

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0166090

(43) 공개일자 2023년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61K 39/4611 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2023-7034148

(22) 출원일자(국제) 2022년04월06일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년10월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2022/023723

(87) 국제공개번호 WO 2022/216864

국제공개일자 2022년10월13일

(30) 우선권주장

63/171,520 2021년04월06일 미국(US)

63/311,913 2022년02월18일 미국(US)

(71) 출원인

테네오바이오, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 91320-1799, 싸우전드 옥스, 원
암젠 센터 드라이브

(72) 발명자

트린클라인 나단

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 스위트 320,
7999 게이트웨이 블러바드

해리스 캐서린

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 스위트 320,
7999 게이트웨이 블러바드

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 항-CD19 항체 및 CAR-T 구조체

(57) 요약

항-CD19 항체 (예를 들어, UniAbs™) 및 CAR-T 구조체가 이러한 항체 및 CAR-T 구조체의 제조 방법, 이러한 항체 및 CAR-T 구조체를 포함하는 조성물(약제학적 조성물 포함), 및 CD19의 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하기 위한 이러한 항체의 용도와 함께 개시된다.

대표도 - 도1

1열	2열	3열
클론 ID	Raji 세포	CHO_OFFtgt
370083	120.5	1.0
370034	80.3	1.0

(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

아반지노 브라이언

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 스위트 320,
7999 게이트웨이 블러바드

챙 카렌

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 스위트 320,
7999 게이트웨이 블러바드

데이비슨 로라

미국, 캘리포니아 94560, 뉴워크, 스위트 320,
7999 게이트웨이 블러바드

메디슨 블레어 비.

미국, 캘리포니아 92121, 샌디에고, 스위트 200,
9390 타운 센터 드라이브

루카스 조셉 에스.

미국, 캘리포니아 92121, 샌디에고, 스위트 200,
9390 타운 센터 드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 항체:

- (a) 서열번호 1에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR1 서열; 및/또는
- (b) 서열번호 2에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR2 서열; 및/또는
- (c) 서열번호 3 내지 4 중 어느 하나에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR3 서열.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은 인간 VH 프레임워크에 존재하는, 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

CH1 서열의 부재 하에서 중쇄 불변 영역 서열을 더 포함하는, 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

하기를 포함하는, 항체:

- (a) 서열번호 1 및 38로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR1 서열; 및/또는
- (b) 서열번호 2 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR2 서열; 및/또는
- (c) 서열번호 3 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR3 서열.

청구항 5

제4항에 있어서,

하기를 포함하는, 항체:

- (a) 서열번호 1 또는 서열번호 38을 포함하는 CDR1 서열; 및
- (b) 서열번호 2 또는 서열번호 39를 포함하는 CDR2 서열; 및
- (c) 서열번호 3 또는 서열번호 4를 포함하는 CDR3 서열.

청구항 6

제5항에 있어서,

하기를 포함하는, 항체:

- (a) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (b) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는
- (c) 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (d) 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는
- (e) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는

(f) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 5, 6, 40 및 41의 서열 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

서열번호 5, 6, 40, 및 41로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체.

청구항 9

제8항에 있어서,

서열번호 5의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체.

청구항 10

제8항에 있어서,

서열번호 6의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체.

청구항 11

제8항에 있어서,

서열번호 40의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체.

청구항 12

제8항에 있어서,

서열번호 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체.

청구항 13

CD19에 결합하는 항체로서, 인간 VH 프레임워크에 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, CDR 서열은 서열번호 1, 2, 3, 4, 38 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열에 2개 이하의 치환을 갖는 서열인, 항체.

청구항 14

제13항에 있어서,

인간 VH 프레임워크에 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하되, 상기 CDR 서열은 서열번호 1, 2, 3, 4, 38 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된, 항체.

청구항 15

하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 항체:

- (a) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (b) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는
- (c) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (d) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는

(e) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는

(f) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

다중특이적인, 항체.

청구항 17

제16항에 있어서,

이중특이적인, 항체.

청구항 18

제17항에 있어서,

2개의 상이한 CD19 단백질에 결합하는, 항체.

청구항 19

제17항에 있어서,

동일한 CD19 단백질 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는, 항체.

청구항 20

제16항에 있어서,

효과기 세포에 결합하는, 항체.

청구항 21

제16항에 있어서,

T-세포 항원에 결합하는, 항체.

청구항 22

제21항에 있어서,

CD3에 결합하는, 항체.

청구항 23

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

CAR-T 형식인, 항체.

청구항 24

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 CAR-T 세포로서, 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CAR-T 세포:

(a) 서열번호 1 또는 서열번호 38을 포함하는 CDR1 서열; 및

(b) 서열번호 2 또는 서열번호 39를 포함하는 CDR2 서열; 및

(c) 서열번호 3 또는 서열번호 4를 포함하는 CDR3 서열.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은 하기를 포함하는, CAR-T 세포:

- (a) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (b) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는
- (c) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (d) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는
- (e) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는
- (f) 인간 VH 프레임워크에 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 5, 6, 40 및 41의 서열 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 27

제26항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 5, 6, 40 및 41로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 28

제27항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 5의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 29

제27항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 6의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 30

제27항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 31

제27항에 있어서,

CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인은 서열번호 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는, CAR-T 세포.

청구항 32

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체, 또는 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 33

CD19의 발현을 특징으로 하는 B-세포 장애의 치료 방법으로서, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체, 제24

항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포, 또는 제32항의 약제학적 조성물을 상기 장애가 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 장애는 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)인, 방법.

청구항 35

제33항에 있어서,

상기 장애는 급성 림프구성 백혈병(ALL)인, 방법.

청구항 36

제33항에 있어서,

상기 장애는 비호지킨 림프종(NHL)인, 방법.

청구항 37

제33항에 있어서,

상기 장애는 전신 홍반성 루푸스(SLE)인, 방법.

청구항 38

제33항에 있어서,

상기 장애는 류마티스 관절염(RA)인, 방법.

청구항 39

제33항에 있어서,

상기 장애는 다발성 경화증(MS)인, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체 또는 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포의 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 41

제40항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 42

제41항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 43

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체를 생성하는 방법으로서, 제42항에 따른 세포를 항체의 발현이 허용되는 조건하에 성장시키는 단계, 및 세포 및/또는 세포가 성장하는 세포 배양 배지로부터 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체를 제조하는 방법으로서, CD19로 UniRat 동물을 면역화하는 단계, 및 CD19-결합 중쇄 서열을 확인하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 45

치료를 필요로 하는 개체에게 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체, 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포, 또는 제32항의 억제학적 조성물의 유효 용량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 46

치료를 필요로 하는 개체의 질환 또는 장애의 치료용 의약의 제조에 있어서, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체 또는 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포의 용도.

청구항 47

치료가 필요한 개체의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체, 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포, 또는 제32항의 억제학적 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체, 제24항 내지 제31항 중 어느 한 항의 CAR-T 세포, 또는 제32항의 억제학적 조성물, 및 사용 지침을 포함하는, 치료가 필요한 개체의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 키트.

청구항 49

제48항에 있어서,

적어도 하나의 추가 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 50

제49항에 있어서,

적어도 하나의 추가 시약은 화학요법제를 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 4월 6일자로 출원된 미국 가출원 제63/171,520호의 출원일에 대한 우선권 이익을 주장하며, 그 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다. 또한, 본 출원은 2022년 2월 18일자로 출원된 미국 가출원 제 63/311,913호의 출원일에 대한 우선권 이익을 주장하며, 그 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 항체(예를 들어, UniAbs™) 및 CD19에 결합하는 CAR-T 구조체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항체 및 CAR-T 구조체의 제조 방법, 이러한 항체 및 CAR-T 구조체를 포함하는 조성물(억제학적 조성물 포함), 및 CD19의 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하기 위한 이러한 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 분화 클러스터 19(CD19)

[0006] B-림프구 표면 항원 B4로도 알려진 CD19(UniProt P15391)는 모든 인간 B-세포에서 발현되지만, 형질 세포에서는 발현되지 않는 세포 표면 수용체이다. CD19는 세포질 신호전달 단백질을 막으로 동원하는 막횡단 단백질로, CD19/CD21 복합체 내에서 작용하여 B 세포 수용체 신호전달 경로의 역치를 감소시킨다. CD19는 상대적으로 큰 240개 아미노산의, 세포질 꼬리를 갖는다. 세포의 Ig-유사 도메인은 잠재적인 이황화물 연결 비-Ig 유사 도메인과 N-연결 탄수화물 추가 부위로 나누어진다. 세포질 꼬리에는 C-말단 근처에 적어도 9개의 티로신 잔기가 함유되어 있으며, 그 중 일부는 인산화된 것으로 나타났다. CD20 및 CD22와 함께, B-세포 계통에 대한 CD19의 제한된 발현은 B-세포 악성종양의 치료를 위한 매력적인 표적이 된다. CD19에 특이적인 많은 단클론 항체 및 항체-약물 접합체가 설명되어 있다(Naddafi et al. 2015, PMC4644525). 또한, 항-CD19 키메라 항원 수용체 T-세포는 백혈병 치료용으로 승인된 상태다(Sadelain et al. 2017, PMID: 29245005).

- [0007] 중쇄 항체
- [0008] 통상적인 IgG 항체에서, 중쇄와 경쇄의 회합은 부분적으로 경쇄 불변 영역과 중쇄의 CH1 불변 도메인 사이의 소수성 상호작용에 기인한다. 중쇄 프레임워크 2(FR2) 및 프레임워크 4(FR4) 영역에는 중쇄와 경쇄 사이의 소수성 상호작용에도 기여하는 추가 잔기가 있다.
- [0009] 그러나, 낙타과(낙타, 단봉 낙타, 및 라마를 포함하는 티로포다 아목)의 혈청에는 쌍을 이룬 H-사슬만으로 구성된 주요 유형의 항체(중쇄-단독 항체 또는 UniAbTM)가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 낙타과(*Camelidae*)(단봉낙타, 쌍봉 낙타, 글라마 라마, 과나코 라마, 알파카 라마, 및 비쿠냐 라마)의 UniAbTM는 단일 가변 도메인(VHH), 힌지 영역, 및 전형적 항체의 CH2 및 CH3 도메인과 매우 상동적인 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)으로 이루어진 고유의 구조를 가지고 있다. 이러한 UniAbTM에는 불변 영역의 제1 도메인(CH1)이 없으며, 이는 계놈에 존재하지만 mRNA 처리 중에 제거된다. CH1 도메인은 경쇄의 불변 도메인에 대한 고정 위치이므로, 이 도메인의 부재는 UniAbTM에서의 경쇄의 부재를 설명한다. 이러한 UniAbTM는 통상적인 항체 또는 이의 단편으로부터 3개의 CDR에 의해 항원 결합 특이성과 높은 친화성을 부여하도록 자연적으로 진화하였다(Muyldermans, 2001; *J Biotechnol* 74:277-302; Revets et al., 2005; *Expert Opin Biol Ther* 5:111-124). 상어와 같은 연골 어류는 또한, 폴리펩티드 경쇄가 없고 전부 중쇄로 구성된, IgNAR로 명명된 독특한 유형의 면역글로불린을 진화시켰다. IgNAR 분자는 분자 공학에 의해 조작되어, 단일 중쇄 폴리펩티드(vNAR)의 가변 도메인을 생성한다(문헌[Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003)]; [Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004)]; [Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)]).
- [0010] 경쇄가 없는 중쇄-단독 항체가 항원에 결합하는 능력은 1960년대에 확립되었다(문헌[Jaton et al. (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195]). 경쇄로부터 물리적으로 분리된 중쇄 면역글로불린은 사량체 항체에 비해 항원-결합 활성의 80%를 유지하였다. 문헌[Sitia et al. (1990) *Cell*, 60, 781-790]은 재배열된 마우스 μ 유전자로부터의 CH1 도메인의 제거가 포유류 세포 배양에서 경쇄가 없는 중쇄-단독 항체의 생성을 초래한다는 것을 입증하였다. 생성된 항체는 VH 결합 특이성과 효과기 기능을 유지하였다.
- [0011] 높은 특이성 및 친화성을 갖는 중쇄 항체는 면역화를 통해 다양한 항원에 대해 생성될 수 있으며(문헌[van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)]), VHH 부분은 쉽게 클로닝되고 효모에서 발현될 수 있다(문헌[Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)]). 이들의 발현, 용해도, 및 안정성 수준은 전형적인 F(ab) 또는 Fv 단편보다 훨씬 높다(문헌[Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)]).
- [0012] λ (람다) 경(L)쇄 유전자좌 및/또는 λ 및 κ (카파) L쇄 유전자좌가 기능적으로 침묵화된 마우스 및 이러한 마우스에 의해 생성된 항체는 미국 특허 제7,541,513호 및 제8,367,888호에 기재되어 있다. 마우스 및 래트에서의 중쇄-단독 항체의 재조합 생성은 예를 들어 문헌[WO 2006008548; 미국 출원 공개 20100122358호; 문헌[Nguyen et al., 2003, *Immunology*; 109(1), 93-101]; 문헌[Brüggenmann et al., *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90]; 및 문헌[Zou et al., 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283]에 보고된 바 있다. 징크 핑거 뉴클레아제의 배아 미세주입을 통한 녹아웃 래트의 생성은 문헌[Geurts et al., 2009, *Science*, 325(5939):433]에 기재되어 있다. 가용성 중쇄-단독 항체 및 이러한 항체를 생성하는 이중 중쇄 유전자좌를 포함하는 유전자식 설치류는 미국 특허 제8,883,150호 및 제9,365,655호에 기재되어 있다. 결합(표적화) 도메인으로서 단일-도메인 항체를 포함하는 CAR-T 구조체는 예를 들어 문헌[Iri-Sofla et al., 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641 및 문헌[Jamnani et al., 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378-386]에 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 양태는 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 항체를 포함한다: (a) 서열번호 1에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR1 서열; 및/또는 (b) 서열번호 2에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR2 서열; 및/

또는 (c) 서열번호 3 내지 4에 2개 이하의 치환을 갖는 CDR3 서열.

- [0014] 일부 실시형태에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은 인간 VH 프레임워크에 존재한다. 일부 실시형태에서, 항체는 CH1 서열의 부재 하에서 중쇄 불변 영역 서열을 추가로 포함한다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호 1 및 38로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열; 및/또는 (b) 서열번호 2 및 39로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 서열; 및/또는 (c) 서열번호 3 내지 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3 서열. 일부 실시형태에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호 1 또는 서열번호 38을 포함하는 CDR1 서열; 및 (b) 서열번호 2 또는 서열번호 39를 포함하는 CDR2 서열; 및 (c) 서열번호 3 또는 서열번호 4를 포함하는 CDR3 서열. 일부 실시형태에서, 항체는 하기를 포함한다: (a) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (b) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (c) 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (d) 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (e) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (f) 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열.
- [0016] 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 5, 6, 40, 및 41의 서열 중 어느 하나와 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 5, 6, 40, 및 41로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 5의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 6의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0017] 본 발명의 양태는 인간 VH 프레임워크에 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 항체를 포함하되, CDR 서열은 서열번호 1, 2, 3, 4, 38 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열에 2개 이하의 치환을 갖는 서열이다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 VH 프레임워크에 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하되, CDR 서열은 서열번호 1, 2, 3, 4, 38 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 본 발명의 양태는 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 항체를 포함한다: (a) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (b) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (c) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (d) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (e) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (f) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열.
- [0019] 일부 실시형태에서, 항체는 다중특이적이다. 일부 실시형태에서, 항체는 이중특이적이다. 일부 실시형태에서, 항체는 2개의 상이한 CD19 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 동일한 CD19 단백질 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 효과기 세포에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 T-세포 항원에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 CD3에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 CAR-T 형식이다.
- [0020] 본 발명의 양태는 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD19에 결합하는 세포외 항원-결합 도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 CAR-T 세포를 포함한다: (a) 서열번호 1 또는 서열번호 38을 포함하는 CDR1 서열; 및 (b) 서열번호 2 또는 서열번호 39를 포함하는 CDR2 서열; 및 (c) 서열번호 3 또는 서열번호 4를 포함하는 CDR3 서열.
- [0021] 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 (a) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (b) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (c) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (d) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열; 또는 (e) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열; 또는 (f) 인간 VH 프레임워크에서의, 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열을 포함한다.

- [0022] 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 5, 6, 40 및 41의 서열 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 5 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 5, 6, 40 및 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 6의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 결합하는 세포의 항원-결합 도메인은 서열번호 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 양태는 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 CAR-T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 양태는 CD19의 발현을 특징으로 하는 B-세포 장애의 치료 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 항체, CAR-T 세포, 또는 약제학적 조성물을 상기 장애가 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 장애는 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)이다. 일부 실시형태에서, 장애는 급성 림프구성 백혈병(ALL)이다. 일부 실시형태에서, 장애는 비호지킨 림프종(NHL)이다. 일부 실시형태에서, 장애는 전신 홍반성 루푸스(SLE)이다. 일부 실시형태에서, 장애는 류마티스 관절염(RA)이다. 일부 실시형태에서, 장애는 다발성 경화증(MS)이다.
- [0026] 본 발명의 양태는 본 명세서에 기재된 항체 또는 CAR-T 세포의 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 이러한 벡터를 포함하는 세포를 포함한다.
- [0027] 본 발명의 양태는 본원에 기재된 바와 같은 항체를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 세포를 항체의 발현이 허용되는 조건하에 성장시키는 단계, 및 세포 및/또는 세포가 성장하는 세포 배양 배지로부터 항체를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 양태는 본원에 기재된 바와 같은 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 CD19로 UniRat 동물을 면역화하는 단계, 및 CD19-결합 중쇄 서열을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 양태는 치료를 필요로 하는 개체에게 본원에 기재된 바와 같은 항체, CAR-T 세포, 또는 약제학적 조성물의 유효 용량을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 양태는 치료를 필요로 하는 개체의 질환 또는 장애의 치료용 의약의 제조에 있어서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 CAR-T 세포의 용도를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 양태는 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체, CAR-T 세포, 또는 약제학적 조성물, 및 사용 지침을 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체의 질환 또는 장애의 치료용 키트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 추가 시약을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 시약은 화학요법 약물을 포함한다.
- [0032] 이러한 양태 및 추가 양태는 실시예를 포함하여 본 명세서의 나머지 부분에서 추가로 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 CD19+ Raji 세포 및 음성 대조군 세포에 대해 표시된 항체 작제물에 대한 CD19 결합 데이터를 요약한 표이다.
- 도 2의 패널 A 및 B는, 표시된 세포 유형(Raji 및 Daudi)에서, 표시된 항체 작제물에 대한 항체 농도의 함수로서 세포 결합을 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 CD19+ Raji 및 Daudi 세포 상에의 표시된 항체 작제물의 세포 결합 EC50 값을 요약한 표이다.
- 도 4의 패널 A는 항-CD19 세포의 결합 도메인을 포함하는 CAR-T 구조체의 개략도이다.
- 도 4의 패널 B 및 C는 표시된 세포주에서 시험된, 항-CD19 세포의 결합 도메인을 포함하는 CAR 작제물의 항원-특이적 결합 및 활성화를 보여주는 그래프이다.
- 도 5의 패널 A 및 B는 모 VH-034 결합제와 비교하여, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포 사이의 비교 세포독성 결과를 보여주는 그래프이다.

도 6은 모 VH-034 결합제와 비교하여, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포에서의 개선된 시험관내 T-세포 활성화를 요약한 표이다.

도 7은 CAR 형식의 강화된 CD19 VH 결합제가 모 VH-034 결합제와 비교하여 T-세포에서 더 높은 CAR 수준을 발현한다는 것을 보여주는 표이다.

도 8은 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 개선된 생체내 T-세포 확장을 나타냄을 보여주는 표이다.

도 9는 T29D 또는 S55D CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH-034 CD19 결합제에 비해 더 적은 T-세포 소모를 나타냄을 보여주는 표이다.

도 10은 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 종양 제어를 나타냄을 보여주는 그래프이다.

도 11은 도 10에 보여진 결과와 동일한 결과를 나타내는, 압축되지 않은 개별 마우스 모델 데이터를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한 당업계의 기술 범위 내에 있는 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술들은 "분자 클로닝: 실험실 매뉴얼(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)", second edition (Sambrook et al., 1989); "올리고뉴클레오타이드 합성(Oligonucleotide Synthesis)" (M. J. Gait, ed., 1984); "동물 세포 배양(Animal Cell Culture)" (R. I. Freshney, ed., 1987); "효소학 방법(Methods in Enzymology)" (Academic Press, Inc.); "분자 생물학의 현 프로토콜(Current Protocols in Molecular Biology)" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: 중합효소 연쇄 반응(The Polymerase Chain Reaction)", (Mullis et al., ed., 1994); "분자 클로닝에 대한 실용 가이드(A Practical Guide to Molecular Cloning)" (Perbal Bernard V., 1988); "파지 디스플레이: 실험실 매뉴얼(Phage Display: A Laboratory Manual)" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, 항체 사용: 실험실 매뉴얼(Using Antibodies: A Laboratory Manual): Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); and Harlow and Lane, 항체(Antibodies): A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)와 같은 문헌에 자세히 설명되어 있다.
- [0035] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 달리 명시하지 않는 한, 해당 범위의 상한과 하한 사이에서 하한의 10분의 1 단위까지의 각 중간 값 및 명시된 범위 내의 임의의 다른 명시된 값 또는 중간 값은 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 더 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있는 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한도 명시된 범위에서 임의의 특별히 배제된 한계에 따라 본 발명 내에 포함된다. 명시된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계의 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.
- [0036] 달리 표시하지 않는 한, 본원의 항체 잔기는 Kabat 넘버링 시스템(예를 들어, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))에 따라 넘버링된다.
- [0037] 하기 설명에서, 본 발명의 보다 철저한 이해를 제공하기 위해 다수의 특정 세부사항이 제시된다. 그러나, 이러한 특정 세부사항 중 하나 이상 없이 본 발명이 실시될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 예에서, 당업자에게 잘 알려진 특징 및 절차는 본 발명을 모호하게 하는 것을 피하기 위해 설명되지 않았다.
- [0038] 특허 출원 및 간행물을 포함하여 본 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌은 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0039] I. 정의
- [0040] "포함하는"은 언급된 요소가 조성물/방법/키트에 필요하지만 청구범위 내에서 조성물/방법/키트 등을 형성하기 위해 다른 요소가 포함될 수 있음을 의미한다.
- [0041] "~로 본질적으로 이루어진"은 대상 발명의 기본적인고 신규한 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 명시된 재료 또는 단계로 기술된 조성물 또는 방법의 범위를 제한하는 것을 의미한다.
- [0042] "~로 이루어진"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 조성물, 방법, 또는 키트에서 제

외함을 의미한다.

- [0043] 본원의 항체 잔기는 Kabat 넘버링 시스템 및 EU 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다. 가변 도메인의 잔기(대략적으로 중쇄의 잔기 1 내지 113)를 언급하는 경우 Kabat 넘버링 시스템이 일반적으로 사용된다(예를 들어, 문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 언급하는 경우 "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"가 일반적으로 사용된다(예를 들어, 상기 Kabat 등의 문헌에 보고된 EU 인덱스). "Kabat에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급하지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 Kabat 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다.
- [0044] 면역글로불린이라고도 하는 항체는 통상적으로 적어도 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함하며, 중쇄 및 경쇄의 아미노 말단 도메인은 서열이 가변적이므로, 일반적으로 가변 영역 도메인, 또는 가변 중쇄(VH) 또는 가변 경쇄(VL) 도메인이라고 한다. 두 도메인은 통상적으로 회합하여 특이적 결합 영역을 형성하고, 본원에서 논의하겠지만, 특이적 결합은 중쇄-단독 가변 서열로도 얻을 수 있으며, 다양한 비천연 배열의 항체가 당업계에서 알려져 있고 사용된다.
- [0045] "기능적" 또는 "생물학적으로 활성인" 항체 또는 항원 결합 분자(본 명세서에 기재된 중쇄-단독 항체 및 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 3쇄 항체유사 분자(TCA) 포함)는 구조적, 조절적, 생화학적, 또는 생물물리학적 이벤트에서 천연 활성 중 하나 이상을 발휘할 수 있는 것이다. 예를 들어, 기능적 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들어 TCA는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 가질 수 있으며, 결합은 결과적으로 신호 전달 또는 효소 활성화와 같은 세포 또는 분자 이벤트를 유도하거나 변경할 수 있다. 기능적 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들어 TCA는 또한 수용체의 리간드 활성화를 차단하거나 작용제 또는 길항제로 작용할 수 있다. 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들어 TCA가 천연 활성 중 하나 이상을 발휘하는 능력은 폴리펩티드 사슬의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 비롯한 여러 요인에 따라 달라진다.
- [0046] 본원에서 "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 단량체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 중쇄-단독 항체, 3쇄 항체, TCA, 단일쇄 Fc(scFv), 나노바디 등을 포함하며, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편도 포함한다(문헌[Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861]). 항체는 무인 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 다른 종에서 유래된 항체일 수 있다.
- [0047] "항체"라는 용어는 전장 중쇄, 전장 경쇄, 온전한 면역글로불린 분자, 또는 이러한 폴리펩티드 중 임의의 것의 면역학적 활성 부분, 즉 관심 표적의 항원 또는 이의 일부에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 지칭할 수 있으며, 이러한 표적은 암세포, 또는 자가면역 질환과 관련된 자가면역 항체를 생성하는 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본원에 개시된 면역글로불린은 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2), 또는 서브클래스(감소 또는 강화된 효과기 세포 활성을 제공하는 변경된 Fc 부분을 갖는 조작된 서브클래스 포함)일 수 있다. 대상 항체의 경쇄는 카파 경쇄(V카파) 또는 람다 경쇄(V람다)일 수 있다. 면역글로불린은 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 일 양태에서, 면역글로불린은 주로 인간에서 유래된 것이다.
- [0048] 본원에서 사용되는 "단클론 항체"라는 용어는 실질적으로 동종인 항체의 집단(즉, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생적 돌연변이를 제외하고는, 집단을 구성하는 개별 항체가 동일함)으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 단클론 항체는 매우 특이적으로, 단일 항원 부위에 대해 유도된다. 또한, 일반적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 포함하는 통상적인 (다클론) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 유도된다. 본 발명에 따른 단클론 항체는 문헌[Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495]에 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어 재조합 단백질 생산 방법(예를 들어, 미국 특허 번호 제4,816,567호 참조)을 통해 제조될 수도 있다.
- [0049] 항체와 관련하여 사용되는 "가변"이라는 용어는 항체 가변 도메인의 특정 부분이 항체 간에 서열에 있어 광범위하게 다르고 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 나타낸다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포되어 있지는 않다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 모두에서 초가변 영역이라고 하는 세 부분에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역(FR)이라고 한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 β -시트 구조를 연결(일부 경우에는 그 일부를

형성)하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 주로 β -시트 배열을 채택하는, 4개의 FR을 포함한다. 각 쌍의 초가변 영역은 FR에 의해 아주 근접하게 함께 결합되고, 다른 쌍의 초가변 영역과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포매개 세포독성(ADCC)에 대한 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.

[0050] 본원에서 사용되는 "초가변 영역"이라는 용어는 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어, 중쇄 가변 도메인의 잔기 31~35 (H1), 50~65 (H2) 및 95~102 (H3); 문헌[Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 중쇄 가변 도메인의 "초가변 루프" 잔기 26~32 (H1), 53~55 (H2) 및 96~101 (H3)로부터의 잔기; 문헌[Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]를 포함한다. 일부 실시형태에서, "CDR"은 문헌[Lefranc, MP et al., *IMGT, the international ImMuNoGeneTics database, Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999)]에 정의된 바와 같은 항체의 상보성 결정 영역을 의미한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역/CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0051] 예시적인 CDR 명칭이 본원에 제시되어 있지만; 당업자는 Kabat 정의를 포함하여 CDR의 다수의 정의가 일반적으로 사용된다는 것을 이해할 것이며(문헌["Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010;47:694-700]), 이는 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 일반적으로 사용된다. Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 한다(문헌[Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989; 342:877-883]). 관심 있는 대체 CDR 정의에는 문헌[Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670]; 문헌[Ofra et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes." *J Immunol.* 2008;181:6230-6235]; [Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004;17:132-143]; 및 [Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995;9:133-139.]에 개시된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 이들 각각은 본원에 참고로 구체적으로 포함되어 있다.

[0052] 용어 "중쇄-단독 항체" 및 "중쇄 항체"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되며, 가장 광범위한 의미에서, 항체, 또는 항체의 하나 이상의 부분, 예를 들어, 통상적인 항체의 경쇄를 결여하는 항체의 하나 이상의 아암을 지칭한다. 이 용어는 구체적으로, CH1 도메인의 부재하에 VH 항원 결합 도메인 및 CH2 및 CH3 불변 도메인을 포함하는 동종이량체 항체; 이러한 항체의 기능적 (항원 결합) 변이체, 가용성 VH 변이체, 1개의 가변 도메인(V-NAR) 및 5개의 C-유사 불변 도메인(C-NAR)을 포함하는 Ig-NAR 및 이의 기능적 단편; 및 가용성 단일 도메인 항체(sUniDab™)를 제한 없이 포함한다. 일 실시형태에서, 중쇄-단독 항체는 프레임워크 1, CDR1, 프레임워크 2, CDR2, 프레임워크 3, CDR3 및 프레임워크 4로 구성된 가변 영역 항원-결합 도메인으로 구성된다. 다른 실시형태에서, 중쇄-단독 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부 및 CH2 및 CH3 도메인으로 구성된다. 다른 실시형태에서, 중쇄-단독 항체는 항원 결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부, 및 CH2 도메인으로 구성된다. 추가 실시형태에서, 중쇄-단독 항체는 항원 결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부, 및 CH3 도메인으로 구성된다. CH2 및/또는 CH3 도메인이 절단된 중쇄-단독 항체가 또한 본원에 포함된다. 추가 실시형태에서, 중쇄는 항원 결합 도메인, 및 적어도 하나의 CH(CH1, CH2, CH3, 또는 CH4) 도메인으로 구성되지만, 힌지 영역은 없다. 중쇄-단독 항체는 2개의 중쇄가 이황화 결합되거나 달리 공유적으로 또는 비공유적으로 서로 부착된 이량체 형태일 수 있다. 중쇄-단독 항체는 IgG 서브클래스에 속할 수 있지만, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 서브클래스와 같은 다른 서브클래스도 본 명세서에 포함된다. 특정 실시형태에서, 중쇄 항체 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 특히 IgG1 또는 IgG4 서브타입을 갖는다. 일 실시형태에서, 중쇄 항체는 CH 도메인 중 하나 이상이 항체의 효과기 기능을 변경하도록 변형된 IgG4 서브타입을 갖는다. 일 실시형태에서, 중쇄 항체는 CH 도메인 중 하나 이상이 항체의 효과기 기능을 변경하도록 변형된 IgG1 또는 IgG4 서브타입을 갖는다. 효과기 기능을 변경하는 CH 도메인의 변형은 본원에 추가로 설명된다. 중쇄 항체의 비제한적인 예는 예를 들어 W02018/039180에 기재되어 있으며, 이의 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

- [0053] 일부 실시형태에서, 본 명세서의 중쇄-단독 항체는 키메라 항원 수용체(CAR)의 결합 (표적화) 도메인으로서 사용된다. 이 정의는 구체적으로 인간 면역글로불린 유전자이식 래트(UniRat™)에 의해 생성되는 UniAb™라고 하는 중쇄-단독 항체를 포함한다. UniAb™의 가변 영역(VH)은 UniDab™라고 하며, 다중특이성, 증가된 효능 및 연장된 반감기를 갖는 신규 치료제의 개발을 위해 Fc 영역 또는 혈청 알부민에 연결될 수 있는 다용도의 빌딩 블록이다. 동종이량체 UniAb™는 경쇄가 없고 따라서 VL 도메인이 없기 때문에, 항원은 하나의 단일 도메인, 즉 중쇄 항체의 중쇄의 가변 도메인(VH 또는 VHH)에 의해 인식된다.
- [0054] 본원에서 사용되는 "온전한 항체 사슬"은 전장 가변 영역 및 전장 불변 영역(Fc)을 포함하는 것이다. 온전한 "통상적인" 항체는 온전한 경쇄 및 온전한 중쇄를 포함할 뿐만 아니라, 분비된 IgG의 경우 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, 힌지, CH2 및 CH3을 포함할 수 있다. IgM 또는 IgA와 같은 다른 이소형은 다른 CH 도메인을 가질 수 있다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 온전한 항체는 하나 이상의 "효과기 기능"을 가질 수 있으며, 이는 항체의 Fc 불변 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 의미한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 및 세포 표면 수용체의 하향 조절을 포함한다. 불변 영역 변이체는 효과기 프로파일, Fc 수용체에 대한 결합 등을 변경하는 것들을 포함한다.
- [0055] 중쇄의 Fc(불변 도메인)의 아미노산 서열에 따라, 항체 및 다양한 항원 결합 단백질은 상이한 클래스로서 제공될 수 있다. 중쇄 Fc 영역에는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 다섯 가지 주요 클래스가 있으며, 이들 중 일부는 "서브클래스"(이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 더 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 항체에 상응하는 Fc 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭될 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배열은 잘 알려져 있다. Ig 형태에는 힌지-변형 또는 무힌지 형태가 포함된다(문헌[Roux et al (1998) J. Immunol. 161:4083-4090]; [Lund et al (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256]; US 2005/0048572; US 2004/0229310). 모든 척추동물 종의 항체 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 $\hat{E}$ (카파) 및 $\hat{E}$ (람다)라는 두 가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 본 발명의 실시형태에 따른 항체는 카파 경쇄 서열 또는 람다 경쇄 서열을 포함할 수 있다.
- [0056] "기능적 Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 보유한다. 효과기 기능의 비제한적인 예는 C1q 결합; CDC; Fc-수용체 결합; ADCC; ADGP; 세포 표면 수용체(예를 들어, B-세포 수용체)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 효과기 기능은 일반적으로 수용체, 예를 들어 Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB 수용체, 및 저친화성 FcRn 수용체와 상호작용하기 위해 Fc 영역을 필요로 하며; 당업계에서 알려진 다양한 분석법을 사용하여 평가할 수 있다. "죽은" 또는 "침묵화" Fc는 예를 들어 혈청 반감기 연장과 관련하여 활성을 유지하도록 돌연변이되었지만, 고친화성 Fc 수용체를 활성화하지 않거나 Fc 수용체에 대해 감소된 친화도를 갖는 것이다.
- [0057] "천연-서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연-서열 인간 Fc 영역은 예를 들어 천연-서열 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 동종이형); 천연-서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연-서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연-서열 인간 IgG4 Fc 영역, 뿐만 아니라 이의 자연발생적 변이체를 포함한다.
- [0058] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 천연-서열 Fc 영역의 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연-서열 Fc 영역 또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어 천연-서열 Fc 영역 또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역에 약 1개 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1개 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연-서열 Fc 영역 및/또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 상동성, 더 바람직하게는 적어도 약 95% 상동성을 가질 것이다.
- [0059] 변이체 Fc 서열은 EU 인덱스 위치 234, 235, 및 237에서 Fc γ RI 결합을 감소시키기 위해 CH2 영역에 3개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다(문헌[Duncan et al., (1988) Nature 332:563] 참조). EU 인덱스 위치 330 및 331에서 보체 C1q 결합 부위의 2개의 아미노산 치환은 보체 고정을 감소시킨다(문헌[Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993)] 및 [Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)] 참조). 위치 233 내지 236의 인

간 IgG1 또는 IgG2 잔기 및 위치 327, 330 및 331의 IgG4 잔기로 치환은 ADCC 및 CDC를 크게 감소시킨다(예를 들어, 문헌[Armour KL. *et al.*, 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24]; 및 [Shields RL. *et al.*, 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604] 참조). 인간 IgG4 Fc 아미노산 서열(UniProtKB No. P01861)은 본원에서 서열번호 76으로 제공된다. 침묵화 IgG1은 예를 들어 문헌[Boesch, A.W., *et al.*, "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions." MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27]에 기재되어 있으며, 이들은 각각 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0060] 이항화 결합을 형성할 수 있는 영역이 결실된 것, 또는 천연 Fc의 N-말단에서 특정 아미노산 잔기가 제거된 것, 또는 천연 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 추가된 것을 포함하여, 제한 없이 다른 Fc 변이체가 가능하다. 따라서, 일부 실시형태에서, 항체의 하나 이상의 Fc 부분은 이항화 결합을 제거하기 위해 힌지 영역에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Fc의 힌지 영역은 완전히 제거될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 Fc 변이체를 포함할 수 있다.

[0061] 또한, Fc 변이체는 보체 결합 또는 Fc 수용체 결합을 일으키기 위해 아미노산 잔기를 치환(돌연변이)시키거나 결실시키거나 추가함으로써 효과기 기능을 제거하거나 실질적으로 감소시키도록 구성될 수 있다. 비제한적인 예를 들어, 결실은 C1q-결합 부위와 같은 보체-결합 부위에서 발생할 수 있다. 면역글로불린 Fc 단편의 이러한 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제 특허 공보 WO 97/34631호 및 WO 96/32478호에 개시되어 있다. 또한, Fc 도메인은 인산화, 황산화, 아실화, 글리코실화, 메틸화, 파르네실화, 아세틸화, 아미드화 등에 의해 변형될 수 있다.

[0062] 일부 실시형태에서, 항체는 T366W 돌연변이를 포함하는 변이체 인간 IgG4 CH3 도메인 서열을 포함하며, 이는 본 명세서에서 선택적으로 IgG4 CH3 노브 서열로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 T366S 돌연변이, L368A 돌연변이, 및 Y407V 돌연변이를 포함하는 변이체 인간 IgG4 CH3 도메인 서열을 포함하며, 이는 본 명세서에서 선택적으로 IgG4 CH3 홀 서열로 지칭될 수 있다. 본원에 기재된 IgG4 CH3 돌연변이는 임의의 적합한 방식으로 항체 이량체에서 제1 단량체의 제1 중쇄 불변 영역 상에 "노브"를 배치하고 항체 이량체에서 제2 단량체의 제2 중쇄 불변 영역 상에 "홀"을 배치함으로써 항체에서 중쇄 폴리펩티드 서브유닛의 목적하는 쌍의 적절한 쌍 형성(이중이량체화)을 촉진하도록 이용될 수 있다.

[0063] 일부 실시형태에서, 항체는 S228P 돌연변이, F234A 돌연변이, L235A 돌연변이, 및 T366W 돌연변이를 포함하는 변이체 인간 IgG4 Fc 영역을 포함하는 중쇄 폴리펩티드 서브유닛(노브)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 S228P 돌연변이, F234A 돌연변이, L235A 돌연변이, T366S 돌연변이, L368A 돌연변이, 및 Y407V 돌연변이를 포함하는 변이체 인간 IgG4 Fc 영역을 포함하는 중쇄 폴리펩티드 서브유닛(홀)을 포함한다.

[0064] "Fc-영역 포함 항체"라는 용어는 Fc 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. Fc 영역의 C-말단 라이신(EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 정제 중에 또는 항체를 암호화하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체는 K447이 있거나 없는 항체를 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 양태는 1가 또는 2가 배열의 중쇄-단독 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 중쇄-단독 가변 영역 도메인과 관련하여 본원에서 사용되는 "1가 배열"이라는 용어는 단 하나의 중쇄-단독 가변 영역 도메인이 단일 결합 부위를 갖고 존재함을 의미한다. 대조적으로, 중쇄-단독 가변 영역 도메인과 관련하여 본원에서 사용되는 "2가 배열"이라는 용어는 2개의 중쇄-단독 가변 영역 도메인이 존재하고(각각 단일 결합 부위를 가짐), 링커 서열에 의해 연결되어 있음을 의미한다. 링커 서열의 비제한적인 예는 본원에서 추가로 논의되며, 다양한 길이의 GS 링커 서열을 제한 없이 포함한다. 중쇄-단독 가변 영역이 2가 배열인 경우, 2개의 중쇄-단독 가변 영역 도메인 각각은 동일한 항원에 대해, 또는 상이한 항원에 대해(예를 들어, 동일한 단백질 상의 상이한 에피토프; 2개의 상이한 단백질 등에 대해) 결합할 수 있다. 그러나, 특별히 달리 언급하지 않는 한, "2가 입체배치"인 것으로 표시되는 중쇄 단독의 가변 영역은 링커 서열에 의해 연결된 2개의 동일한 중쇄 단독의 가변 영역 도메인을 포함하고, 2개의 동일한 중쇄 단독의 가변 영역 도메인 각각은 동일한 표적 항원에 결합하는 것으로 이해된다.

[0066] 본 발명의 양태는 이중특이적, 삼중특이적 등을 제한 없이 포함하는 다중특이적 배열을 갖는 항체를 포함한다. 매우 다양한 방법 및 단백질 배열이 이중특이적 단클론 항체(BsMAB), 삼중특이적 항체 등에서 알려져 있고 사용된다.

[0067] 2개 이상의 항체의 가변 도메인을 재조합적으로 융합함으로써 다가의 인공 항체를 생성하는 다양한 방법이 개발되었다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 상의 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 폴리펩티드 링커에 의해 연결된다. 이러한 폴리펩티드 링커의 하나의 비제한적인 예는 4개의 글리신 잔기에 이어 1개의 세린 잔기의 아

미노산 서열을 갖는 GS 링커이며, 서열은 n번 반복되고, n은 1 내지 약 10까지의, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9의 정수이다. 이러한 링커의 비제한적인 예는 GGGGS(서열번호 38)(n=1) 및 GGGSGGGGS(서열번호 39)(n=2)를 포함한다. 다른 적합한 링커가 또한 사용될 수 있고, 예를 들어 문헌[Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. 2013 October 15; 65(10): 1357-69]에 기재되어 있으며, 이의 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0068] "3쇄 항체유사 분자" 또는 "TCA"라는 용어는 3개의 폴리펩티드 서브유닛(그중 2개는 단클론 항체의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄, 또는 항원 결합 영역 및 적어도 하나의 CH 도메인을 포함하는, 이러한 항체 사슬의 기능적 항원 결합 단편을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어짐)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 항체유사 분자를 지칭하는 것으로 본원에서 사용된다. 이 중쇄/경쇄 쌍은 제1 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다. 제3 폴리펩티드 서브유닛은 CH1 도메인의 부재하에 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부분, 및 제2 항원의 에피토프 또는 제1 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인(예를 들어, 2개의 항원 결합 도메인)을 포함하는 중쇄-단독 항체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 이러한 결합 도메인은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역으로부터 유래되거나 그와 서열 동일성을 갖는다. 이러한 가변 영역의 부분은 V_H 및/또는 V_L 유전자 분절, D 및 J_H 유전자 분절, 또는 J_L 유전자 분절에 의해 암호화될 수 있다. 가변 영역은 재배열된 V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , 또는 V_LJ_L 유전자 분절에 의해 암호화될 수 있다.

[0069] TCA 결합 화합물은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 중쇄 불변 영역 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4를 포함하지만 CH1 도메인을 포함하지 않는 단일 쇄 항체를 의미하는 "중쇄-단독 항체" 또는 "중쇄 항체" 또는 "중쇄 폴리펩티드"를 사용한다. 일 실시형태에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부, 및 CH2 및 CH3 도메인으로 구성된다. 다른 실시형태에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부, 및 CH2 도메인으로 구성된다. 추가 실시형태에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 영역의 적어도 일부, 및 CH3 도메인으로 구성된다. CH2 및/또는 CH3 도메인이 절단된 중쇄 항체가 또한 본원에 포함된다. 추가 실시형태에서, 중쇄는 항원 결합 도메인, 및 적어도 하나의 CH(CH1, CH2, CH3, 또는 CH4) 도메인으로 구성되지만, 힌지 영역은 없다. 중쇄 단독 항체는 2개의 중쇄가 이황화 결합되거나 달리 공유적으로 또는 비공유적으로 서로 부착된 이량체 형태일 수 있으며, 폴리펩티드 사슬 사이의 적절한 쌍 형성을 용이하게 하기 위해 CH 도메인 중 2개 이상 사이에 비대칭 인터페이스(예를 들어, 노브-인-홀(KiH) 인터페이스)를 임의로 포함할 수 있다. 중쇄 항체는 IgG 서브클래스에 속할 수 있지만, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 서브클래스와 같은 다른 서브클래스도 본원에 포함된다. 특정 실시형태에서, 중쇄 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 특히 IgG1 서브타입 또는 IgG4 서브타입이다. TCA 결합 화합물의 비제한적인 예는 예를 들어 W02017/223111 및 W02018/052503에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0070] 중쇄 항체는 낙타과, 예를 들어 낙타 및 라마에 의해 생성된 IgG 항체의 약 1/4을 구성한다(문헌[Hamers-Casterman C., et al. Nature. 363, 446-448 (1993)]). 이러한 항체는 2개의 중쇄에 의해 형성되지만 경쇄는 없다. 결과적으로, 가변 항원 결합 부분은 VHH 도메인으로 지칭되며, 길이가 약 120개 아미노산에 불과한 가장 작은 자연발생적, 온전한 항원 결합 부위를 나타낸다(문헌[Desmyter, A., et al. J. Biol. Chem. 276, 26285-26290 (2001)]). 높은 특이성 및 친화성을 갖는 중쇄 항체는 면역화를 통해 다양한 항원에 대해 생성될 수 있으며(문헌[van der Linden, R. H., et al. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999)]), VHH 부분은 쉽게 클로닝되고 효모에서 발현될 수 있다(문헌[Frenken, L. G. J., et al. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000)]). 이들의 발현, 용해도, 및 안정성 수준은 전형적인 F(ab) 또는 Fv 단편보다 훨씬 높다(문헌[Ghahroudi, M. A. et al. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997)]). 상어는 또한 그들의 항체에 VNAR라고 불리는 단일 VH-유사 도메인을 갖는 것으로 나타났다. (문헌[Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003)]; [Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004)]; [Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)]).

[0071] 본원에서 사용되는 "CD19"라는 용어는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 95-kDa 막횡단 당단백질을 의미하며, B-림프구 상의 B-세포 항원 수용체 복합체(BCR)에 대한 공동-수용체로서 기능한다. 용어 "CD19"은 임의의 인간 및 비인간 동물 종의 CD19 단백질을 포함하고, 인간 CD19뿐만 아니라 비인간 포유류의 CD19을 특이적으로 포함한다.

[0072] 본원에서 사용되는 "인간 CD19"라는 용어는 공급원 또는 제조 방식에 관계없이, 인간 CD19(UniProt P15391)의 임의의 변이체, 동형체, 및 중 상동체를 포함한다. 따라서, "인간 CD19"은 세포에 의해 자연적으로 발현되는 인

간 CD19 및 인간 CD19 유전자로 형질감염된 세포 상에서 발현되는 CD19을 포함한다.

[0073] 용어 "항-CD19 중쇄-단독 항체", "CD19 중쇄-단독 항체", "항-CD19 중쇄 항체" 및 "CD19 중쇄 항체"는 본 명세서에서 상기 정의된 바와 같은 인간 CD19을 포함하는 CD19에 면역특이적으로 결합하는 본 명세서에서 상기 정의된 바와 같은 중쇄-단독 항체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. 이 정의는 상기 정의된 바와 같은 인간 항-CD19 UniAbTM 항체를 생성하는 UniRatTM를 포함하여, 인간 면역글로불린을 발현하는 유전자이식 래트 또는 유전자이식 마우스와 같은 유전자이식 동물에 의해 생성된 인간 중쇄 항체를 제한 없이 포함한다.

[0074] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요한 경우 갭을 도입한 후, 기준 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부분으로 고려하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어와 같이 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열 정렬을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다.

[0075] "단리된" 항체는 자연 환경의 성분으로부터 확인되어 분리 및/또는 회수된 것이다. 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단적 또는 치료적 사용을 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 (1) Lowry 방법에 의해 측정시 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과,의 항체까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 획득하기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는, 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건에서 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 제자리(*in situ*) 항체를 포함한다. 그러나 일반적으로 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0076] 본 발명의 항체는 다중특이적 항체를 포함한다. 다중특이적 항체는 하나 초과,의 결합 특이성을 갖는다. "다중특이적"이라는 용어는 구체적으로 "이중특이적" 및 "삼중특이적", 뿐만 아니라 고차 독립 특이적 결합 친화성, 예컨대 고차 폴리에피토프 특이성, 뿐만 아니라 4가 항체 및 항체 단편을 포함한다. 용어 "다중특이적 항체", "다중특이적 중쇄-단독 항체", "다중특이적 중쇄 항체" 및 "다중특이적 UniAbTM"는 본 명세서에서 광범위한 의미로 사용되며, 하나 초과,의 결합 특이성을 갖는 모든 항체를 아우른다. 본 발명의 다중특이적 중쇄 항-CD19 항체는 인간 CD19과 같은 CD19 단백질 상에서 2개 이상의 비중첩 에피토프(즉, 2가 및 바이파라토프)에 면역특이적으로 결합하는 항체를 특이적으로 포함한다. 본 발명의 다중특이적 중쇄 항-CD19 항체는 또한 인간 CD19과 같은 CD19 단백질 상의 에피토프에 그리고, 예를 들어, CD3 단백질을, 예컨대, 인간 CD3과 같은 상이한 단백질 상의 에피토프(즉, 2가 및 바이파라토프)에 면역특이적으로 결합하는 항체를 특이적으로 포함한다. 본 발명의 다중특이적 중쇄 항-CD19 항체는 또한 인간 CD19 단백질과 같은 CD19 단백질 상의 2개 이상의 비중첩 또는 부분적 중첩 에피토프에, 그리고, 예를 들어, CD3 단백질을, 예컨대, 인간 CD3 단백질과 같은 상이한 단백질 상의 에피토프(즉, 3가 및 바이파라토프)에 면역특이적으로 결합하는 항체를 특이적으로 포함한다.

[0077] 본 발명의 항체는 하나의 결합 특이성을 갖는 단일특이적 항체를 포함한다. 단일특이적 항체는 구체적으로 단일 결합 특이성을 포함하는 항체, 뿐만 아니라 동일한 결합 특이성을 갖는 하나 초과,의 결합 유닛을 포함하는 항체를 포함한다. "단일특이적 항체", "단일특이적 중쇄-단독 항체", "단일특이적 중쇄 항체", 및 "단일특이적 UniAbTM"라는 용어는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용되며, 하나의 결합 특이성을 갖는 모든 항체를 포함한다. 본 발명의 단일특이성 중쇄 항-CD19 항체는 구체적으로 인간 CD19 단백질과 같은 CD19 단백질 상의 하나의 에피토프(1가 및 단일특이성)에 면역특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 발명의 단일특이성 중쇄 항-CD19 항체는 또한 구체적으로 인간 CD19과 같은 CD19 단백질 상의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 하나 초과,의 결합 유닛을 갖는 항체(예를 들어, 다가 항체)를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 실시형태에 따른 단일특이성 항체는 2개의 항원-결합 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있되, 각각의 항원-결합 도메인은 CD19 단백질 상의 동일한 에피토프에 결합한다(즉, 2가 및 단일특이성).

[0078] "에피토프"는 단일 항체 분자가 결합하는 항원 분자의 표면 상의 부위이다. 일반적으로, 항원은 몇몇 또는 많은 상이한 에피토프를 가지고 있으며, 많은 상이한 항체와 반응한다. 이 용어는 구체적으로 선형 에피토프 및 입체

형태 에피토프를 포함한다.

- [0079] "에피토프 매핑"은 표적 항원 상의 항체의 결합 부위 또는 에피토프를 확인하는 프로세스이다. 항체 에피토프는 선형 에피토프 또는 입체형태 에피토프일 수 있다. 선형 에피토프는 단백질 내 아미노산의 연속 서열에 의해 형성된다. 입체형태 에피토프는 단백질 서열 내 불연속적인, 그러나 단백질 폴딩시 3차원 구조로 합쳐지는 아미노산으로 형성된다.
- [0080] "폴리에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 의미한다. 위에서 언급한 바와 같이, 본 발명은 구체적으로 폴리에피토프 특이성을 갖는 항-CD19 중쇄 항체, 즉 인간 CD19과 같은 CD19 단백질 상의 하나 이상의 비중첩 에피토프에 결합하는 항-CD19 중쇄 항체; 및 CD19 단백질 상의 하나 이상의 에피토프 및 예를 들어 CD3 단백질과 같은 다른 단백질 상의 에피토프에 결합하는 항-CD19 중쇄 항체를 포함한다. 항원의 "비중첩 에피토프(들)" 또는 "비경쟁적 에피토프(들)"이라는 용어는 한 쌍의 항원 특이적 항체 중 하나의 구성원은 인식하지만 다른 구성원은 인식하지 못하는 에피토프(들)를 의미하는 것으로 본원에서 정의된다. 비중첩 에피토프를 인식하는, 다중특이적 항체 상의 동일한 항원을 표적화하는 항원 결합 영역, 또는 항체의 쌍은 해당 항원에 결합하기 위해 경쟁하지 않고 동시에 해당 항원에 결합할 수 있다.
- [0081] 항체가 기준 항체와 "본질적으로 동일한 에피토프"에 결합하는 것은 두 항체가 동일하거나 입체적으로 중첩하는 에피토프를 인식하는 경우이다. 2개의 에피토프가 동일하거나 입체적으로 중첩하는 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위한 가장 널리 사용되고 신속한 방법은 표지된 항원 또는 표지된 항체를 사용하여 다양한 형식으로 구성될 수 있는 경쟁 분석이다. 일반적으로, 항원을 96웰 플레이트에 고정시키고, 표지된 항체의 결합을 차단하는 표지되지 않은 항체의 능력을 방사성 또는 효소 표지를 사용하여 측정한다.
- [0082] 본원에서 사용되는 용어 "가(valent)"는 항체 분자에서의 명시된 결합 부위 수를 나타낸다.
- [0083] "1가" 항체는 하나의 결합 부위를 갖는다. 따라서 1가 항체는 또한 단일특이성이다.
- [0084] "다가" 항체는 2개 이상의 결합 부위를 갖는다. 따라서, 용어 "2가", "3가", 및 "4가"는 각각 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 및 4개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 적어도 2가이며, 3가, 4가, 또는 다가일 수 있다. 본 발명의 실시형태에 따른 2가 항체는 동일한 에피토프에 대한 2개의 결합 부위(즉, 2가, 단일파라토프), 또는 2개의 상이한 에피토프에 대한 2개의 결합 부위(즉, 2가, 이중파라토프)를 가질 수 있다.
- [0085] 매우 다양한 방법 및 단백질 배열이 이중특이적 단클론 항체(BsMAB), 삼중특이적 항체 등의 제조에 대해 알려져 있고 사용된다.
- [0086] "3쇄 항체 유사 분자" 또는 "TCA"라는 용어는 3개의 폴리펩티드 서브유닛(그중 2개는 단클론 항체의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄, 또는 항원 결합 영역 및 적어도 하나의 CH 도메인을 포함하는, 이러한 항체 쇄의 기능적 항원 결합 단편을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어짐)을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진 항체-유사 분자를 지칭하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. 이 중쇄/경쇄 쌍은 제1 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다. 제3 폴리펩티드 서브유닛은 CH1 도메인의 부재하에 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부분, 및 제2 항원의 에피토프 또는 제1 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄-단독 항체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 이러한 결합 도메인은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역으로부터 유래되거나 그와 서열 동일성을 갖는다. 이러한 가변 영역의 부분은 V_H 및/또는 V_L 유전자 분절, D 및 J_H 유전자 분절, 또는 J_L 유전자 분절에 의해 암호화될 수 있다. 가변 영역은 재배열된 V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , 또는 V_LJ_L 유전자 분절에 의해 암호화될 수 있다. TCA 단백질은 상기 정의된 바와 같은 중쇄-단독 항체를 사용한다.
- [0087] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이라는 용어는 목적하는 결합 특이성(예를 들어, 단클론 항체 또는 다른 리간드의 항원 결합 영역)을 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 이식하는 조작된 수용체를 지칭하기 위해 가장 넓은 의미로 본원에서 사용된다. 일반적으로, 수용체는 단클론 항체의 특이성을 T-세포에 이식하여 키메라 항원 수용체(CAR)를 생성하는 데 사용된다. (문헌[J Natl Cancer Inst, 2015; 108(7):dvj439; 및 Jackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13:370-383]). CAR-T 세포는 면역요법에 사용하기 위한 인공 T-세포 수용체를 생성하도록 유전자 조작된 T-세포이다. 일 실시형태에서, "CAR-T 세포"는, 최소한 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 하나의 세포기질 도메인으로 구성된 하나 이상의 키메라 항원 수용체를 암호화하

는 이식유전자를 발현하는 치료용 T-세포를 의미한다.

- [0088] "인간 항체"라는 용어는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 본원에서 사용된다. 본원의 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기, 예를 들어 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 도입되거나 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이를 포함할 수 있다. "인간 항체"라는 용어는 구체적으로 유전자이식 래트 또는 마우스와 같은 유전자이식 동물에 의해 생성된, 인간 중쇄 가변 영역 서열을 갖는 중쇄-단독 항체, 특히 상기 정의된 바와 같은 UniRatTM에 의해 생성된 UniAbTM를 포함한다.
- [0089] "키메라 항체" 또는 "키메라 면역글로불린"은 적어도 2개의 상이한 Ig 유전자좌로부터의 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 분자, 예를 들어 인간 Ig 유전자좌에 의해 암호화된 부분 및 래트 Ig 유전자좌에 의해 암호화된 부분을 포함하는 유전자이식 항체를 의미한다. 키메라 항체는 비인간 Fc 영역 또는 인공 Fc 영역, 및 인간 이디오타입을 갖는 유전자이식 항체를 포함한다. 이러한 면역글로불린은 이러한 키메라 항체를 생성하도록 조작된 본 발명의 동물로부터 단리될 수 있다.
- [0090] 본원에서 사용되는 "효과기 세포"라는 용어는 면역 반응의 인지 및 활성화 단계가 아닌 면역 반응의 효과기 단계에 관여하는 면역 세포를 지칭한다. 이러한 효과기 세포는 특정 Fc 수용체를 발현하며 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시형태에서, 자연살해 세포와 같은 효과기 세포는 항체 의존성 세포매개 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현시키는 단핵구 및 대식세포는 표적 세포의 특이적 사멸 및 면역계의 다른 구성 요소에 항원을 제시하는 것, 또는 항원을 제시하는 세포에 대한 결합에 관여한다. 일부 실시형태에서, 효과기 세포는 표적 항원 또는 표적 세포에 식균작용을 할 수 있다.
- [0091] "인간 효과기 세포"는 T-세포 수용체 또는 FcR과 같은 수용체를 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 자연살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T-세포, 및 호중구를 포함하며, NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 이의 천연 공급원, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 단리될 수 있다.
- [0092] "면역 세포"라는 용어는 골수성 또는 림프성 기원의 세포, 예를 들어 림프구(예컨대, B-세포 및 세포용해 T-세포(CTL)를 포함하는 T-세포), 살해 세포, 자연살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예컨대 호중구, 과립구, 비만세포, 및 호염기구를 제한 없이 포함하는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용된다.
- [0093] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 의미한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B-세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다.
- [0094] "항체 의존성 세포매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 자연살해(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포에 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용해를 유발하는 세포매개 반응을 의미한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 5,500,362호 및 5,821,337호에 기재된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈액 단핵세포(PBMC) 및 자연살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌[Clynes *et al.*, *PNAS* (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0095] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 의미한다. 보체 활성화 경로는 동족 항원과 복합체를 형성한 분자(예를 들어, 항체)에 대한 보체 시스템(C1q)의 첫 번째 구성요소의 결합에 의해 시작된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌[Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석이 수행될 수 있다.
- [0096] "결합 친화도"는 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용 총계의 강도를 의미한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 사용되는 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd)로 나타낼 수 있다. 친화도는 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 측정될 수 있다. 저친화성 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화

성 항체는 일반적으로 항원에 더 빨리 결합하고 결합 상태를 유지하는 경향이 있다.

- [0097] 본원에서 사용되는 "Kd" 또는 "Kd 값"은 동역학 모드로 Octet QK384 기기(Fortebio Inc., Menlo Park, CA)를 사용하여 생물층 간섭계로 측정된 해리 상수를 의미한다. 예를 들어, 항마우스 Fc 센서에 마우스-Fc 융합 항원을 로드한 다음, 이를 항체가 포함된 웰에 침지시켜 농도 의존적 결합물(kon)을 측정한다. 항체 해리율(koff)은 최종 단계에서 센서를 버퍼만 포함하는 웰에 침지시켜 측정한다. Kd는 Koff/kon의 비이다. (더욱 상세한 설명에 대해서는, 문헌[Concepcion, J, et al., *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(8), 791-800, 2009]을 참조한다).
- [0098] "치료", "치료하는" 등의 용어는 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 일반적으로 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 면에서 예방적일 수 있고/있거나 질환 및/또는 질환에 기인한 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유 면에서 치료적일 수 있다. 본원에서 사용되는 "치료"는 포유류의 질환 치료를 다루며, 다음을 포함한다: (a) 질환에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 질환이 있는 것으로 진단되지 않은 대상체에서 질환이 발생하는 것을 방지하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 질환의 발달을 저지하는 것; 또는 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 유발하는 것. 치료제는 질환 또는 손상의 발병 전에, 발병 중에, 또는 발병 후에 투여될 수 있다. 치료가 환자의 바람직하지 않은 임상 증상을 안정화시키거나 감소시키는 진행중인 질환의 치료가 특히 중요하다. 이러한 치료는 영향을 받은 조직의 기능이 완전히 상실되기 전에 수행하는 것이 바람직하다. 대상 요법은 질환의 증상 단계 동안 투여될 수 있고, 일부 경우 질환의 증상 단계 후에 투여될 수 있다.
- [0099] "치료 유효량"은 대상체에게 치료적 이점을 부여하는 데 필요한 활성제의 양을 의미한다. 예를 들어, "치료 유효량"은 질환과 관련된 병리학적 증상, 질환 진행, 또는 생리학적 상태의 호전을 유도, 개선, 또는 달리 유발하거나, 장애에 대한 내성을 향상시키는 양이다.
- [0100] 본 발명의 맥락에서 "B-세포 신생물" 또는 "성숙 B-세포 신생물"이라는 용어는 모든 림프성 백혈병 및 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 전림프구성 백혈병, 전구체 B-림프모구성 백혈병, 유모세포 백혈병, 소림프구성 림프종, B-세포 전림프구성 림프종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 버킷 림프종, 소포림프종, 확산성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 다발성 골수종, 림프형질세포성 림프종, 비장 변연부 림프종, 형질세포 신생물, 예컨대 형질세포 골수종, 형질세포종, 단클론 면역글로불린 침착 질환, 중쇄 질환, MALT 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종, 림프종모양 육아종증, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 털세포 백혈병, 원발성 삼출성 림프종, 및 AIDS 관련 비호지킨 림프종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0101] "CD19의 발현을 특징으로 하는"이라는 용어는 CD19 발현이 질환 또는 장애의 특징인 하나 이상의 병리학적 과정과 연관되거나 관련된 임의의 질환 또는 장애를 광범위하게 지칭한다. 이러한 장애는 B-세포 신생물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] "대상체", "개체", 및 "환자"라는 용어는 치료에 대해 평가되고/되거나 치료받는 포유류를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일 실시형태에서, 포유류는 인간이다. "대상체", "개체", 및 "환자"라는 용어는 암이 있는 개체, 자가면역 질환이 있는 개체, 병원균 감염이 있는 개체 등을 제한 없이 포함한다. 대상체는 인간일 수 있지만, 다른 포유동물, 특히 인간 질환에 대한 실험실 모델로 유용한 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트 등을 포함할 수도 있다.
- [0103] "약제학적 조성물"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 하는 형태의 제제로, 제형이 투여되는 대상체에게 허용할 수 없을 정도로 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제형은 무균이다. "약제학적으로 허용가능한" 부형제(비히클, 첨가제)는 사용된 활성 성분의 유효 용량을 제공하기 위해 대상 포유동물에게 합리적으로 투여될 수 있는 것이다.
- [0104] "멸균" 제형은 무균이거나 모든 살아있는 미생물 및 포자가 없거나 본질적으로 없다. "동결" 제형은 0℃ 미만 온도이다.
- [0105] "안정한" 제형은 제형 내의 단백질이 보관시 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 본질적으로 유지하는 것이다. 바람직하게는, 제형은 보관시 물리적 및 화학적 안정성, 뿐만 아니라 생물학적 활성을 본질적으로 유지한다. 보관 기간은 일반적으로 제형의 의도된 유효 기간에 따라 선택된다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술은 당업계에서 이용 가능하며, 예를 들어, Peptide and Protein Drug

Delivery, 247-301 Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90) (1993)에서 검토된다. 안정성은 선택 온도에서 선택 기간 동안 측정될 수 있다. 안정성은 응집체 형성 평가(예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 사용, 혼탁도 측정, 및/또는 육안 검사); 양이온 교환 크로마토그래피, 이미지 모세관 등전위 포커싱(icIEF), 또는 모세관 구역 전기영동을 사용한 전하 이질성 평가; 아미노-말단 또는 카복시-말단 서열 분석; 질량 분광계 분석; 감소된 항체와 온전한 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 맵(예를 들어, 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능 평가 등을 비롯한, 다양한 방법으로 정성적 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다. 불안정성은 다음 중 하나 이상을 수반할 수 있다: 응집, 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화), 이성질체화(예를 들어, Asp 이성질체화), 클리핑/가수분해/단편화(예를 들어, 힌지 영역 단편화), 석신이미드 형성, 쌍을 이루지 않은 시스테인(들), N-말단 확장, C-말단 처리, 글리코실화 차이 등.

II. 상세한 설명

항-CD19 항체

본 발명은 인간 CD19에 결합하는 밀접하게 관련된 항체의 패밀리를 제공한다. 이 패밀리의 항체는 본원에 정의되고 표 1에 나타난 CDR 서열 세트를 포함하고, 표 2에 제시된 제공된 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 표 3에 제시된 서열번호 5 및 6의 중쇄 가변 영역(VH) 서열에 의해 예시된다. 항체의 패밀리는 임상 치료제(들)로서의 유용성에 기여하는 다수의 이점을 제공한다. 이러한 항체는 다양한 결합 친화도를 갖는 구성원을 포함하여, 목적하는 결합 친화도를 갖는 특정 서열의 선택을 가능하게 한다.

[표 1]

항-CD19 중쇄 항체 특유 CDR 아미노산 서열.

SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
GFTFSDYY (서열번호 1)	MSSSGSTI (서열번호 2)	ARGGIAATGT (서열번호 3)
GDFSDYY (서열번호 38)		ARGGIAAAGT (서열번호 4)
	MSSDGSTI (서열번호 39)	

[표 2]

항-CD19 중쇄 항체 CDR1, CDR2, 및 CDR3 아미노산 서열.

클론 ID #	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
370083	GFTFSDYY (서열번호 1)	MSSSGSTI (서열번호 2)	ARGGIAATGT (서열번호 3)
370034	GFTFSDYY (서열번호 1)	MSSSGSTI (서열번호 2)	ARGGIAAAGT (서열번호 4)

[표 3]

항-CD19 중쇄 항체 가변 도메인 아미노산 서열.

클론 ID #	SEQ_aa_FR1_FR4	서열번호
370083	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGI AATGTWGQGTLLTVSS	5
370034	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGI AAAGTWGQGTLLTVSS	6
T29D	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGI AAAGTWGQGTLLTVSS	40
S55D	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSY MSSDGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGI AAAGTWGQGTLLTVSS	41

적합한 항체는 예를 들어 도 4의 패널 B에 도시된 바와 같이 이중특이적 항체 또는 CAR-T 구조의 일부로서의 용도를 포함하되 이에 제한되지 않는 개발 및 치료 또는 기타 용도를 위해 본원에 제공된 것 중에서 선택될 수 있다.

후보 단백질에 대한 친화도의 결정은 Biacore 측정과 같은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 항체 패밀리의 구성원은 약 10^{-6} 내지 약 10^{-11} 의 Kd로 CD19에 대한 친화도를 가질 수 있으며, 약 10^{-6} 내지 약

10^{-10} ; 약 10^{-6} 내지 약 10^{-9} ; 약 10^{-6} 내지 약 10^{-8} ; 약 10^{-8} 내지 약 10^{-11} ; 약 10^{-8} 내지 약 10^{-10} ; 약 10^{-8} 내지 약 10^{-9} ; 약 10^{-9} 내지 약 10^{-11} ; 약 10^{-9} 내지 약 10^{-10} ; 또는 이들 범위 내의 임의의 값을 포함하되 이에 제한되지 않는다. 친화도 선택은 시험관내 분석, 전임상 모델, 및 임상 시험을 포함하는 CD19 생물학적 활성을 조절하는, 예를 들어, 차단하기 위한 생물학적 평가뿐만 아니라 잠재적 독성의 평가로 확인될 수 있다.

[0117] 본원의 항체 패밀리의 구성원은 *시노몰구스(Cynomolgus)* 마카크의 CD19 단백질과 교차 반응하지 않지만, 필요한 경우, 시노몰구스 마카크의 CD19 단백질, 또는 임의의 다른 동물 종의 CD19와의 교차 반응성을 제공하도록 조작될 수 있다.

[0118] 본원의 CD19-특이적 항체의 패밀리는 인간 VH 프레임워크에 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. CDR 서열은 예를 들어 CDR1, CDR2, 및 CDR3에 대해 각각, 서열번호 5 내지 6에 제시된 제공된 예시적인 가변 영역 서열의 아미노산 잔기 26~33; 51~58; 및 97~116 부근의 영역에 위치할 수 있다. 일반적으로 서열의 순서는 동일하게 유지되지만, 상이한 프레임워크 서열이 선택되는 경우 CDR 서열이 상이한 위치에 있을 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0119] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 1 또는 38 중 어느 하나의 CDR1 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 1의 CDR1 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 38의 CDR1 서열을 포함한다.

[0120] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 2 또는 39 중 어느 하나의 CDR2 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 2의 CDR2 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 39의 CDR2 서열을 포함한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 3 내지 4 중 어느 하나의 CDR3 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 3의 CDR3 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 4의 CDR3 서열을 포함한다.

[0122] 추가 실시형태에서, 항-CD19 중쇄-단독 항체는 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 3의 CDR3 서열을 포함한다.

[0123] 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열을 포함한다.

[0124] 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 38의 CDR1 서열, 서열번호 2의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열을 포함한다.

[0125] 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 1의 CDR1 서열, 서열번호 39의 CDR2 서열, 및 서열번호 4의 CDR3 서열을 포함한다.

[0126] 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 5 내지 6 및 40 내지 41의 임의의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다(표 3).

[0127] 또한 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 5의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0128] 또한 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 6의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0129] 또한 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0130] 또한 추가 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 41의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-CD19 항체에서 CDR 서열은 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열에 대해 1 또는 2개의 아미노산 치환 또는 서열번호 1 내지 4, 38 및 39 중 어느 하나에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열의 세트를 포함한다(표 1; 표 2).

[0132] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 바람직하게는, CDR3 서열이 표 1 또는 표 2에 제공된 항체 중 어느 하나의 CDR3 서열에 대한 아미노산 수준에서 CDR3 서열이 80% 이상, 예컨대, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하고, CD19에 결합한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 바람직하게는, CDR 서열이 표 1 또는 표 2에 제공된 항체의 CDR 1, 2 및 3(조합됨)에 대한 아미노산 수준에서 CDR 1, 2 및 3(조합됨)의 전체 세트가 팔십오 퍼센트(85%) 이상의 서열 동

일성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하고, CD19에 결합한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항체는 서열번호 5 내지 6 및 40 내지 41(표 3에 나타냄)의 임의의 중쇄 가변 영역 서열에 대해 적어도 약 80% 동일성, 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하고, CD19에 결합한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 이중특이적 3쇄 항체 유사 분자(TCA)를 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 본 명세서에서 논의되는 임의의 입체배치를 가질 수 있는 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체는 CD19에 대해 결합 특이성을 갖는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역, 및 CD19 이외의 단백질에 대해 결합 특이성을 갖는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체는 CD19에 결합하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역, 및 CD19 이외의 단백질에 결합하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체는 적어도 2개의 항원-결합 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있되, 항원-결합 도메인 각각은 CD19에 결합한다. 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체는 제1 항원(예를 들어, CD3)에 결합하는 중쇄/경쇄쌍 및 중쇄-단독 항체의 중쇄를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 중쇄-단독 항체로부터의 중쇄는 CH1 도메인의 부재 하에서 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부분을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 이중특이적 항체는 효과기 세포 상의 항원(예를 들어, T-세포 상의 CD3 단백질)에 결합하는 중쇄/경쇄쌍, 및 CD19에 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 중쇄-단독 항체로부터의 중쇄를 포함한다.

[0136] 일부 실시형태에서, 다중특이적 항체는 경쇄 가변 도메인과 쌍을 형성하는 CD3-결합 VH 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 경쇄는 고정된 경쇄이다. 일부 실시형태에서, CD3-결합 VH 도메인은 인간 VH 프레임워크에 서열번호 7의 CDR1 서열, 서열번호 8의 CDR2 서열 및 서열번호 9의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3-결합 VH 도메인은 인간 VH 프레임워크에 서열번호 10의 CDR1 서열, 서열번호 11의 CDR2 서열 및 서열번호 12의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 경쇄는 인간 VL 프레임워크의 서열번호 13의 CDR1 서열, 서열번호 14의 CDR2 서열 및 서열번호 15의 CDR3 서열을 포함한다. 종합하면, CD3-결합 VH 도메인 및 경쇄 가변 도메인은 CD3에 대해 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에서, CD3-결합 VH 도메인은 서열번호 16의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3-결합 VH 도메인은 서열번호 17의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3-결합 VH 도메인은 서열번호 16 또는 17의 중쇄 가변 영역 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 백분율 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 경쇄는 서열번호 18의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 경쇄 도메인은 서열번호 18의 중쇄 가변 영역 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 백분율 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0137] 상기 기재한 CD3-결합 VH 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 다중특이적 항체는, 예를 들어, 공개된 PCT 출원 공개 번호 WO2018/052503에 기재된 바와 같이, 유리한 특성을 갖고, 이의 개시내용은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용된다. CD19에 대해 결합 친화도를 갖는 본 명세서에 기재된 임의의 다중특이적 항체 및 항원-결합 도메인은 본 명세서에(예를 들어, 표 4 및 표 5 참조)에 기재된 CD3-결합 도메인 및 고정된 경쇄 도메인뿐만 아니라 추가적인 서열, 예컨대, 표 6 및 표 7에 제공된 것과 조합되어, 하나 이상의 CD19 에피토프뿐만 아니라 CD3에 대해 결합 친화도를 갖는 다중특이적 항체를 생성할 수 있다.

[0138] [표 4]

항-CD3 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2, CDR3 아미노산 서열.

	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
중쇄 (F2B)	GFTFDDYA (서열번호 7)	ISWNSGSI (서열번호 8)	AKDSRGYGDYRLGGAY (서열번호 9)
중쇄 (F2F)	GFTFHNYA (서열번호 10)	ISWNSGSI (서열번호 11)	AKDSRGYGDYSLGGAY (서열번호 12)
경쇄	QSVSSN (서열번호 13)	GAS (서열번호 14)	QQYNNWPWT (서열번호 15)

[0139]

[0140] [표 5]

항-CD3 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열.

VH (F2B)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSI GY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGT</u> LVTVSS (서열번호 16)
VH (F2F)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTF HN YAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSI GY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC <u>AKDSRGYGDYSLGGAYWGQGT</u> LVTVSS (서열번호 17)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLIYG <u>ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT</u> TISSLQSEDFAVYYC <u>QQYNNWPWTFGQ</u> GTKVEIK (서열번호 18)

[0141]

[0142] [표 6]

인간 IgG1 및 IgG4 Fc 영역 서열.

인간 IgG1 (UniProt 번호 P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKV DK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK (서열번호 19)
인간 IgG4 (UniProt 번호 P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YTCNV DH KPSNTKV DK RVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGK (서열번호 20)
첨목 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 (Fc 영역)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 21)
첨목 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 (Fc 영역)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV DH KPSNTKV DK RVESKYGPPCPSCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSGK (서열번호 22)

[0143]

[0144] [표 7]

추가적인 서열

항-CD3 경쇄 불변 영역 서열 (카파 경쇄)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (서열번호 23)
항-CD3 중쇄 서열 (VH + wt IgG1 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 24)
항-CD3 중쇄 서열 (침묵화 IgG1 Fc를 가짐)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 25)

[0145]

항-CD3 중쇄 불변 영역 서열 (wt IgG4 Fc를 가짐)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (서열번호 26)
항-CD3 중쇄 불변 영역 서열 (침묵화 IgG4 Fc를 가짐)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (서열번호 27)
침묵화 IgG4 (인자 - CH2 - CH3; 혼 (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL <u>Sc</u> <u>A</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (서열 번호 28)
침묵화 IgG4 (인자 - CH2 - CH3; 도브 (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (서열 번호 29)
항-CD3 전장 형태 (VL + 카파 CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 30)

[0146]

항-CD3 전장 중쇄 (VH + 침묵화 IgG4 Fc + 노브 (S228P, F234A, L235A; T366W))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 31)
CD19 1가 중쇄 (클론 ID 370083) + 침묵화 IgG4 Fc, 홀 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGIAATGTWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 32)
CD19 2가 중쇄 (클론 ID 370083) + 침묵화 IgG4 Fc, 홀 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGIAATGTWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIY YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGT WGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS LGK (서열번호 33)
CD19 1가 중쇄 (클론 ID 370034) + 침묵화 IgG4 Fc, 홀 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGGIAAAGTWGQGLTVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 34)

[0147]

CD19 2가 중쇄 (클론 ID 370034) + 침묵화 IgG4 Fc, 혼 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGGIAAAGTWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIY YADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAG TWGQGTTLTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK (서열번호 35)
CD19 2가 중쇄 (클론 ID 370083 x 클론 ID 370034) + 침묵화 IgG4 Fc, 혼 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMTSLRAEDTAV YYCARGGIAAAGTWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIY YADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAG TWGQGTTLTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK (서열번호 36)
CD19 2가 중쇄 (클론 ID 370034 x 클론 ID 370083) + 침묵화 IgG4 Fc, 혼 (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGGIAAAGTWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIY YADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGIAAAG TWGQGTTLTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK (서열번호 37)

[0148]

[0149]

일부 실시형태에서, 이중특이적 3쇄 항체 유사 분자(TCA)를 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 본 명세서에서 논의되는 임의의 입체배치를 가질 수 있는 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 CD19에 결합하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역, 및 CD19 이외의 단백질에 결합하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 CH1 도메인의 부재 하에서 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부분, 및 제2 항원의 에피토프 또는 제1 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 제1 항원에 결합하는 중쇄/경쇄쌍, 및 중쇄-단독 항체로부터의 중쇄를 포함할 수 있다. 하나의 특정 실시형태에서, 이중특이적 항체는 효과기 세포 상의 항원(예를 들어, T-세포 상의 CD3 단백질)에 결합하는 중쇄/경쇄쌍, 및 CD19에 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 중쇄-단독 항체로부터의 중쇄를 포함한다.

[0150]

일부 실시형태에서, 본 발명의 항체가 이중특이적 항체인 경우, 항체의 하나의 아암(하나의 결합 모이어티 또는 하나의 결합 단위)은 인간 CD19에 특이적인 반면, 다른 아암은 표적 세포, 종양-연관 항원, 표적화 항원, 예를 들어, 인테그린 등, 병원균 항원, 관문 단백질 등에 특이적일 수 있다. 표적 세포에는 구체적으로 CD19의 발현으로 특징화되는 혈액학적 악성종양과 관련된 세포뿐만 아니라 CD19의 발현으로 특징화되는 자가면역 장애와 관련된 병원성 B-세포를 포함하되 이에 제한되지 않는 암세포가 포함된다. 일부 실시형태에서, 항체의 하나의 아암(하나의 결합 모이어티 또는 하나의 결합 단위)은 인간 CD19에 특이적인 반면, 다른 아암은 CD3에 특이적이다.

[0151]

일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 28 또는 29 중 어느 하나의 서열과 연관된, 1가 또는 2가 입체배치에서 서열번호 30의 서열을 포함하는 항-CD3 경쇄 폴리펩티드, 서열번호 16 또는 17의 서열을 포함하는 항-CD3 중쇄 폴리펩티드, 및 서열번호 5 또는 6의 서열을 포함하는 항-CD19 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 이들 서열은 목적하는 IgG 서브클래스, 예를 들어, IgG1, IgG4, 침묵화 IgG1, 침묵화 IgG4의 이중특이적 항체를 생성하기 위한 다양한 방법에서 조합될 수 있다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 항체는 서열번호 30을 포함하는 제1

폴리펩티드, 서열번호 31을 포함하는 제2 폴리펩티드, 및 서열번호 32, 33, 34, 35, 36 또는 37을 포함하는 제3 폴리펩티드를 포함하는 TCA이다.

[0152] 단일쇄 폴리펩티드, 2쇄 폴리펩티드, 3쇄 폴리펩티드, 4쇄 폴리펩티드, 이들의 다중체를 포함하는 다양한 형태의 다중특이적 항체가 본 발명의 범위에 속한다. 본 명세서의 다중특이적 항체는 CD19 및 CD3에 결합하는 T-세포 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체(항-CD19 x 항-CD3 항체)를 특이적으로 포함한다. 이러한 항체는 CD19을 발현시키는 세포의 강력한 T-세포 매개 사멸을 유도한다.

[0153] 항-CD19 항체의 제조

[0154] 본 발명의 항체는 당업계에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본원의 항체는 유전자 이식 마우스 및 래트를 포함하는 유전자이식 동물, 바람직하게는 내인성 면역글로불린 유전자가 녹아아웃되거나 비활성화된 래트에 의해 생성된다. 바람직한 실시형태에서, 본 명세서의 중쇄 항체는 UniRatTM에서 생성된다. UniRatTM는 침묵화 내인성 면역글로불린 유전자를 갖고 있으며, 완전 인간 HCAb의 다양한, 자연적으로 최적화된 레퍼토리를 발현하기 위해 인간 면역글로불린 중쇄 전좌(translocus)를 사용한다. 래트의 내인성 면역글로불린 유전자좌는 다양한 기술을 사용하여 녹아아웃 또는 침묵화될 수 있지만, UniRatTM에서는 징크 핑거 (엔도)뉴클레아제(ZNF) 기술을 사용하여 내인성 래트 중쇄 J-유전자좌, 경쇄 C κ 유전자좌, 및 경쇄 C λ 유전자좌를 비활성화시켰다. 난모세포에 미세주입하기 위한 ZNF 구성체는 IgH 및 IgL 녹아아웃(KO) 계통을 생성할 수 있다. 자세한 내용은 예를 들어 문헌[Geurts et al., 2009, Science 325:433] 참조한다. Ig 중쇄 녹아아웃 래트의 특성화는 문헌[Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941]에 보고된 바 있다. ZNF 기술의 장점은 최대 수 kb의 결실을 통해 유전자 또는 유전자좌를 침묵화시키기 위한 비상동 말단 연결도 상동성 통합을 위한 표적 부위를 제공할 수 있다는 것이다(문헌[Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67]). UniRatTM에서 생성된 인간 중쇄 항체는 UniAbTM라고 하며, 통상적인 항체로는 공격할 수 없는 에피토프에 결합할 수 있다. 이들은 높은 특이성, 친화성, 및 작은 크기로 인해 단일 및 다중 특이적 용도에 이상적이다.

[0155] UniAbTM 외에도, 낙타과 VHH 프레임워크 및 돌연변이, 및 이들의 기능적 VH 영역이 결합된 중쇄-단독 항체가 본원에 구체적으로 포함된다. 이러한 중쇄-단독 항체는 예를 들어 W02006/008548에 기재된 바와 같이, 예를 들어 완전 인간 중쇄만의 유전자좌를 포함하는 유전자이식 래트 또는 마우스에서 생성될 수 있지만, 토끼, 기니피그, 래트와 같은 다른 유전자이식 포유동물도 사용될 수 있으며, 래트 및 마우스가 바람직하다. 중쇄-단독 항체(이들의 VHH 또는 VH 기능적 단편 포함)는 또한, 예를 들어 포유류 세포(예: CHO 세포), E. 콜라이, 또는 효모를 비롯한 적합한 진핵 또는 원핵 숙주에서 암호화 핵산을 발현시켜, 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다.

[0156] 중쇄-단독 항체의 도메인은 항체와 소분자 약물의 이점을 결합하여: 1가 또는 다가일 수 있고; 독성이 낮고; 제조 비용이 저렴하다. 작은 크기로 인해, 이러한 도메인은 경구 또는 국소 투여를 포함하여 투여하기 쉽고, 위장 안정성을 포함하여 높은 안정성을 특징으로 하며; 이들의 반감기는 목적하는 용도 또는 적응증에 맞춰질 수 있다. 또한, HCAb의 VH 및 VHH 도메인은 비용 효과적인 방식으로 제조될 수 있다.

[0157] 특정 실시형태에서, UniAbTM를 포함하는 본 발명의 중쇄 항체는, 해당 위치에서 천연 아미노산 잔기를 포함하거나 이와 회합된 표면 노출된 소수성 패치를 파괴할 수 있는 다른 아미노산 잔기로 치환된 FR4 영역의 첫 번째 위치(Kabat 넘버링 시스템에 따른 아미노산 위치 101)에 천연 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 소수성 패치는 일반적으로 항체 경쇄 불변 영역과의 인터페이스에 묻혀 있지만, HCAb에서 표면 노출되며, 적어도 부분적으로는 HCAb의 원치 않는 응집 및 경쇄 회합을 위한 것이다. 치환된 아미노산 잔기는 바람직하게는 전하를 띠, 더 바람직하게는 양전하를 띠, 예컨대 라이신(Lys, K), 아르기닌(Arg, R), 또는 히스티딘(His, H), 바람직하게는 아르기닌(R)이다. 바람직한 실시형태에서, 유전자이식 동물로부터 유래된 중쇄-단독 항체는 위치 101에 Trp에서 Arg로의 돌연변이를 포함한다. 생성된 HCAb는 바람직하게는 응집의 부재하에 생리학적 조건에서 높은 항원 결합 친화도 및 용해도를 갖는다.

[0158] 본 발명의 부분으로서, UniRatTM 동물(UniAbTM)로부터의 특유 서열을 갖는 인간 IgG 항-CD19 중쇄 항체가 확인되었고, 이는 ELISA 단백질 및 세포-결합 분석에서 인간 CD19에 결합한다. 확인된 중쇄 가변 영역(VH) 서열은 인간 CD19 단백질 결합 및/또는 CD19+ 세포에 대한 결합에 대해 양성이고, CD19을 발현하지 않는 세포에 대한 결합에 대해서는 모두 음성이다.

- [0159] CD19 단백질 상의 비중첩 에피토프에 결합하는 중쇄 항체, 예를 들어, UniAbs™는 효소-결합 면역분석(ELISA 분석) 또는 유세포 경쟁 결합 분석과 같은 경쟁 결합 분석에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 표적 항원에 결합하는 알려진 항체와 관심 항체 사이의 경쟁을 사용할 수 있다. 이 접근법을 사용하면, 일련의 항체를 기준 항체와 경쟁하는 것과 그렇지 않은 것으로 나눌 수 있다. 비경쟁 항체는 기준 항체에 의해 결합된 에피토프와 중첩하지 않는 별개의 에피토프에 결합하는 것으로 확인된다. 대개, 하나의 항체가 고정되고, 항원이 결합되고, 제2의 표지된(예를 들어, 비오틴화) 항체가 포획 항원에 결합하는 능력에 대해 ELISA 분석에서 시험된다. 이는 또한, Octet Red384 및 Octet HTX(ForteBio, Pall Inc)와 같은 생물층 간섭계 플랫폼에서만뿐만 아니라, ProteOn XPR36(BioRad, Inc), Biacore 2000 및 Biacore T200(GE Healthcare Life Sciences), 및 MX96 SPR 이미저(Ibis technologies B.V.)를 비롯한 표면 플라즈몬 공명(SPR) 플랫폼을 사용하여 수행될 수 있다. 더 자세한 내용은 본 명세서의 실시예를 참조한다.
- [0160] 일반적으로, 항체는 표준 기술, 예컨대 상기 경쟁 결합 분석으로 측정시 표적 항원에 대한 기준 항체의 결합을 약 15 내지 100% 감소시키는 경우 기준 항체와 "경쟁"한다. 다양한 실시형태에서, 상대적 억제율은 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 그 이상이다.
- [0161] 약제학적 조성물, 용도 및 치료 방법
- [0162] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 하나 이상의 항체를 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체와의 혼합물로 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용가능한 담체"의 예는 보조제, 고체 담체, 물, 완충제, 또는 치료 성분을 보유하기 위해 당업계에서 사용되는 다른 담체, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0163] 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 CD19에 결합하는 중쇄 항체(예를 들어, UniAb™)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 CD19 단백질 상에서 둘 이상의 비중첩 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 다중특이적(이중특이적을 포함함) 중쇄 항체(예를 들어, UniAb™)를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 CD19에 결합 특이성을 갖고 효과기 세포 상의 결합 표적(예를 들어, T-세포 상의 결합 표적, 예컨대, T-세포 상의 CD3 단백질)에 결합 특이성을 갖는 다중특이적(이중특이적 및 TCA를 포함함) 중쇄 항체(예를 들어, UniAb™)를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물은 CD19에 결합하고 효과기 세포 상의 결합 표적(예를 들어, T-세포 상의 결합 표적, 예컨대, T-세포 상의 CD3 단백질)에 결합하는 다중특이적(이중특이적 및 TCA를 포함함) 중쇄 항체(예를 들어, UniAb™)를 포함한다.
- [0164] 본 발명에 따라 사용되는 항체의 약제학적 조성물은 목적하는 정도의 순도를 갖는 단백질을 선택적인 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)] 참조)와 혼합하여 보관을 위해, 예컨대 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 용량 및 농도에서 수여자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸, 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신과 같은 아미노산; 당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스, 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0165] 비경구 투여용 약제학적 조성물은 바람직하게는 무균이고 실질적으로 등장성이며, GMP(Good Manufacturing Practice) 조건하에 제조된다. 약제학적 조성물은 단위 투약 형태(즉, 단일 투여에 대한 투여량)로 제공될 수 있다. 제형은 선택된 투여 경로에 따라 다르다. 본원의 항체는 정맥 주사 또는 주입 또는 피하로 투여될 수 있다. 주사 투여의 경우, 본원의 항체는 수용액, 바람직하게는 주사 부위의 불편함을 감소시키기 위해 생리학적으로 적합한 완충액으로 제형화될 수 있다. 용액은 상기 논의된 바와 같은 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함할

수 있다. 대안적으로, 항체는 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어, 발열원이 없는 멸균수와 함께 구성하기 위한 동결건조 형태일 수 있다.

[0166] 항체 제형은 예를 들어 미국 특허 9,034,324호에 개시되어 있다. 유사한 제형은 본 발명의 UniAbsTM를 포함하는 중쇄 항체에 대해 사용될 수 있다. 피하 항체 제형은, 예를 들어, US20160355591 및 US20160166689에 기재되어 있다.

[0167] 사용 방법

[0168] 본 명세서에 기재된 항-CD19 항체 및 약제학적 조성물은 본 명세서에 추가로 기재된 병태 및 질환을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, CD19의 발현을 특징으로 하는 질환 및 병태의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0169] CD19는 모든 인간 B-세포에서 발현되지만 형질 세포에서는 발견되지 않는 세포 표면 수용체이다. 그것은 상대적으로 큰 240개 아미노산의, 세포질 꼬리를 갖는다. 세포의 Ig-유사 도메인은 잠재적인 이황화물 연결 비-Ig 유사 도메인과 N-연결 탄수화물 추가 부위로 나뉘어진다. 세포질 꼬리에는 C-말단 근처에 적어도 9개의 티로신 잔기가 함유되어 있으며, 그 중 일부는 인산화된 것으로 나타났다. CD20 및 CD22와 함께, B-세포 계통에 대한 CD19의 제한된 발현은 B-세포 악성종양의 치료를 위한 매력적인 표적이 된다. 다수의 혈액학적 악성종양에서 관찰된 발현으로 인해, CD19는 항체-기반 치료법의 유망한 표적이다.

[0170] 한 양태에서, 본원의 항-CD19 항체 (예를 들어, UniAbsTM) 및 약제학적 조성물은 제한 없이 본원에 추가로 기술된 질환 및 장애를 포함하여 CD19의 발현을 특징으로 하는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0171] 본 발명의 항-CD19 중쇄-단독 항체(UniAbs)는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 비호지킨 림프종, B-세포 만성 림프구성 백혈병(ALL), 및 B-세포 급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 CD19의 발현을 특징으로 하는 혈액 악성종양의 치료용 치료제를 개발하는 데 사용될 수 있다.

[0172] 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL 또는 DLBL)은 성인들 사이에서 비호지킨 림프종의 가장 흔한 형태이며(Blood 1997 89 (11): 3909-18), 미국과 영국에서 연간 발병률은 100,000명당 7 내지 8건으로 추정된다. 이는 신체의 거의 모든 부위에서 발생할 수 있는 공격성 암으로 특징화된다. DLBCL의 원인은 잘 알려져 있지 않으며, 정상 B 세포뿐만 아니라 다른 유형의 림프종이나 백혈병 세포의 악성 형질전환에서도 발생할 수 있다. 치료 방법에는 일반적으로 화학요법과 방사선 요법이 포함되며, 성인의 전체 5년 생존율 평균은 약 58%이다. 일부 단클론 항체가 DLBCL 치료에 대한 가능성을 보여주었지만, 일관된 임상 효능은 아직 결정적으로 입증되지 않았다. 따라서, DLBCL에 대한 면역요법을 포함한 새로운 치료법에 대한 필요성이 매우 높다.

[0173] 또 다른 양태에서, 본원의 CD19 중쇄 항체(예를 들어, UniAbsTM) 및 약제학적 조성물은 전신 홍반성 루푸스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 및 다발성 경화증(MS)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 CD19를 발현하는 병원성 B-세포를 특징으로 하는 자가면역 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0174] 일 실시형태에서, 본원의 항체는 중쇄-단독 항-CD19 항체-CAR 구조, 즉 중쇄-단독 항-CD19 항체-CAR-형질도입된 T-세포 구조의 형태일 수 있다.

[0175] 질환의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지 여부, 기타 투여 약물, 및 치료가 예방적인지 치료적인지 여부를 포함한 다양한 요인에 따라 달라진다. 일반적으로, 환자는 인간이지만, 비인간 포유동물, 예를 들어 개, 고양이, 말 등과 같은 반려동물, 토끼, 마우스, 래트 등과 같은 실험용 포유동물 등도 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성과 효능을 최적화하도록 적정될 수 있다.

[0176] 투여량 수준은 통상의 숙련된 임상의로 인해 쉽게 결정될 수 있으며, 필요에 따라, 예를 들어 요법에 대한 대상체의 반응을 수정할 필요에 따라 수정될 수 있다. 단일 투약 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 다르다. 투약 단위 형태는 일반적으로 약 1 mg 내지 약 500 mg의 활성 성분을 함유한다.

[0177] 일부 실시형태에서, 제제의 치료적 투여량은 숙주 체중에 대해 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더 일반적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 체중(kg)당 1 mg 또는 체중(kg)당 10 mg, 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 2주에 1회, 또는 1개월에 1회, 또는 3 내지 6개월에 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 치료제는 일반적으로 여러 차례 투여된다. 단일 투여량 사이의 간격은 매주, 매월, 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 치료제의 혈중 농도를 측정하여 나타나는 바와 같이 불규칙할

수 있다. 대안적으로, 본 발명의 치료제는 서방형 제형으로서 투여될 수 있으며, 이 경우 덜 빈번한 투여가 필요하다. 투여량과 빈도는 환자에서의 폴리펩티드 반감기에 따라 다르다.

[0178] 일반적으로, 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로서 제조되며; 주사 전에 액체 비히클에 용해 또는 현탁시키기에 적합한 고체 형태가 제조될 수도 있다. 본원의 약제학적 조성물은 직접 또는 고체(예를 들어, 동결건조된) 조성물의 재구성 후, 정맥내 또는 피하 투여하기에 적합하다. 제제는 또한 유화되거나 리포솜 또는 마이크로 입자, 에컨대 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 공중합체에 캡슐화되어 상기 논의된 바와 같이 강화된 보조 효과를 가질 수 있다. 문헌[Langer, Science 249: 1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997]. 본 발명의 제제는 활성 성분의 지속적 또는 주기적 방출을 허용하는 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 무균, 실질적으로 등장성 상태로 제형화되며, 미국 식품의약국의 모든 GMP(Good Manufacturing Practice) 규정을 완전히 따른다.

[0179] 본원에 기재된 항체 및 항체 구조의 독성은 세포 배양 또는 실험 동물의 표준 약학 절차에 의해, 예를 들어 LD50(집단의 50%를 치사에 이르게 하는 용량) 또는 LD100(집단의 100%를 치사에 이르게 하는 용량)을 결정함으로써 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량비는 치료 지수이다. 이러한 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 얻은 데이터는 인체에 사용하기에 독성이 없는 투여량 범위를 공식화하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 항체의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 유효 용량을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투약 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로, 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 의사 각자가 선택할 수 있다.

[0180] 투여용 조성물은 일반적으로, 약제학적으로 허용가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체에 용해된 항체 또는 기타 제거제(ablative agent)를 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등이 사용될 수 있다. 이러한 용액은 무균이며 일반적으로는 바람직하지 않은 물질을 함유하지 않는다. 이러한 조성물은 기존의 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건에 가깝게 하는 데 필요한 약제학적으로 허용가능한 보조 물질, 에컨대 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이러한 제형에서의 활성제의 농도는 크게 달라질 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 필요에 따라 주로 체액 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) 및 Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)]).

[0181] 본 발명의 활성제, 이의 제형, 및 사용 지침을 포함하는 키트도 본 발명의 범위에 속한다. 키트는 적어도 하나의 추가 시약, 예를 들어 화학요법 약물 등을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 일반적으로 키트 내용물의 용도를 나타내는 라벨을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "라벨"이라는 용어는 키트에 또는 키트와 함께 제공되거나, 달리 키트에 부착되는 임의의 글 또는 녹음 자료를 포함한다.

[0182] 이제 본 발명을 충분히 설명하였지만, 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어남이 없이 다양한 변경 및 수정이 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.

[0183] III. 실시예

[0184] 실시예 1: CD19+ Raji 세포에 대한 결합

[0185] CD19-양성 Raji 세포에 대한 결합을 유세포 분석법으로 평가했다. 간략하게 말하면, 50,000개의 표적 세포를 4^É에서 30분간 정제된 UniAbsTM의 일련의 희석액으로 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 유세포 분석 완충액(1X PBS, 1% BSA, 0.1% NaN₃)으로 2회 세척하고, R-피코에리트린(PE)에 접합된 염소 F(ab')₂ 항-인간 IgG으로 염색하여(Southern Biotech, 카탈로그 #2042-09) 세포-결합 항체를 검출하였다. 4^É에서의 20분 인큐베이션 후, 세포를 유세포 분석 완충액으로 2회 세척하고, 평균 형광 강도(MFI)를 유세포 분석법으로 측정하였다. 2차 항체 단독으로 염색된 세포의 MFI를 배경 신호 결정에 사용하고, 각 항체의 결합을 배경에 비해 접히도록 변환했다.

[0186] 결과는 도 1에 제공되어 있으며, 이는 표시된 항-CD19 항체의 표적 결합 활성을 요약한다. 1열은 HCAb의 클론 ID를 나타낸다. 2열은 배경 MFI 신호에 대한 배수로서 측정된 Raji 세포에 대한 결합을 나타낸다. 3열은 배경 MFI 신호에 대한 배수로서 측정된 CD19 단백질을 발현시키지 않는 CHO 세포(음성 대조군)에 대한 결합을 나타낸다.

- [0187] **실시예 2: CD19+ Raji 및 Daudi 세포에 대한 결합**
- [0188] 세포-결합 용량 곡선은 실시예 1에 설명된 대로 Raji(A) 및 Daudi(B)의 두 세포주에서 수행되었다. 항체는 8점 용량 곡선의 경우 200 nM의 시작 농도에서 테스트한 후 3배 연속 희석하여 테스트하였다. PE 평균 형광 강도는 배경에 대한 배수로 플롯팅되었다(2차 검출 항체만으로 인큐베이션된 세포).
- [0189] 결과는 도 2의 패널 A(Raji 세포) 및 패널 B(Daudi 세포)로 제공된다.
- [0190] **실시예 3: CD19+ 세포주의 세포 결합 EC50 값**
- [0191] 세포 결합 EC50 값을 측정하기 위해, 실시예 2에 설명된 대로 CD19-발현 세포주 Raji 및 Daudi에 대해 세포 결합 용량 곡선을 수행하였다. 항체는 8점 용량 곡선의 경우 200 nM의 시작 용량에서 테스트한 후 3배 연속 희석하여 테스트하였다. 변환된 데이터는 EC50(nM)을 얻기 위해 비선형 회귀 곡선 맞춤(GraphPad Prism 8.4.3에서 사용 가능)을 사용하여 xy-그래프로 플롯팅하였다.
- [0192] 결과를 도 3에 제공한다.
- [0193] **실시예 4: 인간 중앙 세포주에 의한 CAR-T 매개 T-세포 활성화**
- [0194] 항-CD19 CAR 및 6x NFAT TK 나노 루시퍼라제 리포터로 Jurkat T 림프구 세포를 공동-형질감염시켜 CAR-T 세포 활성을 측정하였다. 형질감염된 Jurkat를 CD19+ Raji, Ramos, 및 SU-DHL-10, 또는 CD19-음성 K562 세포와 함께 24시간 동안 공동-배양하였다. Promega Nano-Glo 루시퍼라제 분석 시스템(카탈로그 # N1110)을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하고, 데이터를 CAR 형질감염된 Jurkat 및 CD19 음성 K562 세포주를 함유하는 공동 배양물로 정규화하였다. 통계적 유의성은 독립표본 양방 t-검정을 사용하여 결정되었다.
- [0195] 결과를 도 4의 패널 B 및 C에 제공한다.
- [0196] 도 4의 패널 A는 본 발명의 양태에 따른 항체 서열을 포함하는 항-CD19 세포의 결합 도메인을 포함하는 CAR-T 구조의 개략도이다. 패널 B는 Raji(**p= 0.0055), Ramos(**p=0.0058), 및 SU-DHL-10(***p=0.00025)로 항-CD19 370034 CAR을 형질감염시킨 Jurkat의 T 세포 활성을 도시한다. 패널 C는 Raji(****p=0.000009), Ramos(**p=0.004), 및 SU-DHL-10(*p=0.016)으로 항-CD19 370083 CAR을 형질감염시킨 Jurkat의 T 세포 활성을 도시한다.
- [0197] **실시예 5: 부위-포화 돌연변이유발을 통해 향상된 생물학적 특성을 나타내는 CD19 VH 결합체의 생성**
- [0198] 본 실시예에서, 부위-포화 돌연변이유발을 사용하여 야생형 아미노산 암호화 서열이 다른 19개 아미노산 암호화 서열 중 하나로 체계적으로 대체되어 모체 VH 결합체에 비해 시험관내 및/또는 생체내 특성이 개선된 CD19 VH 결합체를 확인하기 위해 스크리닝될 수 있는 돌연변이 풀을 생성하는, 독특한 CD19 VH 결합 서열 풀을 생성하였다.
- [0199] CD19 VH 결합체 VH-034는 3개의 상보성-결정 영역("CDR")을 포함한다: CDR1(8개 아미노산; 서열번호 1), CDR 2(8개 아미노산; 서열번호 2) 및 CDR3(10개 아미노산; 서열번호 4). 조합된 26개의 CDR 아미노산 각각을 다른 19개의 나머지 비야생형 아미노산 잔기 중 하나로 체계적으로 치환하여 세 가지 CDR 서열 모두를 스페닝하는 단일 CDR 아미노산 치환을 포함하는 513개의 독특한 CD19 VH 결합체 서열의 라이브러리를 생성하기 위해 부위-포화 돌연변이유발을 사용하였다.
- [0200] 간략하게 말하면, VH-034를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 부위-포화 돌연변이유발을 위한 DNA 주형 역할을 했다(예를 들어, Chronopoulou and Labrou (2011) Curr Protocol Protein Sci Chapter 26 doi: 10.1002/0471140864.ps2606s63). PCR 및 축퇴성 합성 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여, 동일한 반응에서 하나의 코돈을 20개의 아미노산 코돈 모두로 대체한 다음, 이를 26개의 CDR 코돈 각각에 체계적으로 적용했다. 각각 단일 아미노산 치환을 암호화하는, 생성된 513-구성원 핵산 풀과 모체 야생형 서열을 나노플라스미드 벡터에 클로닝하고, 플라스미드 풀에 있는 각각의 513개의 독특한 VH 결합 서열의 빈도를 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 결정했다.
- [0201] 나노플라스미드 벡터 nPBv2-EF1a-iC9-CD19.VH034-DHFR.은, 5'에서 3' 방향으로 다음을 포함한다: 오른쪽 말단 ITR- 5'UTR - 절연체 - EF1a 프로모터 - 유도성 iCaspase9 유전자 - T2A - CD8a 리더 펩티드 - VH034 결합체를 위한 부위 - CD19BBZ CAR 카세트 - T2A - DHFR 선택가능 마커 - SV40 폴리A - 절연체 - 3'-UTR 및 왼쪽 말단 ITR. 각각의 독특한 결합체 서열은 EF1a 프로모터의 제어 하에 CD19BBZ CAR 카세트에 인프레임 클로닝되어, 전

장 CAR (CD19 VH 결합제-CD28 힌지-41-BB 막형단 도메인 및 CD3제타 도메인)을 생성하였다.

[0202] 실시예 6: 돌연변이 CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR-발현 T-세포 풀의 생성

[0203] 본 실시예에서, 513개의 CD19 VH 결합제 서열 중 하나를 포함하는 CAR을 발현하는 개별 T-세포의 T-세포 풀이 생성되었다.

[0204] 실시예 5에서 생성된 513개의 CD19 VH 결합제 나노플라스미드의 라이브러리를 포함하는 T-세포 풀은 T-세포를 SuperpiggyBac 트랜스포사제를 암호화하는 mRNA 및 낮은 DNA 카피 수의 DNA 나노플라스미드 풀의 분취량으로 전기천공하여 제조하여, 전기천공된 T-세포가 513개의 나노플라스미드 중 하나의 단일 카피본만을 포함한다는 사실을 보장했다. 전기천공된 T-세포 집단을 250 nM 메토틀렉세이트에서 인큐베이션하여, CAR-발현 트랜스포손의 통합된 게놈 카피를 포함하는 전위된 T-세포를 위해 선택하였다. T-세포 풀의 513개 고유 결합제 서열 각각의 빈도는 NGS에 의해 결정하였다.

[0205] 실시예 7: 반복된 CD19 자극에 의해 향상된 결합을 나타내는 CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포의 강화

[0206] 본 실시예는 특정 항원에 대한 반복적인 노출 및 항원 자극으로 인해 우선적으로 숫자가 증가하는 T-클론을 선택함으로써, 선택된 T-세포 클론이 T-세포 집단 내에서 풍부해질 수 있음을 설명한다.

[0207] 한 실험에서, Grex-6M 웰 플레이트에서 실시예 6에서 생성된 T-세포 풀로부터의 T-세포의 웰당 대략 20 x 10e6 개 T-세포를 각 웰에 중복 세트에 첨가하였다. 한 세트에는, 2 x 10e6 RAJI 세포(CD19+)를 추가하고 다른 세트에는 비활성 CD19 유전자(RAJI KO)를 갖는 2 x 10e6 대조군 RAJI 세포를 추가하여 CD19-CAR 발현 T-세포의 활성화를 자극했다. T-세포를 3일, 6일, 9일에 각각 2 x 10e6 RAJI 세포 또는 RAJI KO로 재challenge했다. 12일 후, RAJI 세포에 의해 자극된 T-세포 풀의 분류되지 않은 확장은 약 20배인 반면, RAJI KO 세포를 사용하는 확장이 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다.

[0208] CD19+ 세포를 NGS로 분석하여 확장된 CD19+ T-세포 집단 내의 513개 돌연변이 결합제 서열 각각의 빈도를 결정하고, 각 구성원의 이 빈도를 원래의 플라스미드 및 T-세포 풀 집단과 비교하여 분석했다.

[0209] 두 번째 실험에서는, 실시예 6에서 생성된 T-세포 풀을 토끼 항-인간 IgG 항체로 처리하여 CAR 양성 세포를 포획하고, CAR 세포를 분류하고 FACS 분석으로 분석했다. 그런 다음, 분류된 CAR 양성 T-세포 풀을 RAJI CD19+ 세포 또는 RAJI-KO로 재challenge시키고, 15일 후(RAJI 세포에 의한 6회 자극) T-세포의 대략 40배 확장이 관찰되었다. CAR+ T-세포를 NGS로 분석하여 확장된 CAR+ T-세포 집단 내의 513개 돌연변이 결합제 서열 각각의 빈도를 결정하고, 각 구성원의 이 빈도를 원래의 플라스미드 및 T-세포 풀 집단과 비교하여 분석했다.

[0210] 원래의 플라스미드 집단, T-세포 풀 및 2가지 농축 조건 각각 내에서 각 VH 결합제의 상대 빈도를 비교함으로써, 각 VH 결합제 서열의 빈도의 상대적 변화를 결정할 수 있다. 513개 VH 결합제 서열의 대부분은 RAJI 처리된 T-세포 풀에서 고갈되었으며, 이는 이들 돌연변이가 CD19 결합과 관련하여 해롭다는 것을 시사하는 반면, VH 결합제 서열의 일정 비율의 빈도는 CD19 자극에 의해 상대적으로 변하지 않은 채로 남아 있어 도입된 돌연변이가 CD19 결합에는 거의 영향을 미치지 않았을 수 있음을 시사한다. 특정 T-세포 클론은 두 가지 분석에서 농축된 것처럼 보이는 T-세포 클론의 중복 목록을 생성하는 두 가지 농축 분석을 사용하여 CD19 자극에 의해 농축되었다.

[0211] 두 농축 분석에서 관찰된 상위 12개 VH 결합제를 추가로 분석하였다. RAJI 세포를 사용한 반복 자극 후 두 개의 특정 T-세포 클론이 T-세포 집단에서 매우 풍부해졌다. 제1 T-세포 클론은 CDR1(서열번호 38)에 T29D 돌연변이를 포함하는 CD19 VH 결합제를 발현하는 CAR을 포함했으며, 제2 T-세포 클론은 CDR2(서열번호 39)에 S55D 돌연변이를 포함하는 CD19 VH 결합제를 발현하는 CAR을 포함했다.

[0212] 2개의 농축된 CD19 VH 결합제 T29D 및 S55D는 시험관내 및 생체내 분석을 통해 추가로 특징화하였다.

[0213] 실시예 8: T29D 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 향상된 시험관내 세포독성을 나타낸다

[0214] 본 실시예는 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH034 결합제와 비교하여 CD19 발현 세포에 대해 더 높은 수준의 시험관내 세포독성을 나타냄을 예시한다. 도 5의 패널 A 및 B는 모 VH-034 결합제와 비교하여, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포 사이에 대한 비교 시험관내 세포독성 결과를 보여주는 그래프이다. 보다 구체적으로, 결과는 모 VH-034 결합제와 비교하

여 Nalm6(도 5의 패널 A 참조) 또는 RAJI(도 5의 패널 B 참조) 세포를 사용한 CD19 자극 시 시험관내 세포독성을 보여준다.

[0215] 96 웰 플레이트에서, 모 VH-034 결합제, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포의 웰 당 대략 20,000개 T-세포를 이중 세트로 각 웰에 첨가하였다. 한 세트에는, 10,000개의 RAJI-GFP 세포를 첨가하고, 다른 세트에는 10,000개의 Nalm6-GFP 세포를 첨가하여 CD19-CAR 발현 세포의 활성화를 자극했다. T-세포를 48시간, 116시간 및 172시간에 각각 30,000개의 RAJI-GFP 또는 Nalm6-GFP로 재채린지하였다. 시험관내 세포독성은 Incucyte를 통해 252시간(Nalm6-GFP의 경우) 또는 188시간(RAJI-GFP의 경우) 동안 실시간으로 측정하였다.

[0216] **실시예 9: T29D 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 개선된 시험관내 T-세포 활성화를 나타낸다**

[0217] 본 실시예는 CD19 자극에 의해 농축된 CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH034 결합제와 비교하여 더 높은 수준의 시험관내 T-세포 활성화를 나타냄을 예시한다.

[0218] 도 6은 모 VH-034 결합제와 비교하여, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포에서의 개선된 시험관내 T-세포 활성화를 요약한 표이다. 0.1×10^6 Nalm6 또는 RAJI 세포를 첨가하여 모 VH-034 결합제, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 대략 0.2×10^6 T-세포를 활성화하고, 배양물은 37°C에서 16시간 동안 10% FBS가 보충된 RPMI 1640 배지에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, T-세포를 FACS 분석으로 분석하여 T-세포 활성화의 지표인 CD25 발현을 정량화하였다. 각각의 VH 결합제에 대한 활성화된 T-세포의 CD25의 기하 평균 형광 강도(gMFI)를 도 6에 도시된 표에 나타내었다.

[0219] 도 6에 도시된 표에 나타낸 바와 같이, T29D 및 S55D CD19 VH 결합제는 모 CD19 VH-034 결합제와 비교하여 개선된 T-세포 활성화를 나타냈는데, 이는 이러한 치환이 CD19 발현 세포에 의한 T-세포 활성화를 개선한다는 것을 입증한다.

[0220] **실시예 10: T29D VH 결합제 또는 S55 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 더 높은 생체내 CAR 수준을 발현한다**

[0221] 본 실시예는 CAR 형식의 농축된 CD19 VH 결합제가 모 VH-034 결합제와 비교하여 T-세포에서 더 높은 CAR 수준을 발현한다는 것을 보여주는 표이다.

[0222] 도 7은 CAR 형식의 강화된 CD19 VH 결합제가 모 VH-034 결합제와 비교하여 T-세포에서 더 높은 CAR 수준을 발현한다는 것을 보여주는 표이다. 모 VH-034 결합제, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 대략 10×10^6 T-세포를 MICE(n=5)에 투여하였다. 14일 후, 치료된 동물로부터 혈액 샘플을 채취하고, 혈액을 ACK 완충액으로 용해하여 적혈구를 제거했다. 그런 다음, 순환 T-세포를 CD19+ 세포에 대한 FACS 분석 게이팅에 의해 분석하고, CAR-발현 세포의 수를 각 샘플에 대해 결정하였다. 그 결과를 도 7에 도시된 표에 나타내었다.

[0223] 도 7에 도시된 표에 나타낸 바와 같이, CD19 CAR+ 순환 T-세포의 평균 수는 모 VH-034 결합제와 비교하여 T29D 및 S55D VH 결합제에 대해 각각 약 35% 및 65% 더 높았다.

[0224] **실시예 11: T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 개선된 생체내 T-세포 확장을 입증한다**

[0225] 본 실시예는 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH-034를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포와 비교하여 개선된 생체내 T-세포 확장을 나타낸다는 것을 예시한다.

[0226] 도 8은 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 개선된 생체내 T-세포 확장을 나타냄을 보여주는 표이다. NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Szj(n=5/그룹)에게 야생형 VH-034 결합제, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 10×10^6 T-세포를 투여하였다. 3, 7 및 14일차에, 처리된 마우스로부터 혈액 샘플을 채취하고, 혈액 1 μ L당 순환 T-세포의 수를 결정하였다. 그 결과를 도 8에 도시된 표에 나타내었다.

[0227] 도 8에 도시된 표에 나타낸 바와 같이, T-세포 확장의 동역학 및 크기는 모 VH-034 결합제 또는 2개의 돌연변이 VH 결합제 중 하나를 발현하는 T-세포 사이에서 상이하다. 예를 들어, S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하

는 T-세포는 S55D T-세포의 피크 확장이 3일인 반면 T29D T-세포의 피크 확장은 14일이라는 점에서 T29D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포와 다른 동역학을 나타낸다. 더욱이, 2개의 돌연변이 VH 결합제 각각은 모 VH-034 T-세포와 비교할 때 개선된 동역학을 입증했다.

- [0228] **실시예 12: T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 감소된 생체내 T-세포 고갈을 입증한다**
- [0229] 본 실시예는 CD19 결합을 위해 농축된 CD19 VH 결합제 중 하나를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH-034 결합제와 비교하여 감소된 생체내 T-세포 고갈을 나타냄을 예시한다.
- [0230] 모 VH-034, T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 발현하는 대략 10×10^6 T-세포를 성체 NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Szj 마우스(n=5/그룹)에 투여하였다. 21일 후, 처리된 동물로부터 혈액 샘플 대략 100 μ l를 채취하고, 각 샘플의 적혈구를 ACK 용해 완충액으로 제거하였다. PD-1 또는 TIGIT-1을 발현하는 세포에 대한 게이팅에 의한 FACS 분석을 통해 각 샘플의 T-세포 고갈 정도를 결정했으며, 이는 T-세포 고갈의 알려진 마커이다. 도 9는 T29D 또는 S55D CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH-034 CD19 결합제에 비해 더 적은 T-세포 소모를 나타냄을 보여주는 표이다.
- [0231] 도 9의 표에 나타낸 바와 같이, T29D 또는 S55D CD19 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 PD-1 또는 TIGIT 발현 T-세포의 수의 감소에 의해 입증되는 바와 같이 21일차에 더 적은 T-세포 고갈을 나타냈는데, 이는 이들 세포의 더 큰 백분율이 모 VH-034 CD19 결합제와 비교하여 비-고갈 상태로 유지됨을 입증한다.
- [0232] **실시예 13: T29D VH 결합제 또는 S55 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 개선된 생체내 효능을 나타낸다**
- [0233] 본 실시예는 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 모 VH-034 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포와 비교하여 개선된 생체내 효능을 나타낸다는 것을 예시한다.
- [0234] 0일차에, 6주 내지 7주령의 성체 암컷 NGS(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Szi) 마우스(n=5/그룹)에게 루시페라제를 발현하도록 유전적으로 조작된 0.5×10^6 RAJI 세포를 정맥내로 투여하였다. 5일차에, 모 VH-034 결합제, T29D VH 결합제 또는 S55 VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 10×10^6 T-세포를 마우스에 투여하였다. 마우스를 55일 동안 모니터링하였다.
- [0235] 종양 진행을 모니터링하기 위해 연구 과정 동안 매주 간격으로 마취된 마우스에 대해 전신 생물발광 영상화("BLI")를 수행하였고, 8일, 12일, 18일, 25일, 32일, 39일 및 55일에 치료된 동물로부터 전혈을 수집했다. 55일째에 마우스를 안락사시키고, 추가 분석을 위해 그들의 혈액, 비장 및 대퇴골 골수를 수집했다.
- [0236] 도 10은 T29D VH 결합제 또는 S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 종양 제어를 나타냄을 보여주는 요약된 데이터를 갖는 그래프이다. 도 11은 도 10에 보여진 결과와 동일한 결과를 나타내는, 압축되지 않은 개별 마우스 모델 데이터를 보여주는 그래프이다. 제시된 바와 같이, 모 VH-034를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포는 연구 과정에 걸쳐 종양 성장을 제어하는 데 적당한 효과를 가졌다. 대조적으로, T29D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 투여된 5마리의 마우스 중 5마리가 55일까지 완전한 종양 제어 및 퇴행을 나타냈다. 이와 유사하게, S55D VH 결합제를 포함하는 CAR을 발현하는 T-세포가 투여된 5마리의 마우스 중 3마리가 적어도 30일까지 완전한 종양 제어 및 퇴행을 나타냈다. 이들 결과는 T29D 및 S55D 돌연변이를 포함하는 농축된 CD19 VH 결합제가 RAJI 모델에서 관찰된 개선된 생체내 효능에 기여한다는 것을 나타낸다.
- [0237] 본 발명의 바람직한 실시형태를 본 명세서에 나타내고 기재하였지만, 이러한 실시형태는 단지 예로서 제공되는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 당업자에게는, 이제 본 발명을 벗어나는 일 없이, 수많은 변형, 변경 및 치환이 떠오를 것이다. 본 명세서에 기재된 본 발명의 실시형태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 다음의 청구범위가 본 발명의 범주를 정한다는 것과, 이에 의해 이들 청구범위의 범주 내의 방법 및 구조 및 이들의 균등물을 아우르는 것으로 의도된다.

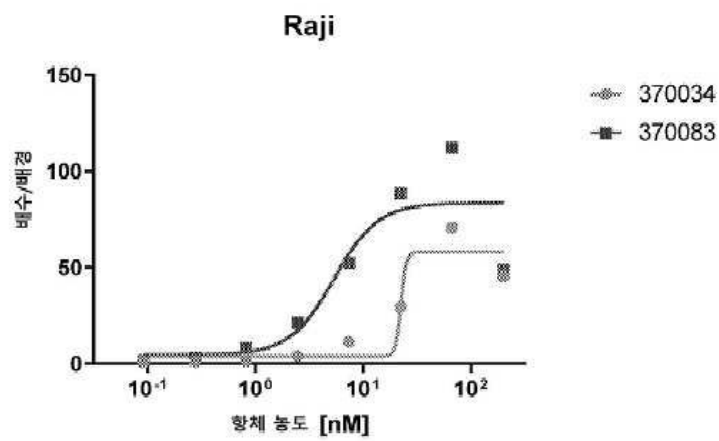
도면

도면1

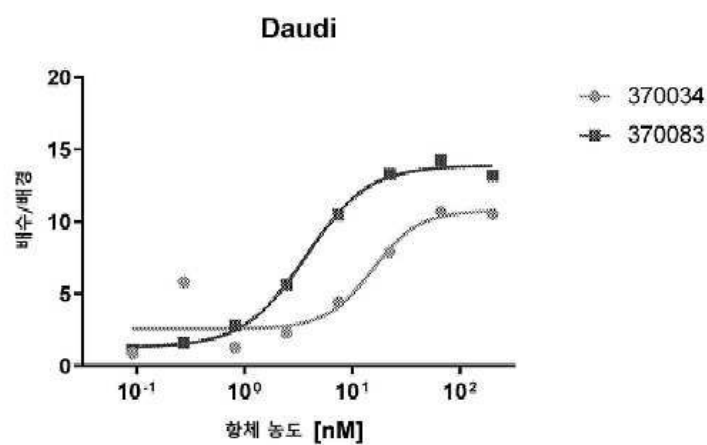
1열	2열	3열
클론 ID	Raji 세포	CHO OFFtgt
370083	120.5	1.0
370034	80.3	1.0

도면2

A.



B.

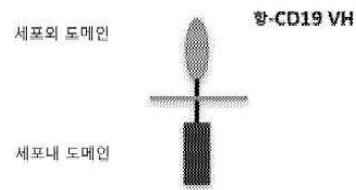


도면3

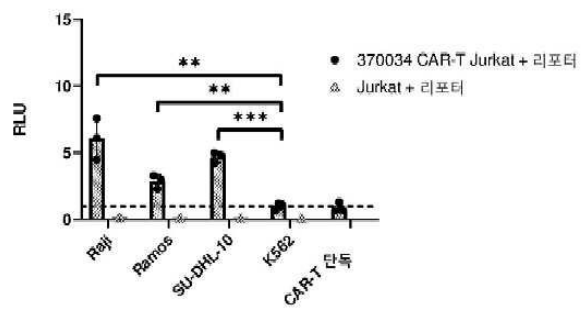
1열	2열	3열
클론 ID	Raji 세포	Daudi 세포
370083	5.361	3.723
370034	22.36	15.42

도면4

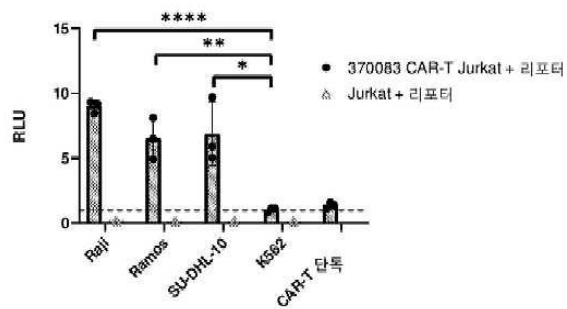
A.



B.

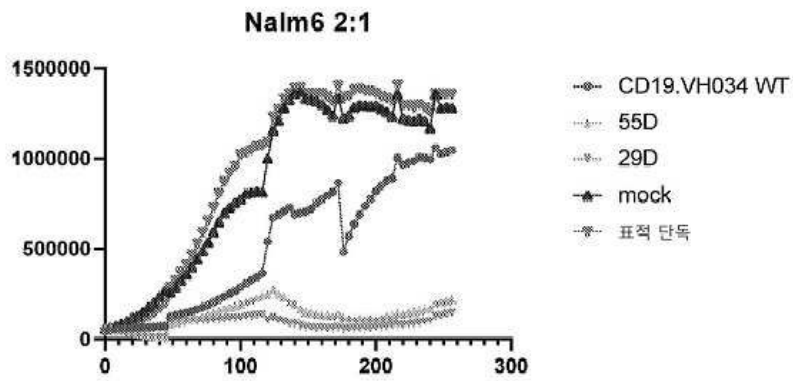


C.

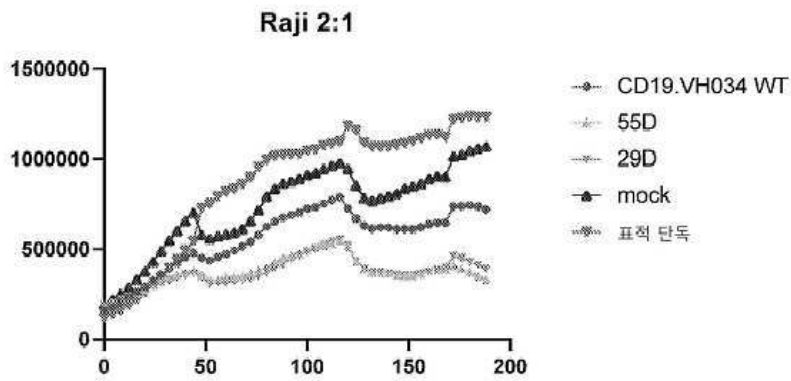


도면5

A.



B.



도면6

CD25gMFI	T-세포 단독	RAJI 세포	Nalm6 세포
VH-034	642	1497	921
T29D	531	2562	1285
S55D	560	2091	1169

도면7

VH 결합제	% CAR 발현 (14일 차)
PanT (Neg)	4.4
VH-034	22.9
T29D	30.9
S55D	37.7

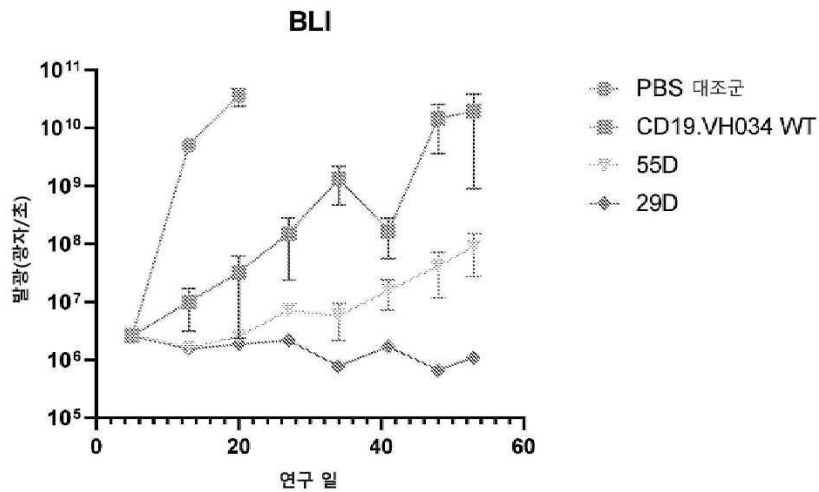
도면8

VH 결합제 마우스 #	3일차	7일차	14일차
VH-034 M1	2.7	7.2	2.9
VH-034 M2	0.9	9.1	1.9
VH-034 M3	4.6	17.1	3.7
VH-034 M4	15.0	19.5	21.1
VH-034 M5	3.7	18.3	0
VH T29D M1	27.0	45.7	74.0
VH T29D M2	67.1	26.1	105.4
VH T29D M3	37.4	48.5	14.4
VH T29D M4	63.6	26.2	39.2
VH-T29D M5	77.7	44.6	109.0
VH S55D M1	78.7	102.4	81.1
VH S55D M2	28.9	64.4	14.4
VH S55D M3	34.4	74.0	24.0
VH S55D M4	33.0	55.0	18.1
VH-S55D M5	41.7	78.6	35.7

도면9

CD19 VH 결합제	PD-1 (gMFI)	TIGIT (gMFI)
VH-034	65.2	141
T29D	27.2	99
S55D	10.6	68

도면10



도면11

