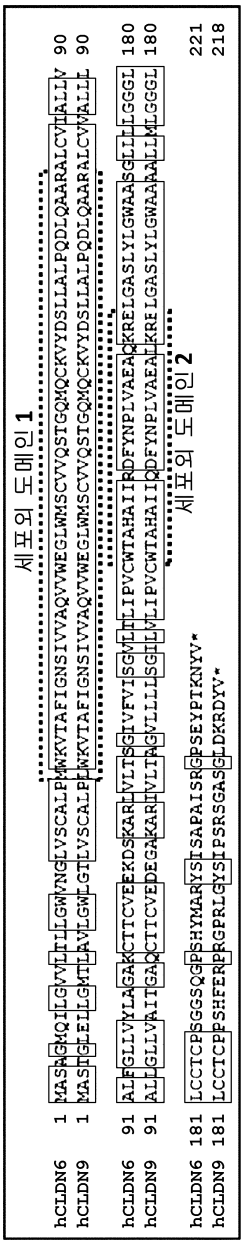
도면5


KLH/TR01
CLDN6/CD3 이중 특이성 항체
CS2961
6PHU3/TR01
hCLDN6/BaF3
hCLDN3/BaF3
hCLDN4/BaF3
hCLDN9/BaF3
CLDN6_2961 - P1
CLDN6_6PHU3 - P1
CLDN3_2961 - P1
CLDN3_6PHU3 - P1
CLDN4_2961 - P1
CLDN4_6PHU3 - P1
CLDN9_2961 - P1
CLDN9_6PHU3 - P1
카운트
FITC-A
17798, 130
48021, 200
68132, 189
4153, 202
7932, 153
65, 206
33815, 117
2170, 240

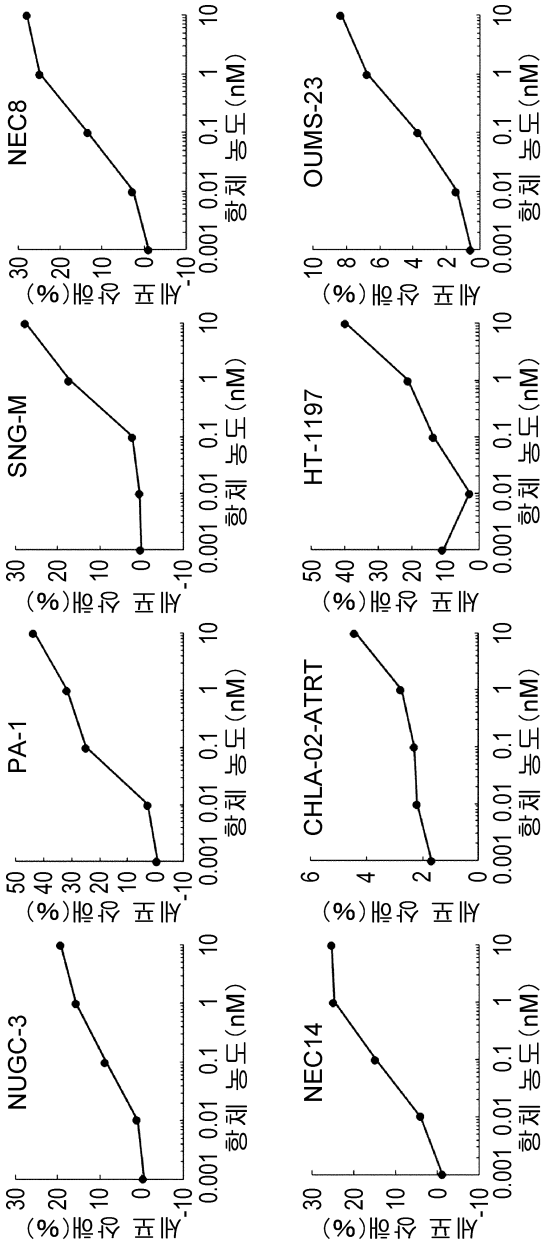
도면6


LDH 어세이
NIH:OVCAR-3
A2780
COV413A
세포 살해 (%)
항체 농도 (nM)
CS3348
PPU4134
PPU4135
PPU4136
PPU4137
PPU4138
PPU4134: CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326 : Ab01
PPU4135: CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326: Ab03
PPU4136: CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326: Ab04
PPU4137: xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11: Ab17
PPU4138: xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11: Ab18

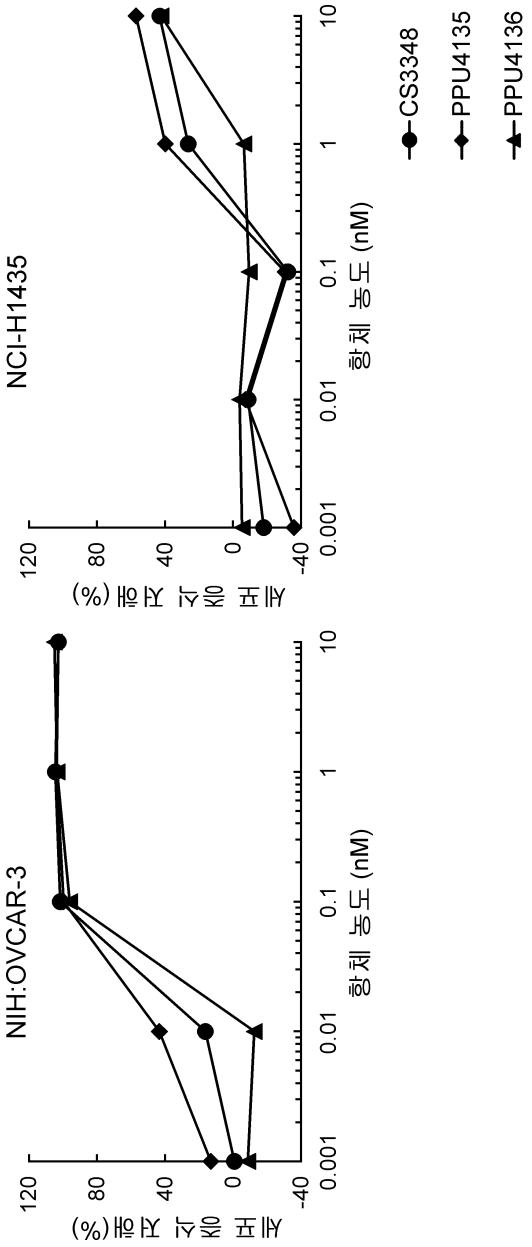
도면7


세포외 도메인 1
세포외 도메인 2
hCLDN6 1 MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVVALLV 90
hCLDN9 1 MASPGLEILGMTLAVLGWLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTGQMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVWALLL 90
hCLDN6 91 ALFGLLVYLAGAKCTIGVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGMLTLIPVCWTAHAIIRDFYNPLVAEAQKRELGASLYLGWAASGLLLLGGGL 180
hCLDN9 91 ALLGLLVAIIGAQCTICVEDEGAKARMVLIAGVLLLLSGILWLIPVCWTAHAIIQDFYNPLVAEALKRELGASLYLGWAAAALLLMGGGL 180
hCLDN6 181 LCCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAISRGPSEYPTKNYV* 221
hCLDN9 181 LCCTCPSHFERPRGPRLGYSIPSRSGASGLDKRDYV* 218

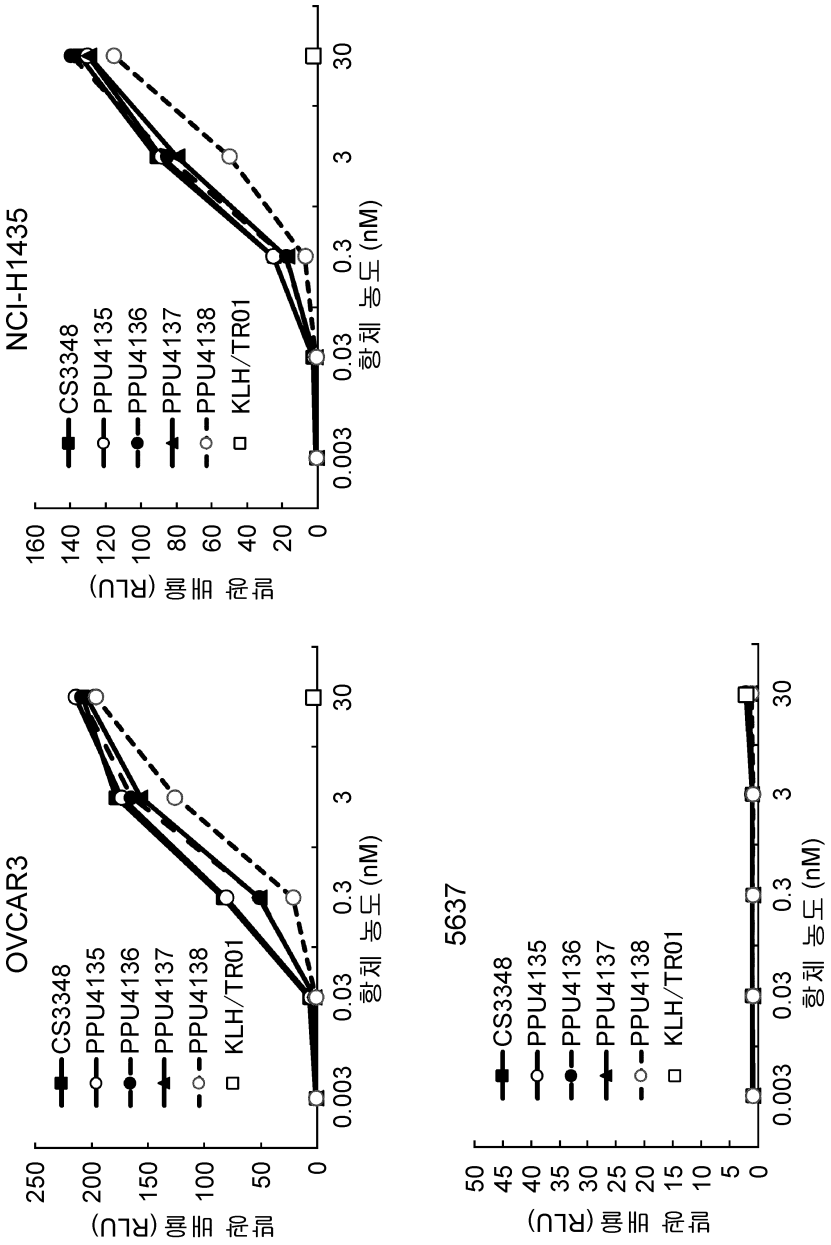
도면8


NUGC-3
PA-1
SNG-M
NEC8
NEC14
CHLA-02-ATRT
HT-1197
OUMS-23
세포 생존율(%)
항체 농도(nM)
0.001 0.01 0.1 1 10
-10 0 10 20 30
0 2 4 6
0 10 20 30 40 50
0 2 4 6 8 10

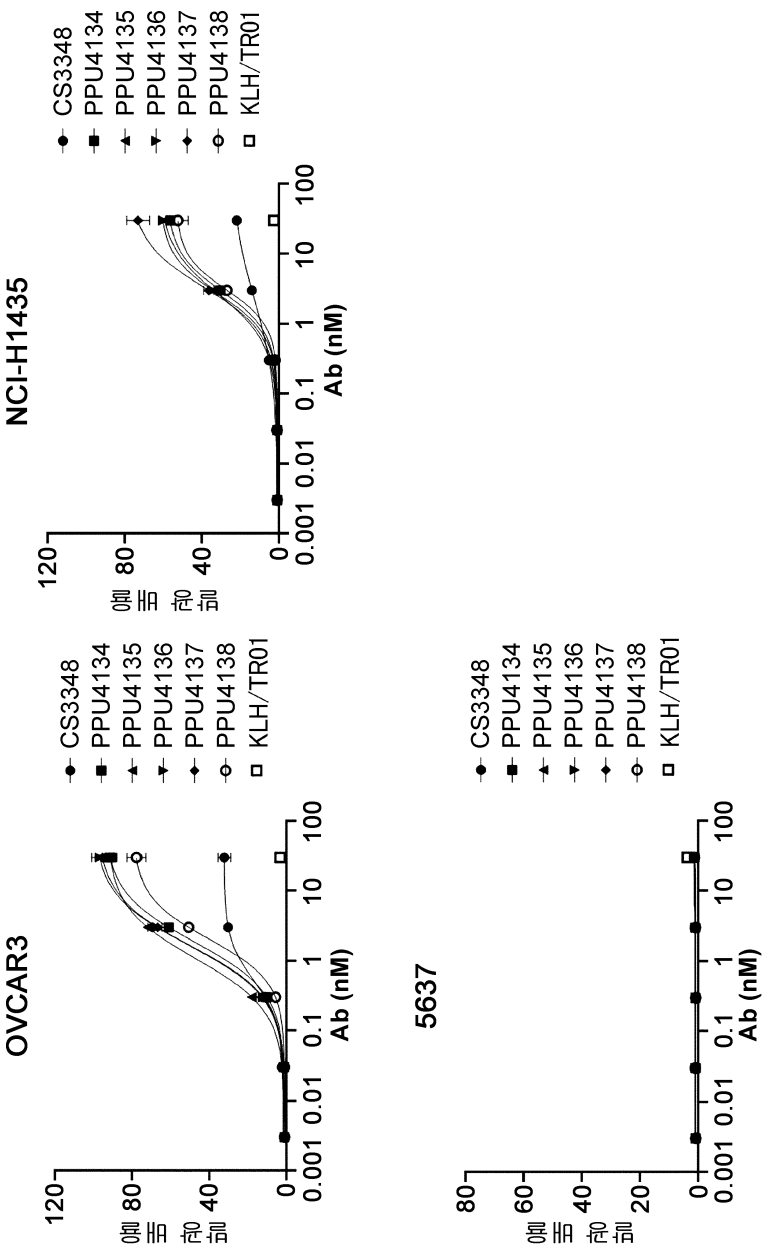
도면9


NCI-H1435
NIH:OVCAR-3
세포 증식 저해 (%)
120
80
40
0
-40
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 농도 (nM)
CS3348
PPU4135
PPU4136

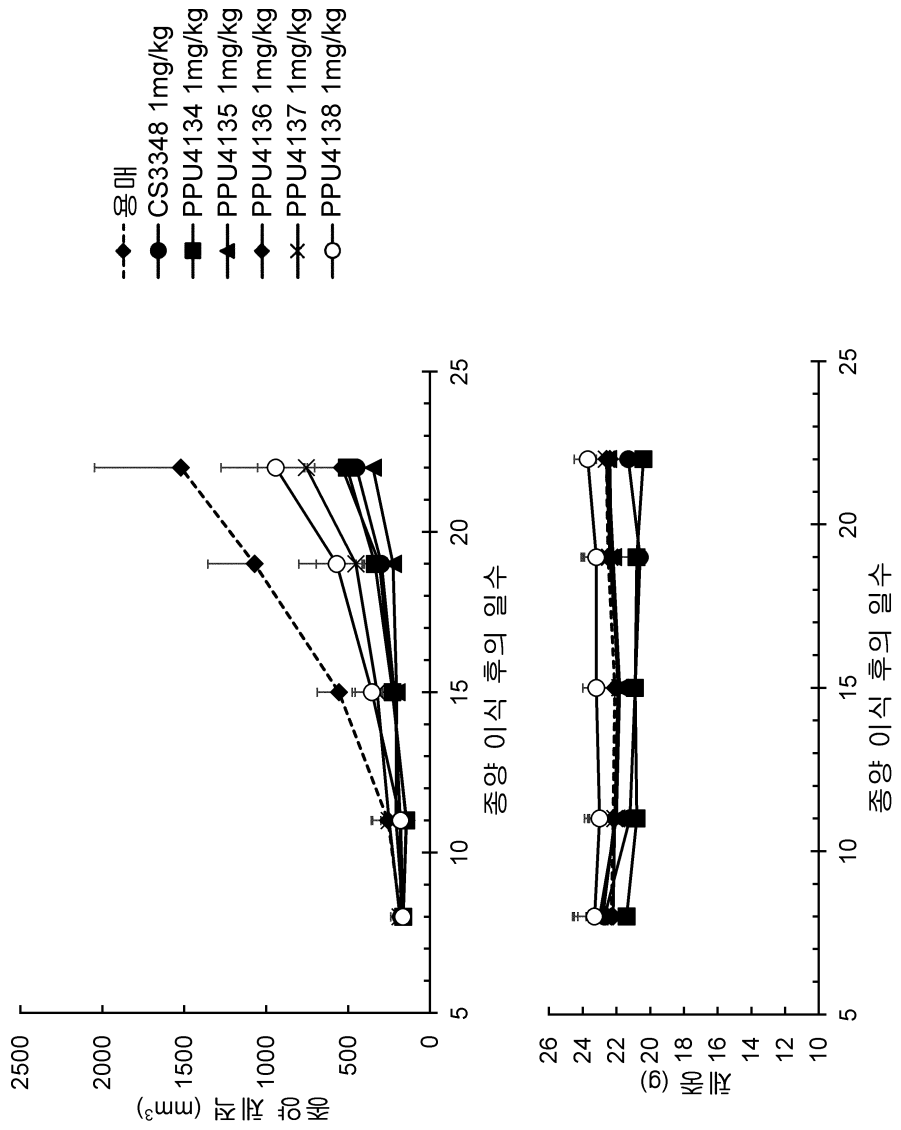
도면10


NCI-H1435
OVCAR3
5637
CS3348
PPU4135
PPU4136
PPU4137
PPU4138
KLH/TR01
발광 배율 (RLU)
항체 농도 (nM)
0.003
0.03
0.3
3
30

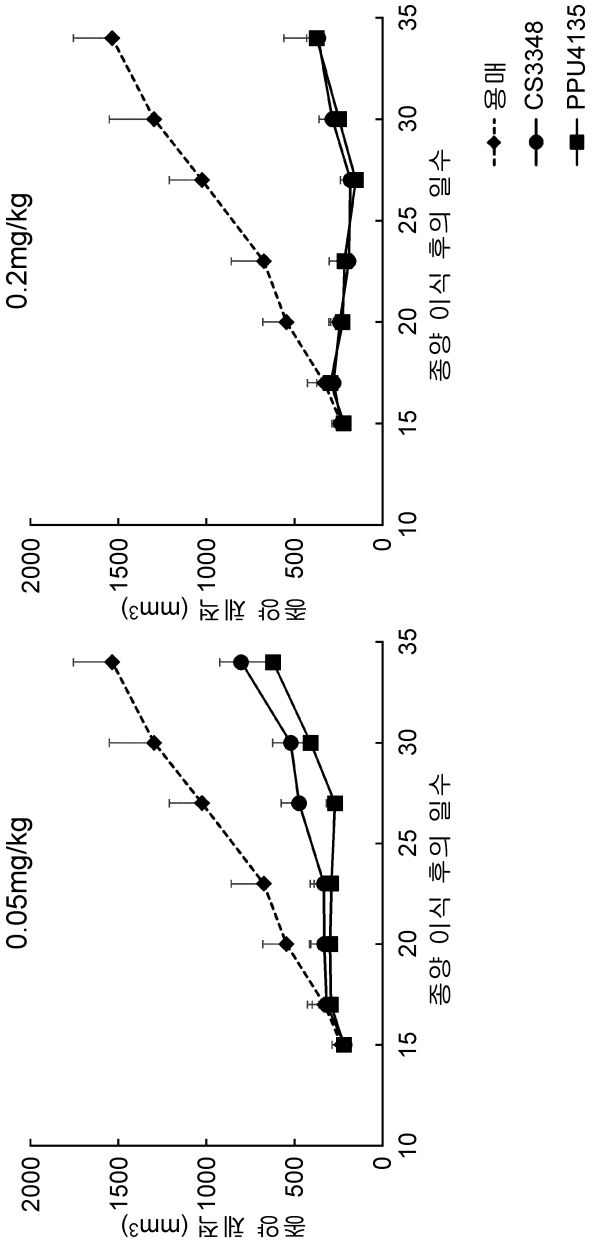
도면11


NCI-H1435
OVCAR3
5637
CS3348
PPU4134
PPU4135
PPU4136
PPU4137
PPU4138
KLH/TR01
발광 배율
Ab (nM)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
0
20
40
60
80
120

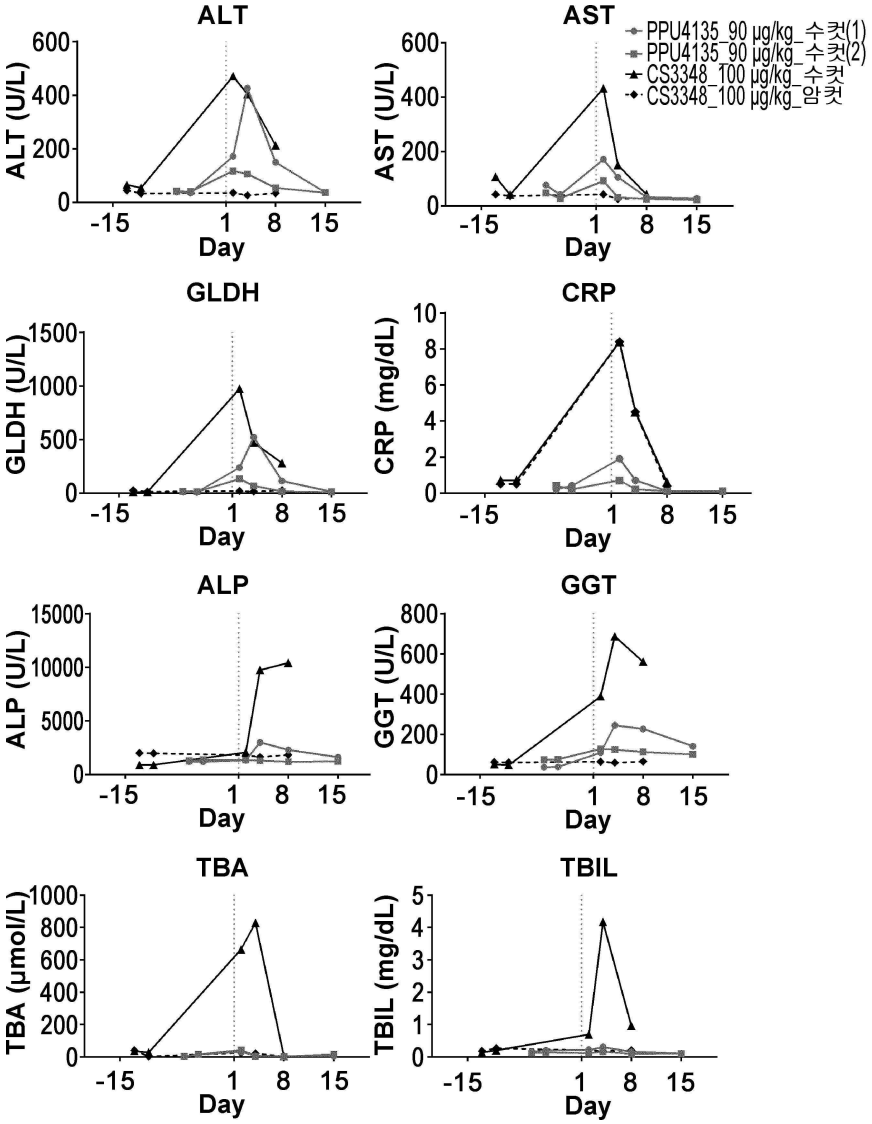
도면12


용매
CS3348 1mg/kg
PPU4134 1mg/kg
PPU4135 1mg/kg
PPU4136 1mg/kg
PPU4137 1mg/kg
PPU4138 1mg/kg
종양 부피 (mm³)
0
500
1000
1500
2000
2500
종양 이식 후의 일수
5
10
15
20
25
체중 (g)
10
12
14
16
18
20
22
24
26
종양 이식 후의 일수
5
10
15
20
25

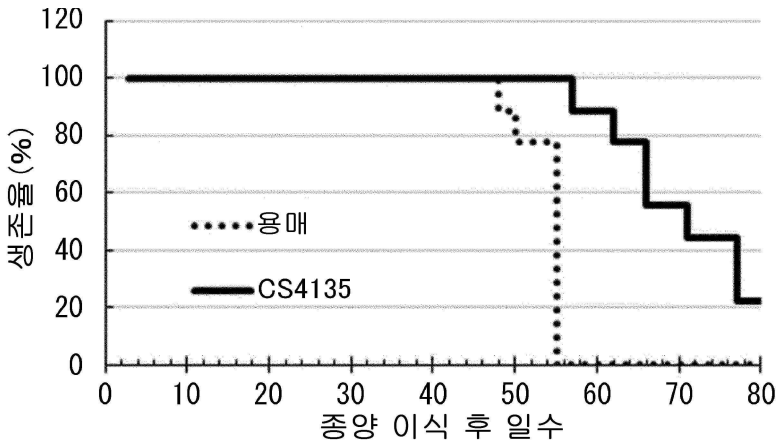
도면13


0.2mg/kg
0.05mg/kg
종양 체적 (mm3)
0
500
1000
1500
2000
10
15
20
25
30
35
중양 이식 후의 일수
용매
CS3348
PPU4135

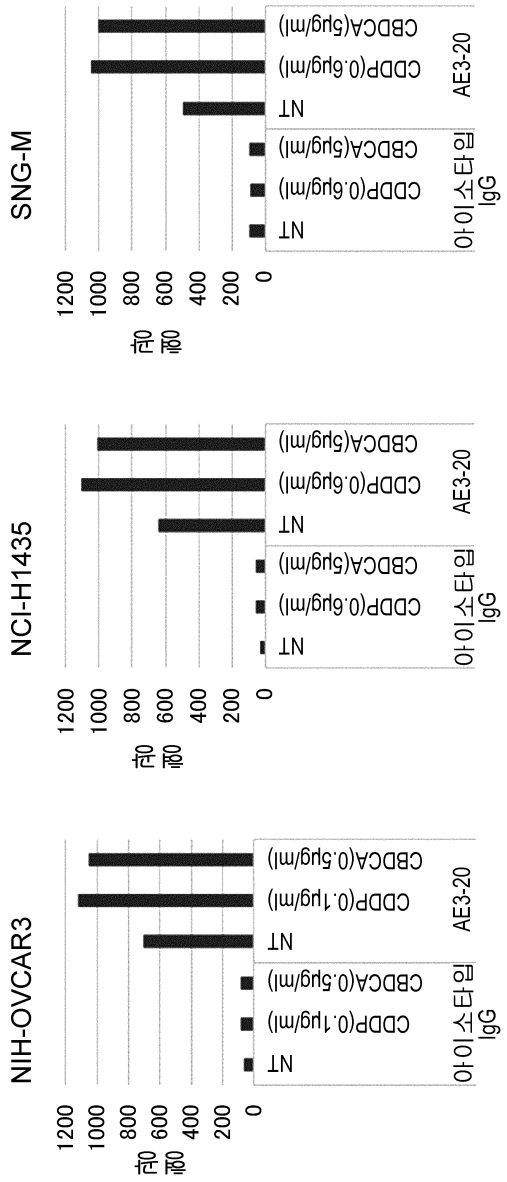
도면14


ALT
AST
GLDH
CRP
ALP
GGT
TBA
TBIL
ALT (U/L)
AST (U/L)
GLDH (U/L)
CRP (mg/dL)
ALP (U/L)
GGT (U/L)
TBA (μmol/L)
TBIL (mg/dL)
Day
-15
1
8
15
PPU4135_90 μg/kg_수컷(1)
PPU4135_90 μg/kg_수컷(2)
CS3348_100 μg/kg_수컷
CS3348_100 μg/kg_암컷

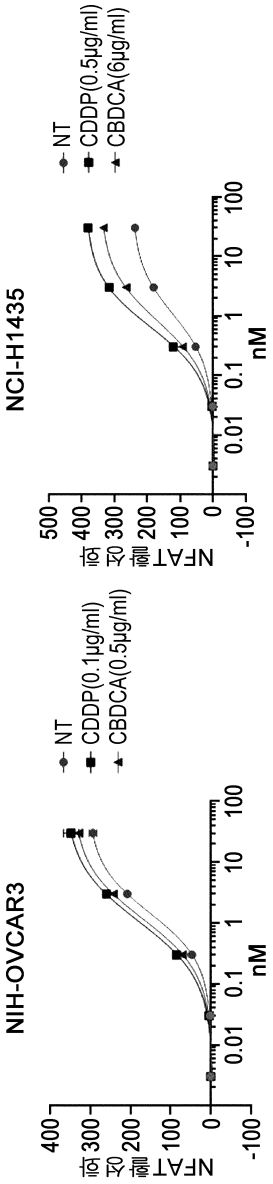
도면15


생존율 (%)
용매
CS4135
종양 이식 후 일수

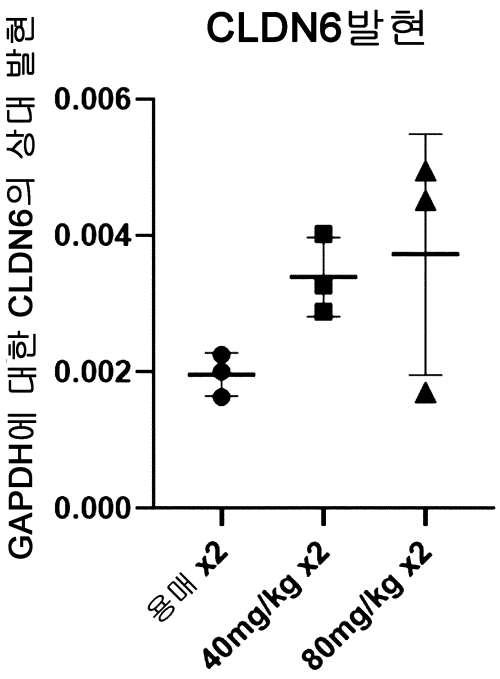
도면16


SNG-M
NCI-H1435
NIH-OVCAR3
세포수
0
200
400
600
800
1000
1200
아이소타입 IgG
AE3-20
NT
CDDP(0.6ug/ml)
CBDCA(5ug/ml)
NT
CDDP(0.1ug/ml)
CBDCA(0.5ug/ml)

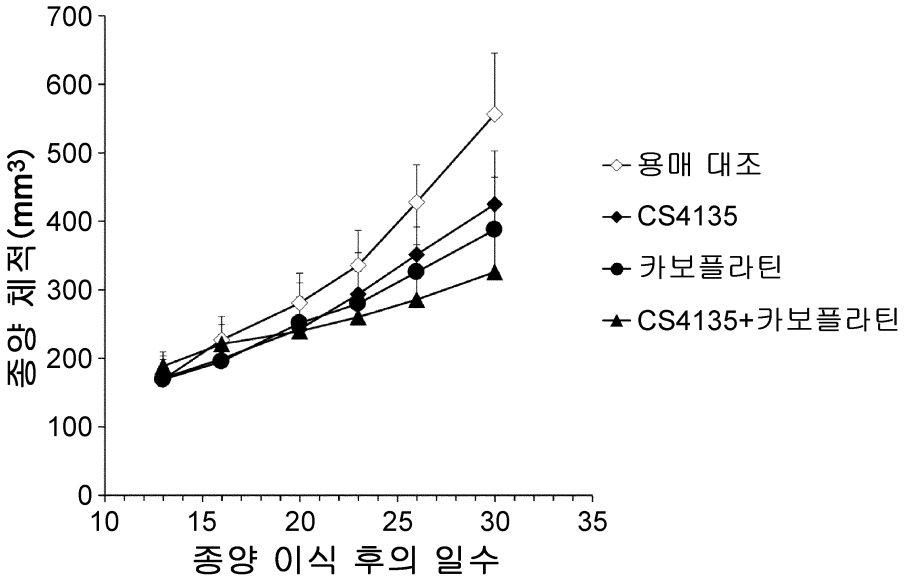
도면17


NCI-H1435
NT
CDDP(0.5μg/ml)
CBDCA(6μg/ml)
NFAT활성
500
400
300
200
100
0
-100
0.01
0.1
1
10
100
nM
NIH-OVCAR3
NT
CDDP(0.1μg/ml)
CBDCA(0.5μg/ml)
NFAT활성
400
300
200
100
0
-100
0.01
0.1
1
10
100
nM

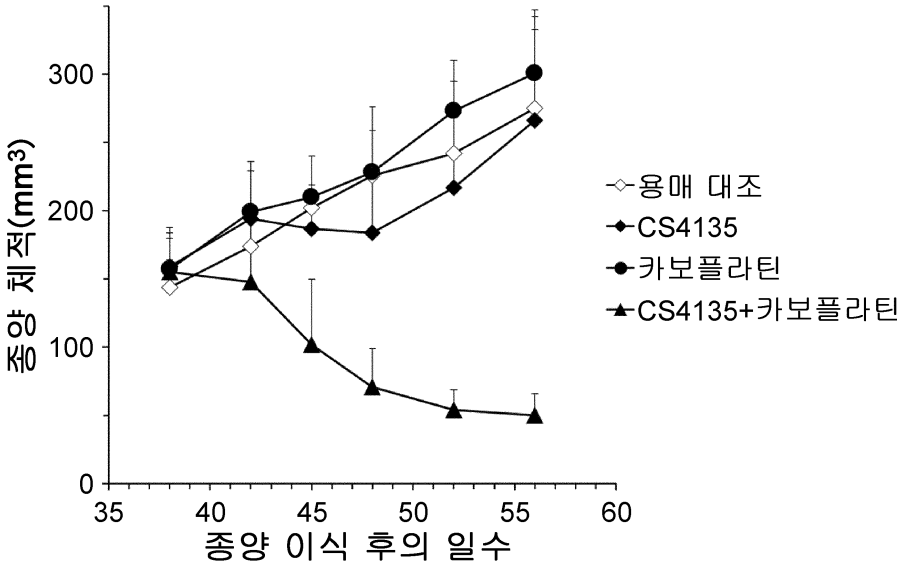
도면18


CLDN6발현
GAPDH에 대한 CLDN6의 상대 발현
0.006
0.004
0.002
0.000
용매 x2
40mg/kg x2
80mg/kg x2

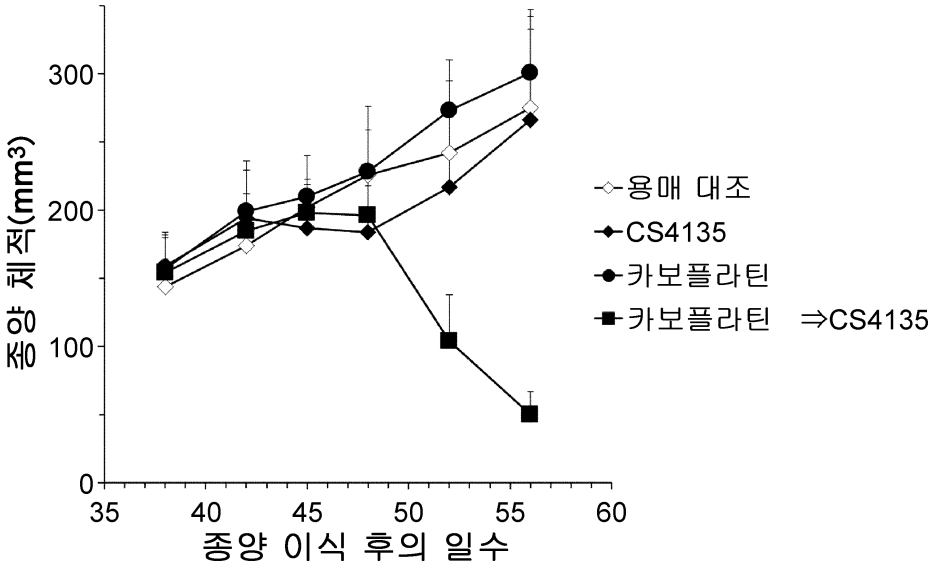
도면19


종양 체적(mm³)
700
600
500
400
300
200
100
0
10
15
20
25
30
35
종양 이식 후의 일수
용매 대조
CS4135
카보플라틴
CS4135+카보플라틴

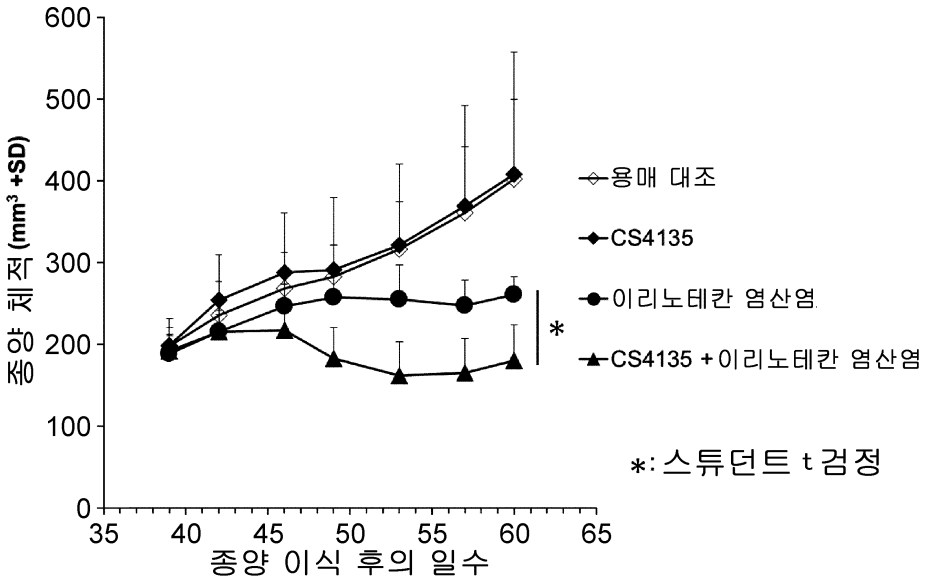
도면20


종양 체적(mm³)
300
200
100
0
35
40
45
50
55
60
종양 이식 후의 일수
용매 대조
CS4135
카보플라틴
CS4135+카보플라틴

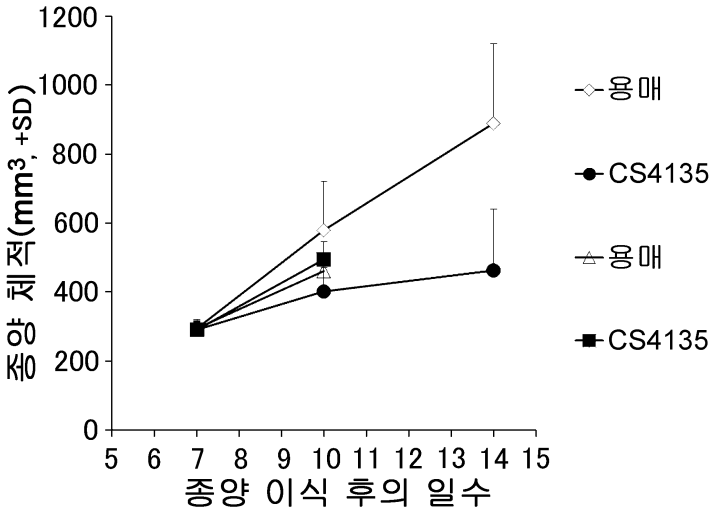
도면21


종양 체적(mm³)
300
200
100
0
35
40
45
50
55
60
종양 이식 후의 일수
용매 대조
CS4135
카보플라틴
카보플라틴 ⇒CS4135

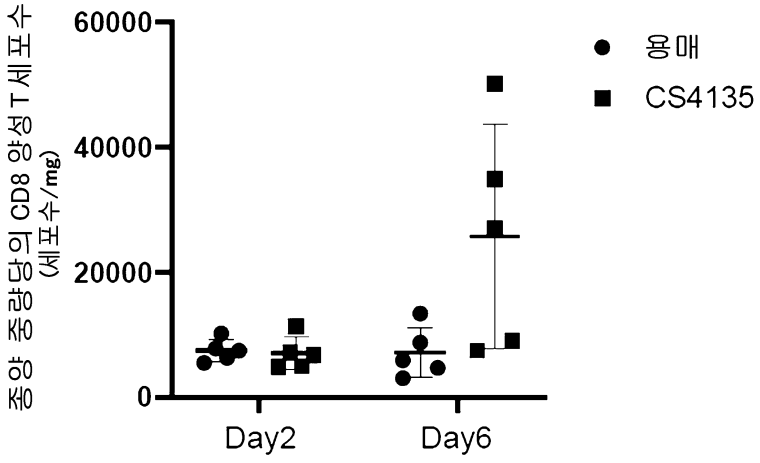
도면22



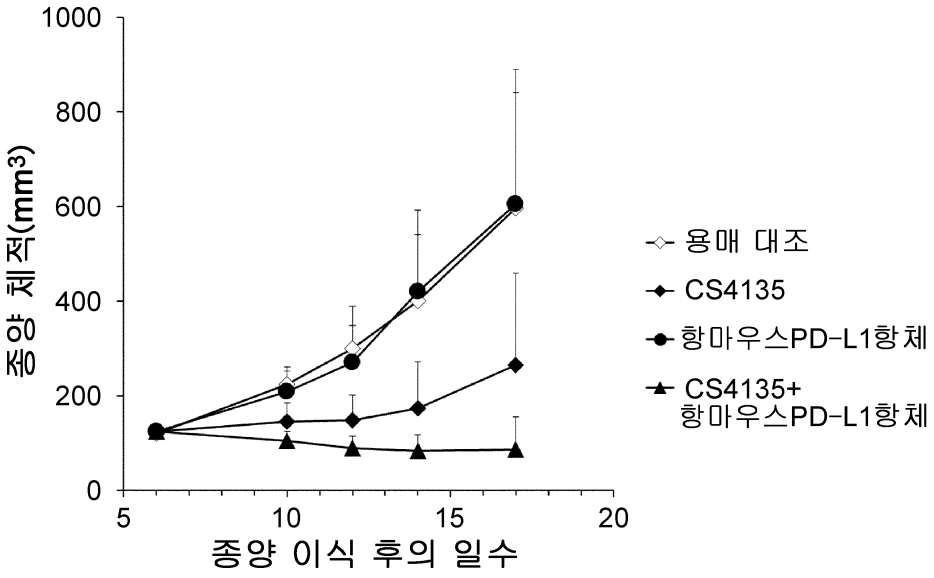
도면23



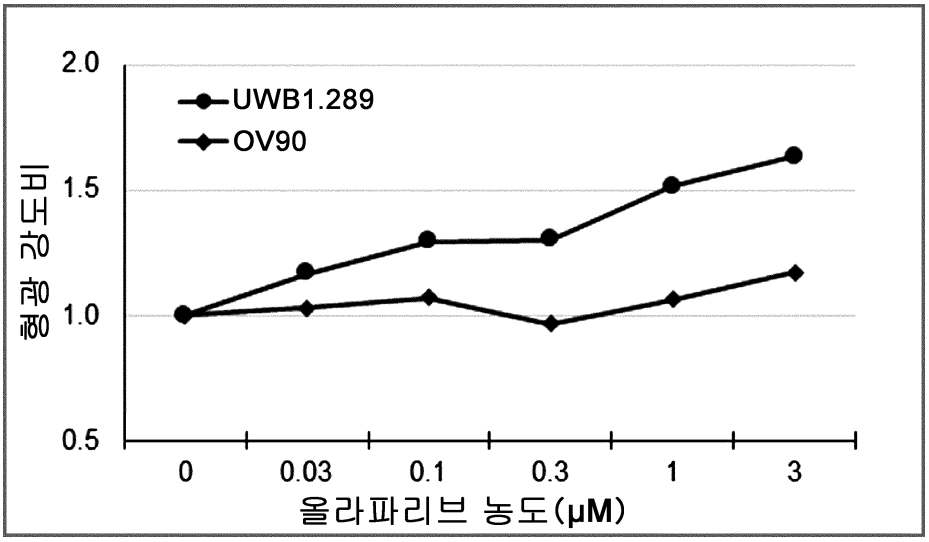
도면24



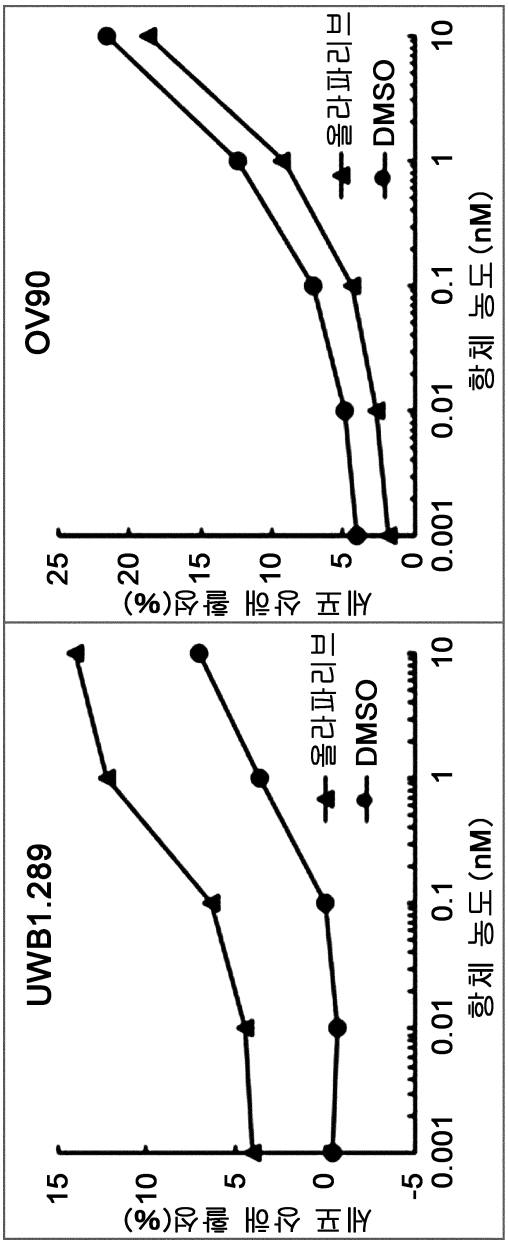
도면25


1000
800
600
400
200
0
종양 체적(mm³)
5
10
15
20
종양 이식 후의 일수
용매 대조
CS4135
항마우스PD-L1항체
CS4135+
항마우스PD-L1항체

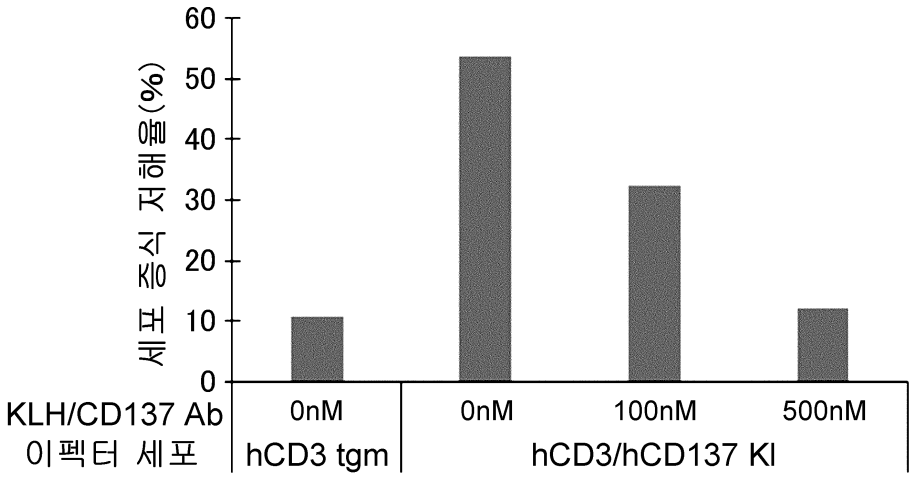
도면26


2.0
1.5
1.0
0.5
형광 강도비
UWB1.289
OV90
0
0.03
0.1
0.3
1
3
올라파리브 농도(μM)

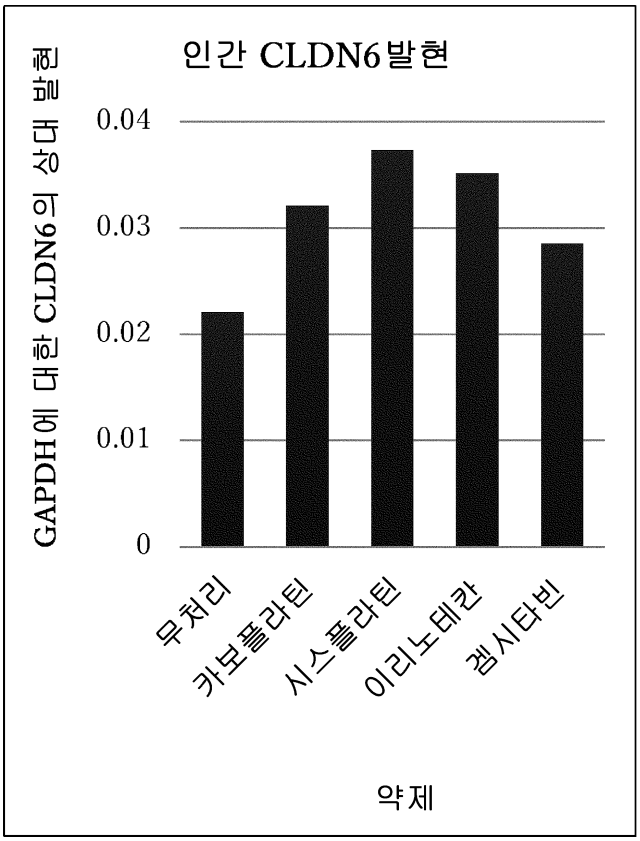
도면27


OV90
UWB1.289
올라파리브
DMSO
세포 생존율성(%)
항체 농도 (nM)
0.001
0.01
0.1
1
10
0
5
10
15
20
25
-5

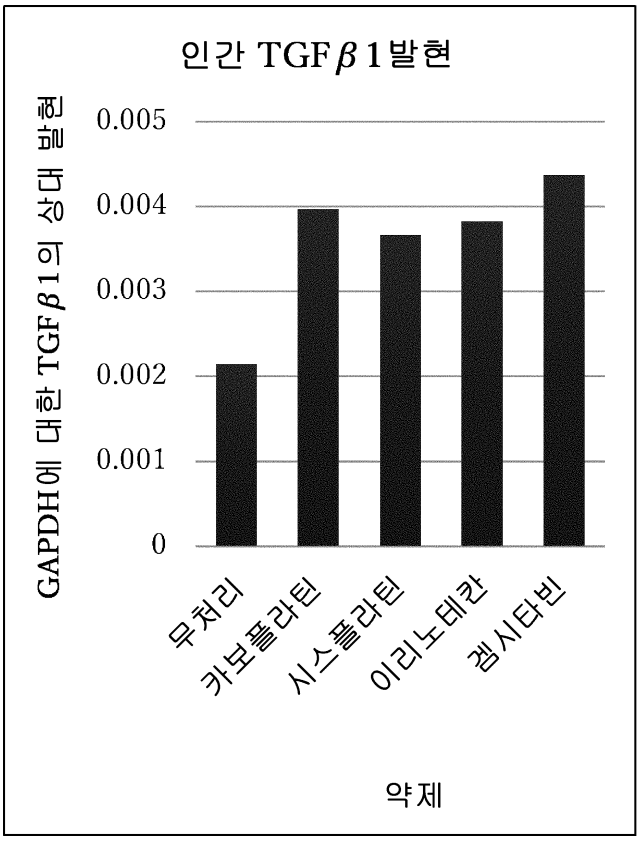
도면28


세포 증식 저해율(%)
60
50
40
30
20
10
0
KLH/CD137 Ab
이펙터 세포
0nM
hCD3 tgm
0nM
100nM
500nM
hCD3/hCD137 KI

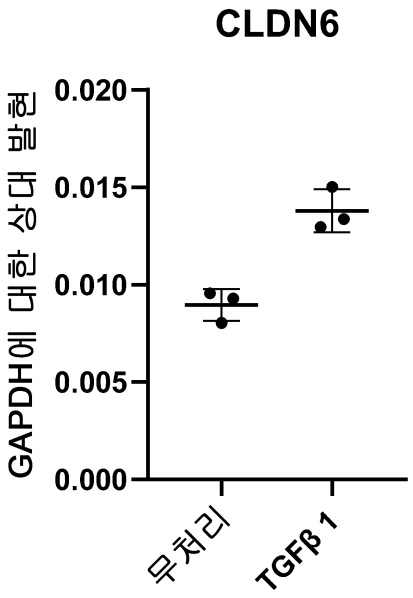
도면29


인간 CLDN6 발현
GAPDH에 대한 CLDN6의 상대 발현
0.04
0.03
0.02
0.01
0
무처리
카보플라틴
시스플라틴
이리노테칸
겜시타빈
약제

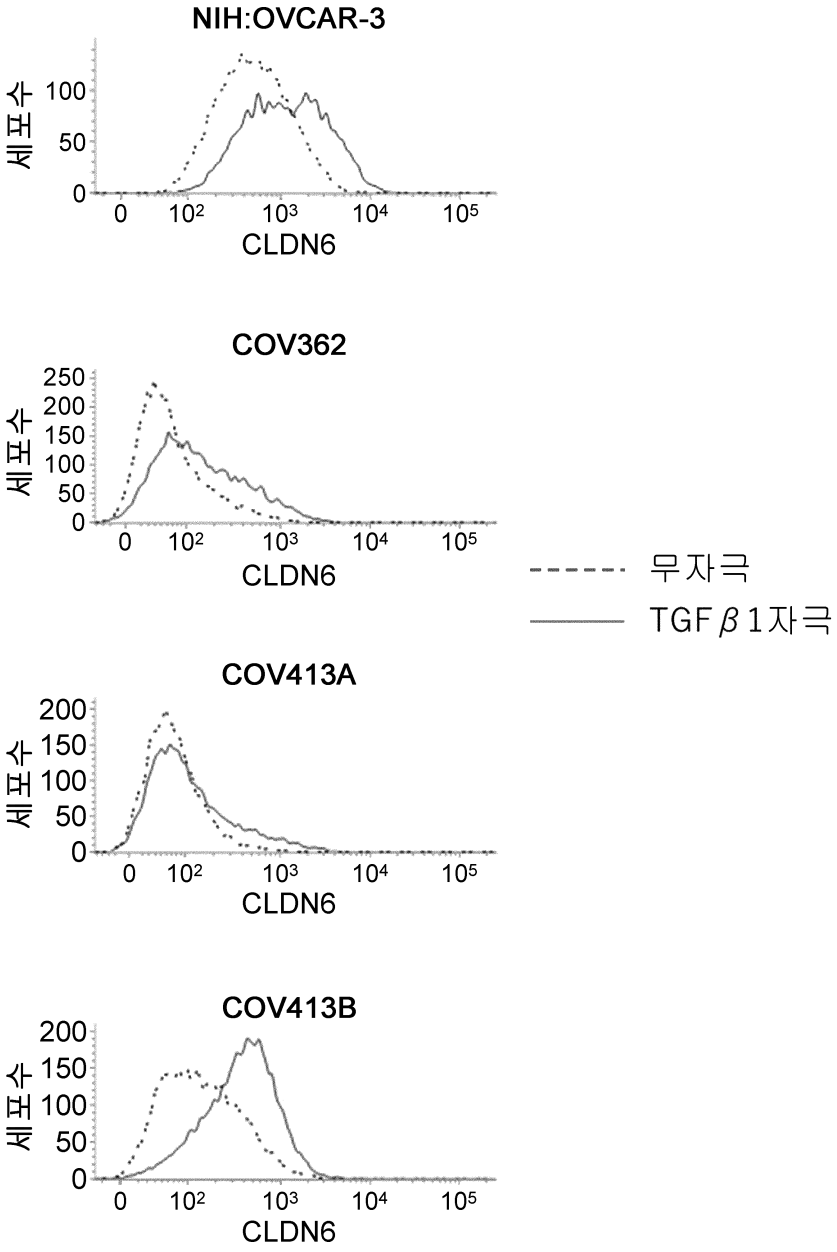
도면30


인간 TGFβ1 발현
GAPDH에 대한 TGFβ1의 상대 발현
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
무처리
카보플라틴
시스플라틴
이리노테칸
겜시타빈
약제

도면31



도면32


NIH:OVCAR-3
세포수
100
50
0
0
10²
10³
10⁴
10⁵
CLDN6
COV362
250
200
150
100
50
무자극
TGFβ1자극
COV413A
COV413B

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.