(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월07일
(11) 등록번호 10-2663073
(24) 등록일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7021738
(22) 출원일자(국제) 2016년01월08일
심사청구일자 2021년01월08일
(85) 번역문제출일자 2017년08월03일
(65) 공개번호 10-2017-0128222
(43) 공개일자 2017년11월22일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/050296
(87) 국제공개번호 WO 2016/110576
국제공개일자 2016년07월14일
(30) 우선권주장
PCT/EP2015/050276 2015년01월08일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008145141 A1*
WO2014047231 A1*
WO2014108483 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠맵 에이/에스
덴마크 2500 발뷔 칼 야콥센 바이 30
(72) 발명자
엥겔베르츠, 파트릭
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
브레이, 에스터르
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 윤소라

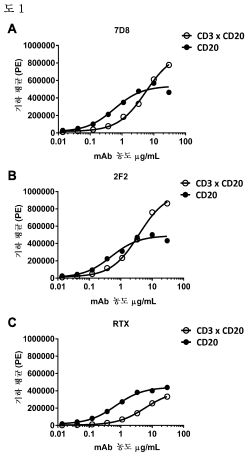
(54) 발명의 명칭 **CD3 및 CD20에 대한 이중특이적 항체**

(57) 요 약

본 발명은 CD3 및 CD20에 대해 유도된 이중특이적 항체 및 이러한 이중특이적 항체의 용도, 특히 CD20을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 질환의 치료에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

도 1



(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)

(72) 발명자
라데마커르, 릭
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
알틴타스, 이실
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
새틴, 다비트
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
페르플루헌, 산드라
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
라데르스마, 림커 판 데이크하위전
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
판 덴 브링크, 에드바르트
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
스휘르만, 야니너
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.
파런, 파울
네덜란드 3584-씨엠 유트레흐트 얄렐란 60 젠맵 비.브이.

(30) 우선권주장
PA 2015 00412 2015년07월15일 덴마크(DK)
PA 2015 00413 2015년07월15일 덴마크(DK)
PA 2015 00415 2015년07월16일 덴마크(DK)
PA 2015 00416 2015년07월16일 덴마크(DK)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 결합성 아암 및 제2 결합성 아암을 포함하는 이중특이적 항체이며, 여기서

(a) 제1 결합성 아암이 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하고,

여기서 상기 제1 항원 결합성 영역이 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 제1 중쇄 가변 서열 (VH) 및 제1 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 서열 (CH)을 포함하는 제1 중쇄, 및

서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 제1 경쇄 가변 서열 (VL) 및 제1 경쇄 불변 서열 (CL)을 포함하는 제1 경쇄를 포함하고,

(b) 제2 결합성 아암이 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역을 포함하고,

여기서 상기 제2 항원 결합성 영역이 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 제2 중쇄 가변 서열 (VH) 및 제2 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 서열 (CH)을 포함하는 제2 중쇄, 및

서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 제2 경쇄 가변 서열 (VL) 및 제2 경쇄 불변 서열 (CL)을 포함하는 제2 경쇄를 포함하며,

여기서 상기 이중특이적 항체가 제1 또는 제2 결합성 아암 둘 중 하나에서 서열식별번호: 29에 제시된 바와 같은 경쇄 불변 서열 (CL)을 포함하고;

여기서 상기 제1 및 제2 중쇄 각각에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이고, 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따르는 것인,

이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, (i) 인간 IgG 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 R이거나, 또는 (ii) 인간 IgG 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 L이고, 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따르는 것인, 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 IgG 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 R이고, 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따르는 것인, 이중특이적 항체.

청구항 4

제1항에 따른 이중특이적 항체 및 담체를 포함하는 조성물로서, B-세포 림프종 또는 B 세포 백혈병의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물이 확산성 대형 B 세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종 또는 만성 림프구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CD3 및 CD20에 대해 유도된 이중특이적 항체 및 이러한 이중특이적 항체의 용도, 특히 CD20을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 질환의 치료에 있어서의 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] CD3은 수년 동안 공지되어 왔으므로, 많은 측면에 있어서 관심의 대상이 되어 왔다. 구체적으로는, CD3 또는 T-세포 수용체 복합체 (CD3이 그의 일부이다)에 대항하여 생성된 항체가 공지되어 있다. 5개의 인간화 OKT3 이펙터(effector) 기능 변이체 항체의 시험관내 특징 규명이 보고되었다 (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26).

[0003] 항-CD3 모노클로날 항체 hOKT3감마1(Ala-Ala)로 처리하면, 지속적인 면역억제성 의약의 부재하에서도 유형 1 당뇨병의 발병 후 적어도 2년 동안 C-펩티드 반응과 임상 파라미터가 개선된다 (Herold et al., 2005, Diabetes, 54(6):1763-9).

[0004] 시노몰구스(cynomolgus) 및/또는 레서스(rhesus) 원숭이 CD3과 교차 반응성인 CD3 항체가 보고되었다 (WO2012162067, WO2008119567).

[0005] 표적화 항체 요법을 개선하기 위한 유망한 접근 방식은 세포독성 세포를 항원-발현성 암 세포에 특이적으로 전달하는 것이다. 이와 같이 종양 세포를 효율적으로 사멸하기 위하여 T-세포를 사용하는 개념은 문헌 (Staerz, et. al., 1985, Nature 314:628-631)에 보고되었다. 그러나, 초기 임상 연구는 주로 이중특이적 항체의 낮은 효능, 심한 부작용 (시토카인 발작) 및 면역원성으로 인해 오히려 실망스러웠다 (Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24:89-98). 이중특이적 항체의 설계 및 적용에 있어서의 진보는 용량 제한 독성 없이 시토카인 발작의 초기 장벽을 부분적으로 극복하였고 임상 유효성을 개선시켰다 (Garber, 2014, Nat. Rev. Drug Discov. 13:799-801; Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25:365-379). 카투막소맙(catumaxomab)에 대하여 기재된 바와 같은 (문헌 [Berek et al. 2014, Int. J. Gynecol. Cancer 24(9):1583-1589]; [Mau-Sørensen et al. 2015, Cancer Chemother. Pharmacol. 75: 1065-1073]) 시토카인 발작의 초기 장벽을 극복하는 데 중요한 것은 Fc 도메인의 부재 또는 침묵이었다.

[0006] CD20 분자 (인간 B-림프구-제한된 분화 항원 또는 Bp35로 지칭되기도 함)는 프리-B 및 성숙한 B 림프구 상에 위치하고 분자량이 대략 35 kD인 소수성 막횡단 단백질이다 ([Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287]; 및 [Einfield et al., (1988) EMBO J. 7(3):711-717]). CD20은 말초 혈액 또는 림프성 기관으로부터의 B 세포의 90% 초과의 표면 상에서 발견되고, 초기 프리-B 세포 발생 동안 발현되며 혈장 세포 분화까지 남아있다. CD20은 정상적인 B 세포뿐만 아니라 악성 B 세포 상에도 존재한다. 특히, CD20은 B 세포 비-호지킨(Hodgkin) 림프종 (NHL)의 90% 초과에서 발현되지만 (문헌 [Anderson et al. (1984) Blood 63(6):1424-1433]), 조혈 줄기 세포, 프로-B 세포, 정상 혈장 세포, 또는 다른 정상 조직에서는 발견되지 않는다 (Tedder et al. (1985) J. Immunol. 135(2):973-979).

[0007] CD20을 표적화함으로써 암 뿐만 아니라 자가면역 및 면역 질환을 치료하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 키메라 CD20 항체 리툭시맙(rituximab)은 암, 예컨대 비-호지킨 림프종 (NHL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 및 소형 림프구성 림프종 (SLL)을 치료하는 데 사용되어 왔거나 또는 이를 치료하는 데 사용하는 것으로 제안되었다. 인간 모노클로날 CD20 항체 오파투무맙(ofatumumab)은 특히 각종 CLL 적응증, 여포성 림프종 (FL), 시각 신경척수염 (NMO), 확산성 및 재발 관해형 다발성 경화증 (RRMS)을 치료하는 데 사용되어 왔거나 또는 이를 치료하는 데 사용하는 것으로 제안되었다. 인간 모노클로날 CD20 항체 오비누투주맙(obinutuzumab)은 CLL을 치료하는 데 사용되어 왔거나 또는 이를 치료하는 데 사용하는 것으로 제안되었다. 더욱이, 인간화 CD20 항체 옥렐리주맙(ocrelizumab)이 RRMS를 위해 개발 중에 있다.

[0008] 문헌 [Gall et al. (2005 Experimental Hematology 33:452)]에는 CD20-특이적 키메라 항체 리툭시맙 [리툭산(Rituxan)]을 항-CD3 (오르토클론 OKT-3)과 화학적으로 이종 접합시킴으로써 생성된 CD3xCD20 이중특이적 항체

CD20bi가 개시되어 있다.

[0009] 문헌 [Stanglmaier et al. (2008 Int. J. Cancer: 123, 1181)]에는 CD20-특이적 마우스 IgG2a와 CD3-특이적 래트 IgG2b를 조합한 삼관능성 이중특이적 항-CD3x항-CD20 항체 Bi20/FBTA05가 기재되어 있다.

[0010] 문헌 [Wu et al. (2007 Nat Biotechnol. 25: 1290-1297)] 및 WO2011014659에는 이중-특이적 (CD3 및 CD20), 4가 면역글로불린 G (이중-가변-도메인 면역글로불린, DVD-Ig)가 기재되어 있다.

[0011] WO2011090762에는 CD3xCD20 폴리펩티드 이종이량체의 생성이 기재되어 있다.

[0012] WO2011028952에는 특히, 젠코르(Xencor)의 XmAb 이중특이적 Fc 도메인 기술을 이용하여 CD3xCD20 이중특이적 분자를 생성시키는 것이 기재되어 있다.

[0013] WO2014047231에는 레제네론 파르마슈티칼즈(Regeneron Pharmaceuticals)로부터의 FcΔAdp 기술을 이용하여 생성된 REGN1979 및 다른 CD3xCD20 이중특이적 항체가 기재되어 있다.

[0014] 문헌 [Sun et al. (2015, Science Translational Medicine 7, 287ra70)]에는 "놉-인투-홀(knobs-into-holes)" 기술을 이용하여 구축된 B 세포-표적화 항-CD20/CD3 T 세포-의존성 이중특이적 항체가 기재되어 있다.

[0015] CD3과 CD20 둘 다와 결합하는 이중특이적 항체는, CD20을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 치료적 환경에 유용할 수 있고, 추가의 효율적인 CD3xCD20 이중특이적 항체에 대한 필요성은 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0016] 본 발명의 목적은 CD3 항체로부터 유래된 제1 항원 결합성 영역 및 CD20 항체로부터 유래된 제2 항원 결합성 영역을 포함하는, 신규 효율적 이중특이적 항체를 제공하는 것이다.

[0017] 이러한 신규 CD3xCD20 이중특이적 항체는, CD20을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 치료적 환경에 유용하다. 신규 CD3xCD20 이중특이적 항체는 CD20 카피 수가 적은 세포를 포함한, CD20 발현성 세포를 사멸시키는 데 상당히 효율적이고, 동물 모델에서 종양 세포를 근절시키는 데 상당한 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. 신규 CD3xCD20 이중특이적 항체는 낮은 용량에서도 세포의 신속하고도 강력한 사멸을 유도시키기 때문에 유리하다. 신규 CD3xCD20 이중특이적 항체는 더욱이, $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포 둘 다에 의해 세포독성을 유도시킬 수 있는데, 이로써 CD20 양성 종양, 및 CD20 양성 세포와 관련된 다른 질환을 사멸시키기 위해 T 세포가 개입하는 데 적합하게 된다. 또한, CD3xCD20 이중특이적 항체는 림프계 구조로부터 B 세포를 고갈시키는 데 효율적이다. 따라서, 본 발명의 목적은 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포 둘 다에 의해 세포독성을 유도시킬 수 있는 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가 목적은 CD20 발현성 세포, 예컨대 CD20 발현성 종양 세포를 사멸시키는 데 고도로 효율적인 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가 목적은 CD20 발현성 암을 사멸시키는 데 고도로 효율적인 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 다음에 추가로 상세히 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1: 다우디(Daudi) 세포 (a-f) 및 저캇(Jurkat) 세포 (g-i)에 대한 이중특이적 CD3xCD20 항체의 결합성.** (a) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 및 IgG1-7D8의 결합성, (b) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR 및 IgG1-2F2의 결합성, (c) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR 및 IgG1-RTX의 결합성, (d) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 IgG1-11B8의 결합성, (e) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR 및 IgG1-GA101의 결합성, (f) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR (및 IgG1-7D8)의 결합성. 제시된 데이터는 유동 세포계수법에 의해 결정된 바와 같은, 2가지 대표적 실험에 대한 (한 실험으로부터는 a-e가 수득되고, 다른 실험으로부터는 f가 수득된다), 다우디 세포에 대한 결합성의 형광 강도의 기하 평균 (geomean) (a-e) 및 중앙 형광 강도 (f)이다. (g) 다우디 세포에 대한 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR (huCLB-T3/4x7D8), bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR (huCLB-T3/4x2F2), bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-GA101-FEAR (huCLB-T3/4xGA101), bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR (huCLB-T3/4x11B8) 및 단일특이적 2가 IgG1-7D8-FEAR의 결합성, (h) 저캇 세포에 대한 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-

FEALxCD20-11B8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR 및 단일특이적, 2가 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL의 결합성, (i) 저캇 세포에 대한 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-GA101-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-RTX-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2C6-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxb12-FEAR 및 단일특이적, 2가 IgG1-huCLB-T3/4-FEAL의 결합성. 제시된 데이터는 유동 세포계수법에 의해 결정된 바와 같은, 1가지 대표적 실험의 중앙 형광 강도이다.

도 2: T 세포 및 B 세포에 대한 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (CD3xCD20)의 농도-의존성 동시 결합성. 혈액 중 B 및 T 세포에 대한 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (CD3xCD20)의 동시 결합성은 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 제시된 데이터는 1가지 대표적 실험으로부터의 것이다. 제시된 데이터는 CD4/CD19 또는 CD8/CD19 유동 세포계수법 도트-플롯의 오른쪽 상단 사분면의 사건 수에 의해 결정된 바와 같이, 이중-양성 (CD19 및 CD4 [A] 또는 CD19 및 CD8 [B]) 사건의 수이다. 닫힌 부호와 열린 부호는 상이한 건강한 공여자로부터의 데이터를 표시한다. IgG1-2F2 (2F2, CD20-특이적) 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (CD3xb12, CD3-특이적)이 음성 대조군 항체로서 포함되었다.

도 3: 인간 B-세포 림프종 및 B 세포 백혈병 세포주에서 CD3xCD20 이중특이적 항체에 의한 시험관내 세포독성의 유도. (a) 다우디 세포를 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (CD3x7D8), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR (CD3x11B8), 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8 (7D8), IgG1-7D8-FEAR (7D8-FEAR; 불활성 Fc 영역을 수반함), IgG1-11B8-F405L 또는 IgG1-11B8-FEAR (11B8-FEAR; 불활성 Fc 영역을 수반함), 및 이중특이적 대조군 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (CD3xb12)과 함께 인큐베이션하고, PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였다. (b) 다우디 세포를 BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (CD3x7D8), 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8-FEAR (7D8-FEAR; 불활성 Fc 영역을 수반함) 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (CD3xb12)과 함께 인큐베이션하고, 정제된 T 세포를 이펙터 세포로서 사용하였다. (c-f) 다우디 세포를 2개의 상이한 CD3 아암 (arm) (각각 열린 부호 및 닫힌 부호로써 나타낸 huCD3-H1L1-FEAL 및 huCLB-T3/4-FEAL Fab 아암) 및 4개의 상이한 CD20 아암: 7D8 (BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 및 BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR; [c]), 11B8 (BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR; [d]), GA101 (BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR 및 BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-GA101-FEAR; [e]) 및 2F2 (BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR 및 BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR; [f])에 근거한 CD3xCD20 이중특이적 항체와 함께 인큐베이션하였다. (g-m) 상이한 B-세포주를 표적 세포로서 사용하고, 이를 표시된 바와 같은 항체와 함께 인큐베이션하였다. CD3xCD20 이중특이적 항체는 표시된 바와 같은 huCD3-H1L1-FEAL Fab 아암 및 상이한 CD20 Fab 아암 (7D8, 11B8, 2F2, GA101 또는 RTX)을 함유하였다. CD3 항체 단독은 IgG1-huCD3-H1L1이었다. 정제된 T 세포를 이펙터 세포로서 사용하였다. (n) 다우디 세포를 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (CD3x7D8), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR (CD3x2C6) 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (CD3xb12)과 함께 인큐베이션하고, 정제된 T 세포를 이펙터 세포로서 사용하였다. 제시된 데이터는 삼중 웰의 평균 % 특이적 용해 ± S.D이고, 각각의 그래프에 대한 데이터는 1가지 대표적 실험으로부터 수득되었다.

도 4: 이펙터 세포로서 정제된 전체 T 세포 ($CD3^+$), $CD4^+$ T 세포 ($CD3^+CD8^-$) 및 $CD8^+$ T 세포 ($CD3^+CD8^+$)를 사용하는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR에 의한 시험관내 세포독성의 용량-의존성 유도. 다우디 세포를 표시된 바와 같은 상이한 T-세포 서브세트, 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 희석 시리즈 또는 대조군 항체 IgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR 및 IgG1-7D8-FEAR (데이터는 제시되지 않음)과 함께 인큐베이션하였다. 제시된 데이터는 삼중 웰의 종양 세포 용해의 평균 % ± S.E.M.이다 (A, B).

도 5: 다우디 세포에서 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR-의존성 세포독성의 동역학. 다우디 세포를 2개의 상이한 공여자 (A 및 B)로부터 단리된 정제된 T 세포의 존재하에 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR과 함께 인큐베이션하였다. 세포독성을 인큐베이션 후 4, 12, 24, 48 및 72시간 (A) 또는 인큐베이션 후 3, 16 및 24시간 (B)에 평가하였다. 제시된 데이터는 상이한 인큐베이션 시간 동안 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR과 함께 인큐베이션된 세포의 삼중 웰의 세포 사멸 % ± S.D.이다. A 및 B에 제시된 데이터는 2개의 상이한 공여자로부터 단리된 정제된 T 세포를 사용하여, 2가지 독립적 실험으로부터의 것이다.

도 6: 상이한 이펙터 대 표적 비에서 CD3xCD20 이중특이적 항체에 의한 시험관내 세포독성의 유효 효능. 세포독성 검정은 상이한 CD3xCD20 이중특이적 항체 및 상이한 E/T 비를 사용하여 수행하였다. CD3xCD20 이중특이적 항체는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (a), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR (b), bsIgG1-

huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR (c), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR (d) 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR (e)을 포함하였다. 음성 대조군으로서, bsIG1-huCLB-T3/4-FEALxb12-FEAR이 10:1의 E/T 비하에 포함되었다. 제시된 데이터는 1가지 대표적 실험에 대한 세포독성 검정에서 결정된 바와 같이 삼중 웰의 평균 % 용해 ± S.D.이다. 각각의 라인은 상이한 E/T 비 (표시된 바와 같음)를 나타낸다.

도 7: NOD-SCID 마우스에서 라지(Raji)-luc 공동-생착 모델 내에서 CD3xCD20 이중특이적 항체의 세포독성 활성. (a) 표시된 용량하에 비히클 (PBS) 또는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리시킨 마우스 내에서의 평균 종양 크기. 오차 막대는 S.E.M.을 표시한다. (b) 종양 접종 후 제21일에 PBS 또는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리시킨 후 개개의 마우스 내에서의 종양 크기. 제21일에 데이터의 통계적 분석은 크러스칼 왈리스(Kruskal Wallis) [사후 시험으로서 던(Dunn)의 다중 비교]를 이용하여 수행하였다. **p<0.01. (c) 600 mm^3에서 설정된 종양 크기 컷-오프를 수반한 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR-처리된 군과 PBS-처리된 대조군 간의 생존 상의 차이의 통계적 유의성은 만텔 콕스(Mantel Cox) 분석에 의해 평가하였다. *p<0.05, **p<0.01, n.s. 유의적이지 않음. (d) 표시된 용량하에 비히클 (PBS) 또는 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리시킨 마우스 내에서의 평균 종양 크기. 오차 막대는 S.E.M.을 표시한다. (e) 종양 접종 후 제25일에 상이한 처리군에서 개개의 마우스 내에서의 종양 크기. 통계적 분석은 크러스칼 왈리스 시험 (사후 시험으로서 던의 다중 비교)를 이용하여 수행하였다. (f) 500 mm^3에서 설정된 종양 크기 컷-오프를 수반한 카플란-마이어 플롯. 처리군과 비히클 대조군 간의 차이의 통계적 유의성은 만텔 콕스 분석에 의해 분석하였다. *p<0.05, **p<0.01, n.s. 유의적이지 않음. (g) 표시된 용량하에 비히클 (PBS), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 또는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR로 처리시킨 마우스 내에서의 평균 종양 크기. 오차 막대는 S.E.M.을 표시한다. (h) 종양 접종 후 제20일에 PBS, 또는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 또는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR로 처리시킨 후 개개의 마우스 내에서의 종양 크기. 제20일에 데이터의 통계적 분석은 일방향 ANOVA [사후 시험으로서 터키(Tukey)의 다중 비교]를 이용하여 수행하였다. *p<0.05, **p<0.01. (i) 500 mm^3에서 설정된 종양 크기 컷-오프를 수반한 카플란-마이어 플롯. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR-처리된 군과 PBS-처리된 대조군 간의 생존 상의 차이의 통계적 유의성은 만텔 콕스 분석에 의해 평가하였다. *p<0.05, **p<0.01, n.s. 유의적이지 않음.

도 8: HIS 마우스에서 다우디-luc 이종이식편 모델 내에서의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 항-종양 활성. (a) 표시된 용량 수준하에 PBS (비히클 대조군), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (mAb2) 또는 대조군 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (mAb1)로 처리된 후 BRGS-HIS 마우스에서 다우디-luc 이종이식편 모델 내에서의 평균 종양 크기. 종양 조직량을 생물발광 영상화에 의해 평가하였다. 오차 막대는 S.E.M.을 표시한다. (b) 제21일에 통계적 분석을 수행하였다 (크러스칼 왈리스 시험 후, 던의 다중 비교 사후 시험) ** p< 0.01. (c) 제9일에 유동 세포계수법에 의해 결정된 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 또는 대조군 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR로 처리한 후 다우디-luc 이종이식편-보유 BRGS-HIS 마우스에서 말초 혈액 백혈구 집단의 특징 규명. % $hCD45^+$ 세포는 마우스 말초 혈액 중 인간 백혈구의 총 비율 (%)을 나타낸다. % $hCD19^+$, % $hCD3^+$ 및 % $hCD3^+FSC^{hi}$는 인간 백혈구 집단 내에서의 B 세포, T 세포 및 활성화된 T 세포 각각의 비율 (%)을 나타낸다.

도 9: 시노몰구스 원숭이에서 단일 용량의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 효과 연구. 상이한 용량의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.01, 0.1, 1 또는 10 mg/kg)로 처리된 시노몰구스 원숭이의 말초 혈액 중에서 시간 경과에 따른 B-세포 계수치 ($CD19^+CD21^+$ 세포) (a) 및 T-세포 계수치 ($CD4^+$ 플러스 $CD8^+$ 세포) (b). 제-18일 및 제-11일은 투여 전 B- 및 T-세포 계수치를 나타낸다. 상이한 용량의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.01, 0.1, 1 또는 10 mg/kg)로 처리된 시노몰구스 원숭이로부터의 림프절 샘플 중에서 시간 경과에 따른 전체 림프구 집단의 비율 (%)로서의 B 세포 (c) 및 T 세포 (d). 상이한 용량의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.01, 0.1, 1 또는 10 mg/kg)로 처리된 시노몰구스 원숭이에서 IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ 및 TNF-α의 혈장 수준 (e). 투여 전 및 70일까지 투여한 후의 각종 시점에서 혈액 샘플 중에서 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 약동학적 프로파일 (f). 점선은 2-구획 모델을 이용하여, IgG1의 예측된 약동학적 프로파일을 나타내는데, 0.006 h^{-1}, Vc (혈장 용적) 40 mL · kg^{-1} 및 체중 3.5 kg에서의 k_{10} (클리어런스 상수)를 수반한다.

도 10: HEK293F 세포에서 발현된 야생형 CD20 및 CD20-AxP에 대한 이중특이적 CD3xCD20 항체의 결합성.

HEK293F 세포에서 발현된 야생형 CD20 (A) 및 CD20 돌연변이체 (CD20-AxP) (B)에 대한 CD3xCD20 이중특이적 항체 (bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR [huCD3x7D8], bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR [huCLB-T3/4x7D8], bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR [huCD3x2F2], bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR [huCLB-T3/4x2F2], bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR [huCD3x11B8], bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR [huCLB-T3/4x11B8], bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR [huCD3xGA101], bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR [huCD3xRTX], bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR [huCD3x2C6])의 결합성은 유동 세포계수법에 의해 측정되었다. 제시된 데이터는 1가지 대표적 실험의 평균 형광 강도이다.

도 11: PBMC와 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 인큐베이션시 T 세포 활성화.

건강한 공여자 PBMC를 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 또는 양성 및 음성 대조군 항체와 함께 인큐베이션하고, T 세포 활성화를, T 세포 집단 ($CD28^+$ 세포) 내에서의 CD69 발현을 측정함으로써 평가하였다. 5개의 건강한 공여자로부터 단리된 PBMC를 이용하여 실험을 수행하였다. 2개의 대표적 공여자에 대한 결과가 제시된다.

<표 1>

SEQ ID NO:	클론 명칭	서열
SEQ ID NO:1	huCD3 VH CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	huCD3 VH CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	huCD3 VH CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:4	huCD3 VL CDR1	TGAVTTSNY
	huCD3 VL CDR2	GTN
SEQ ID NO:5	huCD3 VL CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:6	huCD3 VH1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:7	huCD3 VH2	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:8	huCD3 VH3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:9	huCD3 VH4	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTM VTVSS

SEQ ID NO:10	huCD3 VL1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:11	huCD3 VL2	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:12	huCD3 VL3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:13	성숙한 인간 CD3ε (엡실론)	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHN DKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPN PDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:14	인간 CD3δ (델타)	FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA GIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
SEQ ID NO:15	IgG1m(f) 중쇄 불변 영역 (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:16	IgG1m(f)-LFLEDA 중쇄 불변 영역 (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO:17	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQA PGKGLEWVATISRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRPLYGSSPDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:18	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQ APRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCFQGSGYPLTFGSGTKLEMR
SEQ ID NO:19	성숙한 시노 CD3ε (엡실론)	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQH NGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASH HLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWS KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIR KGQQDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:20	성숙한 레서스 CD3ε (엡실론)	QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCSQHLGSEVQWQH NGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASH HLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWS KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIR KGQQDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:21	IgG1m(f)-F405L (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L** LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO:22	IgG1m(f)-K409R (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO:23	IgG1m(f)-LFLEDA-F405L (FEAL) (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L** LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO:24	IgG1m(f)-LFLEDA-K409R (FEAR) (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:25	SP34의 모 뮤린 VH	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSIL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSA
SEQ ID NO:26	SP34의 모 뮤린 VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK PDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE DEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:27	VH CD20 - 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:28	VL CD20 - 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO:29	인간 IgLC2/IgLC3 불변 도메인	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:30	VL huCD3-LKNH	QAVVTQEPS**L**SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ **K**PGQAFRGLIGGTN**N**RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ ADDESIYFCALWYSN**H**WVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:31	VL huCD3-T41K	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ **K**PGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQ ADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:32	VH CD20 - 7D8 CDR1	GFTFHDYA
SEQ ID NO:33	VH CD20 - 7D8 CDR2	ISWNSGTI
SEQ ID NO:34	VH CD20 - 7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYGMDV
SEQ ID NO:35	VL CD20 - 7D8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20 - 7D8 CDR2	DAS
SEQ ID NO:36	VL CD20 - 7D8 CDR3	QQRSNWPIT
SEQ ID NO:37	VH CD20 - 2F2	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVS S
SEQ ID NO:28	VL CD20 - 2F2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO:38	VH CD20 - 2F2 CDR1	GFTFNDYA
SEQ ID NO:39	VH CD20 - 2F2 CDR2	ISWNSGSI
SEQ ID NO:34	VH CD20 - 2F2 CDR3	AKDIQYGNYYYGMDV
SEQ ID NO:35	VL CD20 - 2F2 CDR1	QSVSSY
	VL CD20 - 2F2 CDR2	DAS

SEQ ID NO:36	VL CD20 - 2F2 CDR3	QQRSNWPIT
SEQ ID NO:40	VH CD20 - 11B8	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQA PGKGLEWVSIIGTGGVTYYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQ MNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGMDVWGQGTT VTVSS
SEQ ID NO:41	VL CD20 - 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSDWPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO:42	VH CD20 - 11B8 CDR1	GFTFSYHA
SEQ ID NO:43	VH CD20 - 11B8 CDR2	IGTGGVT
SEQ ID NO:44	VH CD20 - 11B8 CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGMDV
SEQ ID NO:45	VL CD20 - 11B8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20 - 11B8 CDR2	DAS
SEQ ID NO:46	VL CD20 - 11B8 CDR3	QQRSDWPLT
SEQ ID NO:47	VH CD20 - 2C6	AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTALYYCTKDNQYGSGSTYGLGVWGQGTLVT VSS
SEQ ID NO:48	VL CD20 - 2C6	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO:49	VH CD20 - 2C6 CDR1	GFTFGDYT
SEQ ID NO:50	VH CD20 - 2C6 CDR2	ISWNSGSI
SEQ ID NO:51	VH CD20 - 2C6 CDR3	TKDNQYGSGSTYGLGV
SEQ ID NO:52	VL CD20 - 2C6 CDR1	QSVSSY

	VL CD20 - 2C6 CDR2	DAS
SEQ ID NO:53	VL CD20 - 2C6 CDR3	QQRSNWPLT
SEQ ID NO:54	VL huCD3-CDR3 L97H	ALWYSN**H**WV
SEQ ID NO:55	huCLB-T3/4 VH CDR1	GFTFSSYG
SEQ ID NO:56	huCLB-T3/4 VH CDR2	ISRYSRYI
SEQ ID NO:57	huCLB-T3/4 VH CDR3	ARRPLYGSSPDY
SEQ ID NO:58	huCLB-T3/4 VL CDR1	SSVTY
	huCLB-T3/4 VL CDR2	DTS
SEQ ID NO:59	huCLB-T3/4 VL CDR3	FQGSGYPLT
SEQ ID NO:60	IgG1m(a) CH3 영역	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:61	IgG1m(f) CH3 영역	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:62	IgG1m(ax) CH3 영역	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:63	IgG1 중쇄 불변 영역- WT (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:64	IgG1 중쇄 불변 영역- F405L (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:65	IgG1 중쇄 불변 영역- K409R (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:66	IgG1 중쇄 불변 영역- N297Q (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO:67	IgG1 중쇄 불변 영역- LFLEDANQPS (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:68	IgG1 중쇄 불변 영역- F405L N297Q (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:69	IgG1 중쇄 불변 영역- K409R N297Q (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO:70	IgG1 중쇄 불변 영역- F405L LFLEDANQPS (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:71	IgG1 중쇄 불변 영역- K409R LFLEDANQPS (EU 넘버링에 따르는 아미노산 위치 118-447)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:72	huCD3 VH CDR1 친화 변이체	GFTFX$_1$T YA, 여기서 X$_1$은 V, H, F, T, P, L, Q, D, K, W, S, G, A, C 및 R로부터 선택된다
SEQ ID NO:73	huCD3 VH CDR1 친화 변이체	GFTFNX$_2$YA, 여기서 X$_2$는 S, N, G, A, K, V, R, H, Q, P, I, F, M, Y, L, W, D, E 및 C로부터 선택된다
SEQ ID NO:74	huCD3 VH CDR1 친화 변이체	GFTFNTX$_3$A, 여기서 X$_3$은 F, H, N, M, W, G, Q, V, T, S, L, P, I, A, K, R 및 C로부터 선택된다
SEQ ID NO:75	huCD3 VH CDR2 친화 변이체	IRSKYNX$_4$YAT, 여기서 X$_4$는 S, Y, Q, W, L, A, I, M, D, T, K, R, G, F, E, V, C 및 P로부터 선택된다
SEQ ID NO:76	huCD3 VH CDR2 친화 변이체	IRSKYNNYX$_5$T, 여기서 X$_5$는 N, L, Y, W, H, M, G, F, K, S, V, R, Q, D, C, E, P 및 T로부터 선택된다

SEQ ID NO:77	huCD3 VH CDR3 친화 변이체	VRX$_6$GNFGNSYVSWFAY, 여기서 X$_6$은 A, S, V, N, K, L, T, I, P, Q, C, G, Y, W, F, 및 R로부터 선택된다
SEQ ID NO:78	huCD3 VH CDR3 친화 변이체	VRHGNFX$_7$NSYVSWFAY, 여기서 X$_7$은 P, Q, A, Y, H, I, N, V, E, L, F, W, M, R, C, S 및 T로부터 선택된다
SEQ ID NO:79	huCD3 VH CDR3 친화 변이체	VRHGNFGNSYVX$_8$WFAY, 여기서 X$_8$은 A, T, G, L, N, C, P, F, Q, H, R, K, E, W, 및 Y로부터 선택된다
SEQ ID NO:80	huCD3 VH CDR3 친화 변이체	VRHGNFGNSYVSWFAX$_9$, 여기서 X$_9$는 H, S, F, N, W, T, C, A, I, L, Q, V, E, M, K, R, G 및 P로부터 선택된다
SEQ ID NO:81	huCD3 VL CDR1 친화 변이체	TGAVTX$_{10}$SNY, 여기서 X$_{10}$은 S, A, G, R, V, F, I, E, M, H, N, Y, P, Q, D, K 및 L로부터 선택된다
SEQ ID NO:82	huCD3 VL CDR3 친화 변이체	AX$_{11}$WYSNLWV, 여기서 X$_{11}$은 C, F, Y, I, T, V, M, A, S, N, G, W, E, K, P, R 및 D로부터 선택된다
SEQ ID NO:83	huCD3 VL CDR3 친화 변이체	ALWYSNX$_{12}$WV, 여기서 X$_{12}$는 D, K, Q, R, G, V, E, T, N, Y, S, P, W, F 및 M으로부터 선택된다

CDR 영역은 IMGT 정의에 따라서 주석을 달았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] *정의*

[0021] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 CD3" 또는 "CD3"은 T-세포 공동-수용체 단백질 복합체의 일부이고 4개의 별개의 쇄로 구성되는 인간 분화 클러스터 3 단백질을 지칭한다. CD3은 또한, 다른 종에서 발견되므로, 용어 "CD3"이 본원에서 사용될 수 있고, 문맥상 모순되지 않는 한 인간 CD3으로 제한되지 않는다. 포유류에서, 상기 복합체는 CD3γ (감마) 쇄 [인간 CD3γ 쇄 유니프로트(UniProt)KB/스위스-프로트(Swiss-Prot) 번호 P09693, 또는 시노몰구스 원숭이 CD3γ 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 Q95LI7], CD3δ (델타) 쇄 (인간 CD3δ 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 P04234, 또는 시노몰구스 원숭이 CD3δ 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 Q95LI8), 2개의 CD3ε (엡실론) 쇄 (인간 CD3ε 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 P07766; 시노몰구스 CD3ε 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 Q95LI5; 또는 레서스 CD3ε 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 G7NCB9), 및 CD3ζ-쇄 (제타) 쇄 (인간 CD3ζ 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 P20963, 시노몰구스 원숭이 CD3ζ 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 Q09TK0)를 함유한다. 이들 쇄는 T-세포 수용체 (TCR)로서 공지된 분자와 회합되고, T 림프구에서 활성화 시그널을 생성한다. TCR과 CD3 분자는 함께, TCR 복합체를 포함한다.

[0022] 용어 "인간 CD20" 또는 "CD20"은 인간 CD20 (유니프로트KB/스위스-프로트 번호 P11836)을 지칭하고, 종양 세포를 포함한 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 또는 CD20 유전자 또는 cDNA로 형질감염된 세포 상에서 발현되는 CD20의 임의의 변이체, 이소형 및 종 상동체를 포함한다. 종 상동체는 레서스 원숭이 CD20 [마카카 물라타 (macaca mulatta); 유니프로트KB/스위스-프로트 번호 H9YXP1]을 포함한다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "키메라 항체"는 가변 영역이 비-인간 종으로부터 유래되고 (예를 들어, 설치류로부터 유래됨), 불변 영역이 상이한 종, 예컨대 인간으로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 키메라 항체는 항체 공학에 의해 생성될 수 있다. "항체 공학"은 상이한 종류의 항체 변형에 대해 일반적으로 사용되는 용어로서, 통상의 기술자에게 널리 공지된 과정이다. 특히, 키메라 항체는 문헌 [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15]에 기재된 바와 같은 표준 DNA 기술을 이용함으로써 생성될 수 있다. 따라서, 키메라 항체는 유전적으로 또는 효소적으로 조작된 재조합 항체일 수 있다. 키메라 항체를 생성시키는 것은 통상의 기술자의 지식 내에 있으므로, 본 발명에 따르

는 키메라 항체의 생성은 본원에 기재된 것 이외의 방법에 의해 수행될 수 있다. 치료적 적용을 위한 키메라 모노클로날 항체가 항체 면역원성을 저하시키기 위해 개발된다. 이들은 전형적으로, 관심 항원에 대해 특이적인 비-인간 (예를 들어 뮤린) 가변 영역, 및 인간 불변 항체 중쇄 및 경쇄 도메인을 함유할 수 있다. 키메라 항체의 맥락에서 사용된 바와 같은 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 둘 다의 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하는 영역을 지칭한다.

[0024] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간화 항체"는 인간 가변 도메인에 대한 고 수준의 서열 상동성을 함유하도록 변형된 비-인간 가변 도메인 및 인간 항체 불변 도메인을 함유하는, 유전적으로 조작된 비-인간 항체를 지칭한다. 이는, 함께 항원 결합 부위를 형성하는 6개의 비-인간 항체 상보성 결정 영역 (CDR)을 상동 인간 수용체 프레임워크 영역 (FR) 상으로 이식함으로써 달성될 수 있다 (WO92/22653 및 EP0629240 참조). 모 항체의 결합 친화성과 특이성을 완전히 재구성하기 위해서는, 모 항체 (즉, 비-인간 항체)로부터의 프레임워크 잔기를 인간 프레임워크 영역으로 치환시키는 것 (복귀-돌연변이)이 요구될 수 있다. 구조적 상동성 모델링은 항체의 결합 특성에 중요한 프레임워크 영역 내의 아미노산 잔기를 확인하는 데 도움을 줄 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열, 주로 비-인간 아미노산 서열로의 하나 이상의 아미노산 복귀-돌연변이를 임의로 포함하는 인간 프레임워크 영역, 및 완전한 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 임의로, 반드시 복귀-돌연변이는 아닌 부가의 아미노산 변형을 적용하여, 바람직한 특징, 예컨대 친화성 및 생화학적 특성을 수반한 인간화 항체를 수득할 수 있다.

[0025] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유류 종, 예컨대 마우스의 생식세포 계열로부터 유래된 CDR 서열을 인간 프레임워크 서열 상으로 이식시킨 항체를 포함하지는 않는다. 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)]의 표준 체세포 혼성화 기술을 포함한 각종 기술에 의해 생성될 수 있다. 체세포 혼성화 과정이 바람직하긴 하지만, 원칙적으로 모노클로날 항체를 생성하기 위한 다른 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스 또는 발암성 형질전환, 또는 인간 항체 유전자의 라이브러리를 이용하는 파지(phage) 디스플레이 기술을 이용할 수 있다.

[0026] 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는 데 적합한 동물 시스템은 뮤린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 널리 정립된 과정이다. 융합을 위해 면역된 비장세포를 단리하기 위한 면역화 프로토콜 및 기술이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예를 들어, 뮤린 골수종 세포) 및 융합 과정이 또한 공지되어 있다.

[0027] 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템이 아니라 인간 면역 체계의 일부를 수반하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모솜(transchromosomal) 마우스를 이용하여 생성될 수 있다.

[0028] 용어 "면역글로불린"은 2개 쌍의 폴리펩티드 쇄로 이루어진 구조적으로 관련된 당단백질의 부류를 지칭하는데, 이중 한 쌍은 저 분자량 경쇄 (L)이고 나머지 한 쌍은 중쇄 (H)이며, 4개 모두는 디술피드 결합에 의해 상호 연결된다. 면역글로불린의 구조는 명확히 잘 규명되었다 (예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))] 참조). 간략하게 언급하면, 각각의 중쇄는 전형적으로, 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 또는 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역 (본원에서 C_H 또는 CH로서 약칭됨)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로, 3개의 도메인, 즉 C_H1, C_H2, 및 C_H3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 전형적으로, 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 또는 VL로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 C_L 또는 CL로서 약칭됨)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 전형적으로, 하나의 도메인, 즉 C_L로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭된, 보다 보존된 영역이 산재된 상보성 결정 영역 (CDR)으로 또한 지칭된 초가변성 영역 (또는 구조적으로 정의된 루프의 형태 및/또는 서열에 있어서 초가변적일 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 전형적으로, 아미노 말단에서부터 카르복시 말단까지 다음 순서로 배열된, 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] 참조). 문맥상 달리 언급되거나 또는 모순되지 않는 한, 본원에서의 CDR 서열은 IMGT 규칙에 따라서 확인된다 ([Brochet X., Nucl Acids Res. 2008; 36:W503-508] 및 [Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27:209-212]; 또한 인터넷 http address http://www.imgt.org/ 참조).

[0029] 문맥상 달리 언급되거나 또는 모순되지 않는 한, 본 발명의 불변 영역 내의 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따른다 (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

[0030] 본 발명의 맥락에서 용어 "항체" (Ab)는 전형적인 생리학적 조건하에 상당한 기간의 반감기, 예컨대 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 이상, 약 48시간 이상, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과, 또는 임의의 다른 관련된 기능상 규정된 기간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합성과 연관된 생리학적 반응을 유도, 증진, 증강 및/또는 조정하는 데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는 데 충분한 시간)으로 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 갖는, 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 단편, 또는 그의 하나의 유도체를 지칭한다. 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합성 도메인을 함유한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역 체계의 각종 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체 시스템의 성분, 예컨대 보체 활성화의 고전적 경로에서의 제1 성분인 C1q를 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 상기 표시된 바와 같이, 본원에서의 용어 항체는 문맥상 달리 언급되거나 또는 명백하게 모순되지 않는 한, 항원 결합성 단편, 즉 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원 결합성 기능은 완전한 길이의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 용어 "항체" 내에 포괄된 항원 결합성 단편의 예는 (i) V_L, V_H, C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab' 또는 Fab 단편, 또는 WO2007059782 [젠맙(Genmab)]에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) 힌지(hinge) 영역에서 디술피드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_H1 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 본질적으로 이루어지고 또한 도메인 항체 (문헌 [Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90])로 지칭되는 dAb 단편 (문헌 [Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)]); (vi) 카멜리드(camelid) 또는 나노보디 (문헌 [Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24]); 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 도메인 V_L 및 V_H가 별도의 유전자에 의해 코딩되긴 하지만, 이들은 재조합 방법을 이용하여, V_L 영역과 V_H 영역이 쌍을 이루어 단일 쇄 항체 또는 단일 쇄 Fv (scFv)로서 공지된 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 만들 수 있게 해주는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)] 및 [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조). 이러한 단일 쇄 항체는 문맥상 달리 언급되거나 또는 명백히 표시되지 않는 한, 상기 용어 항체 내에 포괄된다. 이러한 단편이 일반적으로, 항체의 의미 내에 포함되긴 하지만, 이들 단편은 집합적으로 및 각각 독립적으로, 상이한 생물학적 특성과 유용성을 나타내는 본 발명의 독특한 특색이다. 본 발명의 맥락에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편뿐만 아니라 이러한 단편의 이중특이적 포맷은 본원에 추가로 논의된다. 용어 항체는 달리 명시되지 않는 한 또한, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 공지된 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 기술에 의해 제공된, 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있는 항체 단편 (항원 결합성 단편)을 포함한다는 것을 또한 이해해야 한다. 이로써 생성된 바와 같은 항체는 임의의 이소형을 보유할 수 있다.

[0031] 본 발명의 맥락에서 용어 "이중특이적 항체"는 상이한 항체 서열에 의해 규정된 2개의 상이한 항원 결합성 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0032] 본원에 사용된 경우, 문맥상 모순되지 않는 한, 용어 "Fab-아암" 또는 "아암"은 하나의 중쇄-경쇄 쌍을 지칭하고, 본원에서 "절반 분자"와 상호 교환적으로 사용된다.

[0033] 본원에 사용된 경우, 문맥상 모순되지 않는 한, 용어 "Fc 영역"은 적어도 힌지 영역, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 항체 영역을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 면역글로불린 부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM)를 지칭한다.

[0035] 용어 "1가 항체"는 본 발명의 맥락에서, 항체 분자가 항원의 단일 분자와 결합할 수 있으므로, 항원 가교 결합할 수 없다는 것을 의미한다.

[0036] "CD20 항체" 또는 "항-CD20 항체"는 항원 CD20과 특이적으로 결합하는, 상기 언급된 바와 같은 항체이다.

[0037] "CD3 항체" 또는 "항-CD3 항체"는 항원 CD3, 특히 인간 CD3ε (엡실론)과 특이적으로 결합하는, 상기 언급된 바

와 같은 항체이다.

[0038] "CD3xCD20 항체" 또는 "항-CD3xCD20 항체"는 2개의 상이한 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체인데, 상기 영역 중 하나는 항원 CD20과 특이적으로 결합하고 나머지 하나는 CD3과 특이적으로 결합한다.

[0039] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 단리된다. 본원에 사용된 바와 같은 "단리된 이중특이적 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 이중특이적 항체를 지칭하고자 한다 (예를 들어, CD20 및 CD3과 특이적으로 결합하는 단리된 이중특이적 항체는 CD20 또는 CD3과 특이적으로 결합하는 단일 특이적 항체가 실질적으로 없다).

[0040] 용어 "에피토프"는 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 의미한다. 에피토프는 통상적으로, 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 표면 집단으로 이루어지고, 통상적으로 특이적 3차원 구조적 특징뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖고 있다. 입체 형태적 에피토프와 비-입체 형태적 에피토프는 전자에 대한 결합이 변성 용매의 존재하에 상실되지만, 후자의 경우에는 그렇지 않다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접적으로 관여한 아미노산 잔기; 및 결합에 직접적으로 관여하지 않은 다른 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합성 펩티드에 의해 효과적으로 차단되거나 또는 커버되는 아미노산 잔기 (다시 말해서, 이러한 아미노산 잔기는 특이적 항원 결합성 펩티드가 차지하는 공간 내에 있다)를 포함할 수 있다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 단일 분자 조성의 항체 분자 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성은 특별한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 디스플레이한다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 디스플레이하는 항체를 지칭한다. 인간 모노클로날 항체는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모솜 비-인간 동물, 예컨대 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 불멸화 세포와 융합되어 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은, 미리 결정된 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합성의 맥락에서 용어 "결합성"은 리간드로서 항원을 사용하고 분석물로서 항체를 사용하여 비아코어(BIAcore) 3000 기기에서, 예를 들어 표면 플라스몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정된 경우에 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 이하의 K_D에 상응하는 친화도를 수반한 결합성이고; 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)과의 결합성에 대한 그의 친화도보다 적어도 10배 낮은, 예컨대 적어도 100배 낮은, 예를 들어 적어도 1,000배 낮은, 예컨대 적어도 10,000배 낮은, 예를 들어 적어도 100,000배 낮은 K_D에 상응하는 친화도로 상기 미리 결정된 항원과 결합한다. 친화도가 더 낮은 경우의 양은 항체의 K_D에 의존적이므로, 항체의 K_D가 매우 낮을 경우 (즉, 항체가 고도로 특이적이다), 그 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 경우의 양은 적어도 10,000배일 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "k_d" (sec^{-1})는 특별한 항체-항원 상호 작용의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 또한, k_{off} 값으로서 지칭되기도 한다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "K_D" (M)는 특별한 항체-항원 상호 작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0045] 본원에 사용된 경우의 용어 "제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 이종이량체성 상호 작용"은 제1-CH3/제2-CH3 이종이량체성 단백질 내에서의 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 상호 작용을 지칭한다.

[0046] 본원에 사용된 경우의 용어 "제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 동종이량체성 상호 작용"은 제1-CH3/제1-CH3 동종이량체성 단백질 내에서의 제1 CH3 영역과 또 다른 제1 CH3 영역 간의 상호 작용; 및 제2-CH3/제2-CH3 동종이량체성 단백질 내에서의 제2 CH3 영역과 또 다른 제2 CH3 영역 간의 상호 작용을 지칭한다.

[0047] 용어 "환원성 조건" 또는 "환원성 환경"은 특정 기질 (본원에서는 항체의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기)이, 산화되는 것보다 환원될 가능성이 더 큰 조건 또는 환경을 지칭한다.

[0048] 본 발명은 또한, 본 실시예의 이중특이적 항체의 V_L 영역, V_H 영역, 또는 하나 이상의 CDR의 기능적 변이체를 포함하는 이중특이적 항체를 제공한다. 이중특이적 항체의 맥락에서 사용된 V_L, V_H, 또는 CDR의 기능적 변이체는 여전히, 이중특이적 항체의 각각의 아암이 모 이중특이적 항체의 친화성 및/또는 특이성/선택성의 적어도 상당한 비율 (적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과)을 보유할 수 있도록 해주고, 일부 경우에 이

러한 이중특이적 항체는 모 이중특이적 항체보다 더 큰 친화성, 선택성 및/또는 특이성과 연관될 수 있다.

[0049] 이러한 기능적 변이체는 전형적으로, 모 이중특이적 항체와 상당한 서열 동일성을 보유한다. 두 서열 간의 % 동일성은 이들 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수인데 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 # / 위치의 총 # x 100), 이는 두 서열의 최적의 정렬을 위하여 도입시킬 필요가 있는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려한 것이다. 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 % 동일성은, 예를 들어 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입시킨, 문헌 [E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)]의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 % 동일성은 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)]의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다.

[0050] 예시적인 변이체는 주로 보존적 치환에 의해 모 이중특이적 항체 서열의 VH 및/또는 VL 및/또는 CDR 영역과 상이한 것을 포함하는데; 예를 들어, 변이체 내에서의 치환 중 10개, 예컨대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개가 보존적 아미노산 잔기 대체이다.

[0051] 본 발명의 맥락에서, 보존적 치환은 다음 표에 반영된 아미노산 부류 내에서의 치환으로써 정의될 수 있다:

[0052] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 부류

[0053]

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성의 전하를 띠지 않는 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족의 전하를 띠지 않는 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비-극성의 전하를 띠지 않는 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0054] 본 발명의 맥락에서 다음 표기법은 달리 표시되지 않는 한, 특정 돌연변이를 기재하기 위해 사용되는데; i) 소정의 위치에서의 아미노산의 치환은, 예를 들어 K409R로서 기재되는데, 이는 위치 409에서의 리신이 아르기닌으로 치환되는 것을 의미하고; ii) 특이적 변이체에 대해서는, 특이적 3 문자 또는 1 문자 코드가 사용되는데, 이는 임의의 아미노산 잔기를 표시하기 위한 코드 Xaa 및 X를 포함한다. 따라서, 위치 409에서의 리신을 아르기닌으로 치환시킨 것이 K409R로서 지명되고, 위치 409에서의 리신을 임의의 아미노산 잔기로 치환시킨 것이 K409X로서 지명된다. 위치 409에서의 리신의 결실의 경우에는, K409*로써 표시된다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 그 내부로 발현 벡터, 예를 들어 본 발명의 항체를 코딩하는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하고자 한다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어, 형질감염세포, 예컨대 CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 또는 NSO 세포, 및 림프구 세포를 포함한다.

[0056] 용어 "치료"는 증상 또는 질환 상태를 경감, 완화, 정지 또는 근절 (치유)시킬 목적으로 본 발명의 치료상 활성 이중특이적 항체의 유효량을 투여하는 것을 지칭한다.

[0057] 용어 "유효량" 또는 "치료상 유효량"은 목적하는 치료 결과를 달성하는 데 필요한 투여량 및 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 이중특이적 항체의 치료상 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 유발시킬 수 있는 이중특이적 항체의 능력과 같은 요인에 따라서 다양할 수 있다. 치료상 유효량은 또한, 항체 또는 항체 부분의 치료상 이로운 효과가 그의 어떠한 독성이나 해로운 효과도 능가하는 양이다.

[0058] 용어 "항-이디오타입 항체"는 일반적으로 항체의 항원 결합 부위와 연관된 독특한 결정기를 인식하는 항체를 지칭한다.

[0059] *본 발명의 추가 측면 및 실시양태*

[0060] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 2개의 상이한 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데,

상기 영역 중 하나는 CD3에 대한 결합 특이성을 가지며 다른 하나는 CD20에 대한 결합 특이성을 갖는다.

[0061] 따라서, 본 발명은

[0062] (i) 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하고;

[0063] a) 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3;

[0064] b) 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 54에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3;

[0065] c) 서열식별번호: 73, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 73의 X_2는 M 및 P로부터 선택된다);

[0066] d) 서열식별번호: 74, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 74의 X_3은 A이다);

[0067] e) 서열식별번호: 1, 75, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 75의 X_4는 E이다);

[0068] f) 서열식별번호: 1, 2, 및 77에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 77의 X_6은 F, G, I, K, L 및 N으로부터 선택된다);

[0069] g) 서열식별번호: 1, 2, 및 78에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 78의 X_7은 P이다);

[0070] h) 서열식별번호: 1, 2, 및 79에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 79의 X_8은 A 및 G로부터 선택된다);

[0071] i) 서열식별번호: 1, 2, 및 80에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 80의 X_8은 M, R 및 V로부터 선택된다); 또는

[0072] j) 서열식별번호: 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 58에 제시된 바와 같은 서열, 서열 DTS, 및 서열식별번호: 59에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3

[0073] 을 포함하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 제1 결합성 아암; 및

[0074] (ii) 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역을 포함하는 제2 결합성 아암

[0075] 을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0076] 이로써, CD3 엡실론에 대한 다양한 결합 친화도를 갖는 이중특이적 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, CD3에 대한 결합 친화도가 모 항-CD3 결합성 아암에 대한 것보다 더 낮은 것이 바람직하다. 실험적 데이터는 CD3 엡

실론에 대한 결합 친화도를 저하시키는 치환을 수반한 항-CD3 결합성 아암을 갖는, 상기 c) 내지 i)에 기재된 바와 같은 이중특이적 CD3xCD20 항체가 모 이중특이적 항-CD3xCD20 항체의 종양 사멸 효력을 유지하고 있다는 것을 나타내었다.

[0077] 한 실시양태에서, 본 발명은 (i) 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하고; (a) 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 54에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 또는 (b) 서열식별번호: 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 58에 제시된 바와 같은 서열, 서열 DTS, 및 서열식별번호: 59에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 제1 결합성 아암; 및 (ii) 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역을 포함하는 제2 결합성 아암을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0078] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 제1 결합성 아암을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 제1 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다.

[0079] 용어 "항원 결합성 영역을 포함하는 결합성 아암"은 항원 결합성 영역을 포함하는 항체 분자 또는 단편을 의미한다. 따라서, 결합성 아암은, 예를 들어 6개의 VH 및 VL CDR 영역, VH 및 VL 서열, Fab 단편 또는 절반-분자 항체 (즉, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄를 포함함)일 수 있다.

[0080] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합성 영역은 제1 중쇄 가변 서열 (VH), 및 제1 경쇄 가변 서열 (VL)을 포함하고, 제2 항원 결합성 영역은 제2 중쇄 가변 서열 (VH), 및 제2 경쇄 가변 서열 (VL)을 포함한다.

[0081] 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 제1 중쇄 가변 서열 (VH) 및 제1 중쇄 불변 서열 (CH)을 포함하는 제1 중쇄, 및 제1 경쇄 가변 서열 (VL) 및 제1 경쇄 불변 서열 (CL)을 포함하는 제1 경쇄를 포함하고; (ii) 제2 결합성 아암은 제2 중쇄 가변 서열 (VH) 및 제2 중쇄 불변 서열 (CH)을 포함하는 제2 중쇄, 및 제2 경쇄 가변 서열 (VL) 및 제2 경쇄 불변 서열 (CL)을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.

[0082] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 완전한 길이의 항체, 예컨대 완전한 길이의 IgG1 항체, 예를 들어 완전한 길이의 IgG1,λ (람다),κ (카파) 항체 또는 IgG1,κ (카파), κ (카파) 항체이다.

[0083] *제1 결합성 아암*

[0084] 제1 결합성 아암은 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는데, 여기서 이러한 제1 항원 결합성 영역은

[0085] a) 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3;

[0086] b) 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 54에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3;

[0087] c) 서열식별번호: 73, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 73의 X_2는 M 및 P로부터 선택된다);

[0088] d) 서열식별번호: 74, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 74의 X_3은 A이다);

[0089] e) 서열식별번호: 1, 75, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을

각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 75의 X_4는 E이다);

[0090] f) 서열식별번호: 1, 2, 및 77에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 77의 X_6은 F, G, I, K, L 및 N으로부터 선택된다);

[0091] g) 서열식별번호: 1, 2, 및 78에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 78의 X_7은 P이다);

[0092] h) 서열식별번호: 1, 2, 및 79에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 79의 X_8은 A 및 G로부터 선택된다);

[0093] i) 서열식별번호: 1, 2, 및 80에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 (여기서, 서열식별번호: 80의 X_8은 M, R 및 V로부터 선택된다); 또는

[0094] j) 서열식별번호: 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 58에 제시된 바와 같은 서열, 서열 DTS, 및 서열식별번호: 59에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3

[0095] 을 포함한다.

[0096] 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는데, 여기서 이러한 제1 항원 결합성 영역은 (a) 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 54에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 또는 (b) 서열식별번호: 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 58에 제시된 바와 같은 서열, 서열 DTS, 및 서열식별번호: 59에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다.

[0097] 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 인간 CD3ε (엡실론)과 결합하는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는데, 여기서 이러한 제1 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다.

[0098] 상기 (a)에 정의된 바와 같은 6개의 CDR 서열은 SP34로 표시된 마우스 항체로부터 유래된다. 이러한 항체의 인간화 버전이 생성되었고, 이러한 인간화 항체는 본원에 huCD3으로 표시되며, WO2015001085 (젠맙)에 추가로 개시된다.

[0099] 상기 (b)에 정의된 바와 같은 6개의 CDR 서열은 huCLB-T3/4로부터 유래된다. huCLB-T3/4는 뮤린 CD3 항체 CLB-T3/4의 인간화 버전이다 (Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9):749-63; 서열 개시내용을 포함한 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다). 간략하게 언급하면, 문헌 [Parren et al. (1991)]에 공개된 바와 같은 CLB-T3/4 뮤린 VH 및 VL 서열은 IMGT의 V-QUEST를 이용하여 인간 VH 및 VL 레퍼토리와 정렬시켰다. 밝혀진 가장 가까운 인간 생식세포 계열은 VH 유전자의 경우 IGHV3-21*01이고, VL 유전자의 경우 IGKV3-11*01(+IGKJ4*02)이었다. 상이한 뮤린 VH 및 VL 서열 내의 모든 아미노산 잔기는 CLB-T3/4의 CDR 영역 내의 것을 제외하고는 인간 등가물로 대체시켰다. VH 서열에 대해서는 관련된 J-영역이 발견되지 않았기 때문에, 공통의 WGQGTLVTVSS 서열이 중쇄의 FR4 영역에 사용되었다. 양 서열을 관련된 발현 벡터 내로 클로닝하고, HEK293F 세포에서 공동-형질감염시킴으로써 발현시켰다. huCLB-T3/4는 서열식별번호: 17에 제시된 서열을 포함하는 VH 영역 (VH huCLB-T3/4) 및 서열식별번호: 18에 제시된 서열을 포함하는 VL 영역 (VL huCLB-T3/4)을 갖는다. huCLB-T3/4는 서열식별번호: 55, 56 및 57에 각각 제시된 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 및 서열식별번

호: 58에 제시된 서열, 서열 DTS, 및 서열식별번호: 59에 제시된 서열을 각각 갖는 VL CDR1, CDR2, 및 CDR3을 갖는다.

[0100] 각종 인간화 huCD3 항체 및 huCLB-T3/4는 인간 CD3ε (엡실론)과 결합한다.

[0101] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 중쇄 가변 서열 (VH)을 포함하는데, 여기서 이러한 VH 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 서열에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:

[0102] a) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0103] b) 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0104] c) 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0105] d) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열; 및

[0106] e) 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 VH 서열.

[0107] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합성 영역의 VH 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0108] a) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0109] b) 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0110] c) 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0111] d) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열;

[0112] e) 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 VH 서열.

[0113] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 항원 결합성 영역의 제1 VL 서열을 포함하는데, 여기서 이러한 VL 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 서열에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:

[0114] a) 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0115] b) 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0116] c) 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열; 및

[0117] d) 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 VL 서열.

[0118] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합성 영역의 VL 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0119] a) 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0120] b) 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0121] c) 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열; 및

[0122] d) 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 VL 서열.

[0123] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 VH 및 VL 서열을 포함하는데, 여기서 제1 항원 결합성 영역의 VH 및 VL 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0124] a) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0125] b) 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0126] c) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0127] d) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0128] e) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0129] f) 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0130] g) 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0131] h) 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0132] i) 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0133] j) 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0134] k) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0135] l) 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열; 및

[0136] m) 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 VL 서열.

[0137] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 VH 및 VL 서열을 포함하는데, 여기서 제1 항원 결합성 영역의 VH 및 VL 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0138] a) 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열;

[0139] b) 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 VL 서열.

[0140] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 17 및 18에 제시된 바와 같은 제1 VH 및 VL 서열을 포함한다.

[0141] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함한다. 한 실시양태에서 서열 편차는 프레임워크 서열 내에 있고, CDR 서열에는 없다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 CDR 서열은 중쇄의 경우에는, 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같고, 경쇄의 경우에는, 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열이므로, CDR 서열은 돌연변이되지 않는다.

[0142] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 CDR 서열은 중쇄의 경우에는, 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같고, 경쇄의 경우에는, 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열이므로, CDR 서열은 돌연변이되지 않는다.

[0143] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 CDR 서열은 중쇄의 경우에는, 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같고, 경쇄의 경우에는, 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열이므로, CDR 서열은 돌연변이되지 않는다.

[0144] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 98% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 98% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 CDR 서열은 중쇄의 경우에는, 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같고, 경쇄의 경우에는, 서열식별번

호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열이므로, CDR 서열은 돌연변이되지 않는다.

[0145] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖고 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것인데, 여기서 CDR 서열은 중쇄의 경우에는, 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같고, 경쇄의 경우에는, 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열이므로, CDR 서열은 돌연변이되지 않는다.

[0146] 이로써, VH 및 VL 서열이 모 서열과 적어도 90% 서열 동일성 이내에서 다양할 수 있는 본 발명의 이중특이적 항체가 제공된다. 변이체가 모 항체와 동일한 특성을 갖는 것이 바람직하다. 특정 실시양태에서, 서열은 단지 프레임워크 서열에서만 다양하므로, CDR 서열은 모 CDR 서열과 동일하다.

[0147] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함한다.

[0148] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제1 결합성 아암은 마우스 항체로부터 유래된다.

[0149] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제1 결합성 아암은 인간화 항체로부터 유래된다.

[0150] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제1 결합성 아암은 완전한 길이의 항체로부터 유래된다.

[0151] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제1 결합성 아암은 완전한 길이의 IgG1,λ (람다) 또는 IgG1, κ (카파) 항체로부터 유래된다.

[0152] *제2 결합성 아암*

[0153] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체에서 제2 결합성 아암으로서 사용하기 적합한 CD20 항체는 위치 170에서 아미노산 잔기 알라닌 또는 위치 172에서 프롤린을 포함하지 않거나 또는 요구하지 않지만, 위치 163에서 아미노산 잔기 아스파라긴 및 위치 166에서 아스파라긴을 포함하거나 또는 요구하는, 인간 CD20 상의 에피토프와 결합하는 CD20 항체이다. 이러한 항체의 예는 WO2004035607 (젠맙)에 개시된 바와 같은 2F2 및 7D8로 표시된 항체 및 WO2005103081 (젠맙)에 개시된 바와 같은 2C6으로 표시된 항체이다. 2F2, 7D8 및 2C6의 CDR 서열이 표 1에 개시된다.

[0154] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체에서 제2 결합성 아암으로서 사용하기 적합한 추가의 CD20 항체는 위치 170에서 아미노산 잔기 알라닌 또는 위치 172에서 프롤린을 포함하지 않거나 또는 요구하지 않는, 인간 CD20 상의 에피토프와 결합하는 CD20 항체이다. 이러한 항체의 예는 WO2004035607 (젠맙)에 개시된 바와 같은 11B8이다. 11B8의 CDR 서열이 표 1에 개시된다.

[0155] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체에서 제2 항원 결합성 영역으로서 사용하기 적합한 추가의 CD20 항체는 낮은 기능적 오프-레이트(off-rate)를 수반한 CD20 항체인데, 이는 항체가 결합시 CD20로부터 느리게 해리된다는 것을 의미한다.

[0156] k_d 해리 상수 또는 k_{off} 레이트는 WO2004035607의 실시예 5에서 "*항-CD20 F(ab)$_2$ 단편의 해리 속도*"란 표제하에 기재된 방법에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, CD20 항체는 상기 방법에 의해 결정된 바와 같이, 1.0×10^{-4} sec^{-1} 이하, 예컨대 8.0×10^{-5} sec^{-1} 이하, 예컨대 8.0×10^{-5} sec^{-1} 내지 4.0×10^{-5} sec^{-1}의 범위의 k_d 해리 상수를 갖는다.

[0157] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체에서 제2 결합성 아암으로서 사용하기 적합한 추가의 CD20 항체는 WO2004035607에 개시된 바와 같은 11B8로 표시된 항체의 6개 CDR 서열을 갖는 CD20 항체이다. 11B8의 CDR 서

열이 표 1에 개시된다.

[0158] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역을 포함하는데, 이러한 제2 항원 결합성 영역은 다음으로부터 선택된 서열을 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함한다:

[0159] (i) 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역,

[0160] (ii) 서열식별번호: 38의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 39의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역,

[0161] (iii) 서열식별번호: 42의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 43의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 44의 VH CDR3 영역, 또는

[0162] (iv) 서열식별번호: 49의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 50의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 51의 VH CDR3 영역.

[0163] 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 및 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역을 포함하는 제2 항원 결합성 영역을 포함한다.

[0164] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역을 포함하는데, 이러한 제2 항원 결합성 영역은 다음으로부터 선택된 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함한다:

[0165] (i) 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역,

[0166] (ii) 서열식별번호: 38의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 39의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역,

[0167] (iii) 서열식별번호: 42의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 43의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 44의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 45의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 46의 VL CDR3 영역,

[0168] (iv) 서열식별번호: 49의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 50의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 51의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 52의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 53의 VL CDR3 영역,

[0169] (v) 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 45의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 46의 VL CDR3 영역,

[0170] (vi) 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 52의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 53의 VL CDR3 영역,

[0171] (vii) 서열식별번호: 38의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 39의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 45의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 46의 VL CDR3 영역,

[0172] (viii) 서열식별번호: 38의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 39의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 52의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 53의 VL CDR3 영역,

[0173] (ix) 서열식별번호: 42의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 43의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 44의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역,

[0174] (x) 서열식별번호: 42의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 43의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 44의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 52의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 53의 VL CDR3 영역,

[0175] (xi) 서열식별번호: 49의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 50의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 51의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역, 또는

[0176] (xii) 서열식별번호: 49의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 50의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 51의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 45의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 46의 VL CDR3 영역.

[0177] 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역을 포함하는 제2

항원 결합성 영역을 포함한다.

[0178] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0179] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 37에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0180] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 41에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0181] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 47에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 48에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0182] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 41에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0183] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 48에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0184] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 37에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 41에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0185] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 37에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 48에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0186] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0187] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 48에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0188] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호: 47에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0189] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 서열식별번호:

47에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열, 및 서열식별번호: 41에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열을 포함한다.

[0190] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제2 VH 및 VL 서열을 포함하는데, 여기서 제2 항원 결합성 영역의 VH 및 VL 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0191] (i) 서열식별번호: 27의 VH 서열, 및 서열식별번호: 28의 VL 서열,

[0192] (ii) 서열식별번호: 37의 VH 서열, 및 서열식별번호: 28의 VL 서열,

[0193] (iii) 서열식별번호: 40의 VH 서열, 및 서열식별번호: 41의 VL 서열,

[0194] (iv) 서열식별번호: 47의 VH 서열, 및 서열식별번호: 48의 VL 서열,

[0195] (v) 서열식별번호: 27의 VH 서열, 및 서열식별번호: 41의 VL 서열,

[0196] (vi) 서열식별번호: 27의 VH 서열, 및 서열식별번호: 48의 VL 서열,

[0197] (vii) 서열식별번호: 37의 VH 서열, 및 서열식별번호: 41의 VL 서열,

[0198] (viii) 서열식별번호: 37의 VH 서열, 및 서열식별번호: 48의 VL 서열,

[0199] (ix) 서열식별번호: 40의 VH 서열, 및 서열식별번호: 28의 VL 서열,

[0200] (x) 서열식별번호: 40의 VH 서열, 및 서열식별번호: 48의 VL 서열,

[0201] (xi) 서열식별번호: 47의 VH 서열, 및 서열식별번호: 28의 VL 서열, 또는

[0202] (xii) 서열식별번호: 47의 VH 서열, 및 서열식별번호: 41의 VL 서열.

[0203] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제2 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 27의 VH 서열, 및 서열식별번호: 28의 VL 서열을 포함한다.

[0204] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제2 결합성 아암은 인간 항체로부터 유래된다.

[0205] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제2 결합성 아암은 완전한 길이의 항체로부터 유래된다.

[0206] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 제2 결합성 아암은 IgG1, κ (카파) 항체로부터 유래된다.

[0207] *이중특이적 항체 포맷*

[0208] 본 발명은 CD20-발현성 종양 세포의 T 세포-매개된 사멸을 효율적으로 증진시키는 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제공한다. 특별한 용도에 요망되는 기능적 특성에 따라서, 본 발명에 의해 제공된 항체 또는 항원 결합성 영역의 세트로부터 특별한 항원 결합성 영역을 선택할 수 있다. 이중특이적 항체의 많은 상이한 포맷과 용도가 관련 기술분야에 공지되어 있고, 다음 문헌에 고찰되었다 ([Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul; 20(7):838-47]; 및 [MAbs, 2012 Mar-Apr; 4(2):182-97]).

[0209] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 임의의 특별한 이중특이적 포맷 또는 그의 생성 방법으로 제한되지 않는다.

[0210] 본 발명에 사용될 수 있는 이중특이적 항체 분자의 예는 (i) 상이한 항원 결합성 영역을 포함하는 2개의 아암을 갖는 단일 항체; (ii) 예를 들어, 여분의 펩티드 링커에 의해 탠덤으로 연결된 2개의 scFv를 통하여, 2개의 상이한 에피토프에 대한 특이성을 갖는 단일 쇄 항체; (iii) 각각의 경쇄 및 중쇄가 짧은 펩티드 연쇄를 통하여 탠덤으로 2개의 가변 도메인을 함유하는 이중-가변-도메인 항체 (DVD-Ig) (문헌 [Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)]); (iv) 화학적으로 연결된 이중특이적 (Fab')2 단편; (v) 각각의 표적 항원에 대한 2개의 결합 부위를 갖는 4가 이중특이적 항체를 초래하는 2개의 단일 쇄 디아보디의 융합인 Tandab; (vi) 다가 분자를 초래하는, scFv와 디아보디의 조합인 플렉시보디(flexibody); (vii) Fab에 적용되는 경우에, 상이한 Fab 단편에 연결된 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어진 3가 이중특이적 결합성 단백

질을 산출할 수 있는, 단백질 키나제 A에서 "이량체화 및 도킹 도메인"에 근거한 소위 "독 앤 락(dock and lock)" 분자; (viii) 예를 들어, 인간 Fab-아암의 양 말단과 융합된 2개의 scFv를 포함하는, 소위 스콜피온(Scorpion) 분자; 및 (ix) 디아보디를 포함한다.

[0211] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 디아보디, 크로스-보디(cross-body), 또는 제어된 Fab-아암 교환 [예컨대 WO2011131746 (젠맙)에 기재됨]을 통하여 수득된 이중특이적 항체이다.

[0212] 상이한 부류의 이중특이적 항체의 예는 (i) 강제로 이종이량체화하기 위해 상보적 CH3 도메인을 수반한 IgG-유사 분자; (ii) 분자의 양면이 각각 적어도 2개의 상이한 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부를 함유하는, 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자; (iii) 완전한 길이의 IgG 항체가 여분의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 부분과 융합되는 IgG 융합 분자; (iv) 단일 쇄 Fv 분자 또는 안정화된 디아보디가 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분과 융합되는 Fc 융합 분자; (v) 상이한 Fab-단편들이 함께 융합되거나, 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분과 융합되는 Fab 융합 분자; 및 (vi) 상이한 단일 쇄 Fv 분자 또는 상이한 디아보디 또는 상이한 중쇄 항체 (예를 들어 도메인 항체, 나노보디)가 서로 융합되거나 또는 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 부분과 융합된 또 다른 단백질 또는 운반체 분자와 융합되는, ScFv- 및 디아보디-기반 및 중쇄 항체 (예를 들어, 도메인 항체, 나노보디)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0213] 상보적 CH3 도메인 분자를 수반한 IgG-유사 분자의 예는 트리오맙(Triomab)/쿠아드로마(Quadroma) 분자 [트리온 파르마(Trion Pharma)/프레세니우스 바이오테크(Fresenius Biotech); 로슈(Roche), WO2011069104], 소위 놉-인투-홀 분자 [제넨테크(Genentech), WO9850431], 크로스MAb (로슈, WO2011117329) 및 정전기적으로 매칭된 분자 [암젠(Amgen), EP1870459 및 WO2009089004; 추가이(Chugai), US201000155133; 온코메드(Oncomed), WO2010129304], LUZ-Y 분자 (제넨테크; 문헌 [Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52):43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1]), DIG-보디 및 PIG-보디 분자 [파르맙신(Pharmabcine), WO2010134666, WO2014081202], 가닥 교환 조작된 도메인 보디 (SEED보디) 분자 [EMD 세로노(Serono), WO2007110205], 바이클로닉스(Biclonics) 분자 [메루스(Merus), WO2013157953], FcΔAdp 분자 (레제네론, WO2010015792), 이중특이적 IgG1 및 IgG2 분자 [화이자(Pfizer)/리내트(Rinat), WO111143545], 애지메트릭 스캐폴드(Azymetric scaffold) 분자 [지메워크스(Zymeworks)/머크(Merck), WO2012058768], mAb-Fv 분자 (젠코르, WO2011028952), 2가 이중특이적 항체 (WO2009080254) 및 두오보디(DuoBody®) 분자 (젠맙 A/S, WO2011131746)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0214] 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자의 예는 이중 표적화 (DT)-Ig 분자 (WO2009058383), 투인원(Two-in-one) 항체 (제넨테크; 문헌 [Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614]), 가교 결합된 Mab [카르마노스(Karmanos) 암 센터], mAb2 (F-스타, WO2008003116), 지보디 분자 (진게니아(Zyngenia); 문헌 [LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr; 5(2):208-18]), 공통의 경쇄를 이용한 접근 방식 [크루셀(Crucell)/메루스, US7,262,028], κλ보디 [노브임뮨(NovImmune), WO2012023053] 및 CovX-보디 (CovX/화이자; 문헌 [Doppalapudi, V.R., et al. 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501-506])를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0215] IgG 융합 분자의 예는 이중 가변 도메인 (DVD)-Ig 분자 [애보트(Abbott), US7,612,181], 이중 도메인 이중 헤드 항체 [유니레버(Unilever); 사노피 아벤티스(Sanofi Aventis), WO20100226923], IgG-유사 이중특이적 분자 (임클론(ImClone)/일라이 릴리(Eli Lilly); 문헌 [Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32(2):191-8]), Ts2Ab (메드임뮨(MedImmune)/AZ; 문헌 [Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30; 393(3):672-92]) 및 BsAb 분자 [지모제네틱스(Zymogenetics), WO2010111625], HERCULES 분자 [바이오젠 아이덱(Biogen Idec), US007951918], scFv 융합 분자 [노바르티스(Novartis)], scFv 융합 분자 [창저우 아담 바이오테크 인크.(Changzhou Adam Biotech Inc.), CN 102250246] 및 TvAb 분자 (로슈, WO2012025525, WO2012025530)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0216] Fc 융합 분자의 예는 ScFv/Fc 융합물 (문헌 [Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179-88]), 스콜피온 분자 (이멀전트 바이오솔루션즈(Emergent BioSolutions)/트루비온(Trubion); 문헌 [Blankenship JW, et al. AACR 100 th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465)]; 지모제네틱스/BMS, WO2010111625), 이중 친화성 재표적화 기술 (Fc-DART) 분자 [매크로제닉스(MacroGenics), WO2008157379, WO2010080538] 및 이중(ScFv)2-Fab 분자 (항체 의약을 위한 국립 조사 센터 - 중국)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0217] Fab 융합 이중특이적 항체의 예는 F(ab)2 분자 (메다렉스(Medarex)/암젠; 문헌 [Deo et al. J Immunol. 1998

Feb 15;160(4):1677-86]), 이중-작용 또는 비스-Fab 분자 (제넨테크, 문헌 [Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614]), 독 앤 락 (DNL) 분자 [임뮤노메딕스(ImmunoMedics), WO2003074569, WO2005004809], 2가 이중특이적 분자 (바이오텍놀(Biotecnol), 문헌 [Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7050-7]) 및 Fab-Fv 분자 [UCB-셀테크(Celltech), WO 2009040562 A1]를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0218] ScFv-, 디아보디-기반 및 도메인 항체의 예는 이중특이적 T 세포 인게이저 (BiTE) 분자 [마이크로메트(Micromet), WO2005061547], 탠덤 디아보디 분자 (TandAb) (애피메드(Affimed), 문헌 [Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):357-66]), 이중 친화성 재표적화 기술 (DART) 분자 (매크로제닉스, WO2008157379, WO2010080538), 단일 쇄 디아보디 분자 (로렌스(Lawrence), 문헌 [FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84]), TCR-유사 항체 [AIT, 리셉터로직스(ReceptorLogics)], 인간 혈청 알부민 ScFv 융합 [메리마크(Merrimack), WO2010059315] 및 COMBODY 분자 (에피젠 바이오테크(Epigen Biotech), 문헌 [Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75]), 이중 표적화 나노보디 (압린크(Ablynx), 문헌 [Hmila et al., FASEB J. 2010]) 및 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0219] 한 측면에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 제1 CH3 영역을 포함하는 제1 Fc-영역, 및 제2 CH3 영역을 포함하는 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고; 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 이종이량체성 상호 작용이 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 동종이량체성 상호 작용 각각보다 더 강력하도록 설정된다. 이들 상호 작용 및 이들을 달성할 수 있는 방법에 관한 보다 상세 내역이 WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맙)에 제공되는데, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0220] 본원에 추가로 기재되는 바와 같이, 안정적인 이중특이적 CD3xCD20 항체는 CH3 영역 내에 소수의 꽤 보존적인 비대칭적 돌연변이만을 함유하는 하나의 동종이량체성 출발 CD20 항체와 하나의 동종이량체성 출발 CD3 항체를 기준으로 한 특별한 방법을 이용하여 고 수율로 수득할 수 있다. 비대칭적 돌연변이는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 동일하지 않은 위치에서 아미노산 치환을 함유한다는 것을 의미한다.

[0221] 한 측면에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 및 제2 중쇄를 포함하는데, 여기서 이러한 제1 및 제2 중쇄 각각은 적어도 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역을 포함하고; 상기 제1 중쇄에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 위치 내의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되었고, 상기 제2 중쇄에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 위치 내의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되었으며, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄가 동일한 위치에서는 치환되지 않는다.

[0222] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 및 제2 중쇄를 포함하는데, 여기서 (i) 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 R이거나, 또는 (ii) 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치 내의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 L이다.

[0223] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는데, 여기서 제1 Fc-영역과 제2 Fc-영역은 동일한 위치에서 치환되지 않는다.

[0224] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 366에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서 위치 366에서의 아미노산은 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, 또는 Gln으로부터 선택된다.

[0225] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 368에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0226] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 370에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0227] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은

위치 399에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0228] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 405에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0229] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 407에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 405, 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0230] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 409에 아미노산 치환을 가지며, 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 405, 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다.

[0231] 따라서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 비대칭적 돌연변이를 함유하는데, 즉 두 CH3 영역 내의 상이한 위치에서의 돌연변이, 예를 들어 CH3 영역 중 하나에서는 위치 405에서의 돌연변이를 함유하고 다른 CH3 영역에서는 위치 409에서의 돌연변이를 함유한다.

[0232] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며, 상기 제2 Fc-영역은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 갖는다. 이러한 한 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며, 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys, 또는 Leu를 갖는다. 이의 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며, 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 갖는다.

[0233] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met, 또는 Cys를 포함하고, 위치 409에 Lys를 포함한다. 이의 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하고, 위치 409에 Lys를 포함한다.

[0234] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Leu를 포함하고, 위치 409에 Lys를 포함한다. 이의 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Arg를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하고, 위치 409에 Lys를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Arg를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Leu를 포함하고, 위치 409에 Lys를 포함한다.

[0235] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg,

His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하고; 상기 제2 Fc-영역은 위치 409에 Lys를 포함하며, 위치 370에 Thr를 포함하고, 위치 405에 Leu를 포함한다. 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Arg를 포함하고; 상기 제2 Fc-영역은 위치 409에 Lys를 포함하며, 위치 370에 Thr를 포함하고 위치 405에 Leu를 포함한다.

[0236] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 훨씬 추가의 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 370에 Lys를 포함하고, 위치 405에 Phe를 포함하며, 위치 409에 Arg를 포함하고; 상기 제2 Fc-영역은 위치 409에 Lys를 포함하며, 위치 370에 Thr를 포함하고, 위치 405에 Leu를 포함한다.

[0237] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 포함하고; 상기 제2 Fc-영역은 위치 409에 Lys를 포함하고: a) 위치 350에 Ile를 포함하며 위치 405에 Leu를 포함하거나, 또는 b) 위치 370에 Thr를 포함하고 위치 405에 Leu를 포함한다.

[0238] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Arg를 포함하고; 상기 제2 Fc 영역은 위치 409에 Lys를 포함하며: a) 위치 350에 Ile를 포함하고 위치 405에 Leu를 포함하거나, 또는 b) 위치 370에 Thr를 포함하며 위치 405에 Leu를 포함한다.

[0239] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 350에 Thr을 포함하고, 위치 370에 Lys를 포함하며, 위치 405에 Phe를 포함하고, 위치 409에 Arg를 포함하며; 상기 제2 Fc 영역은 위치 409에 Lys를 포함하고: a) 위치 350에 Ile를 포함하고 위치 405에 Leu를 포함하거나, 또는 b) 위치 370에 Thr에 포함하며 위치 405에 Leu를 포함한다.

[0240] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 350에 Thr을 포함하고, 위치 370에 Lys를 포함하며, 위치 405에 Phe를 포함하고 및 위치 409에 Arg를 포함하며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 350에 Ile를 포함하고, 위치 370에 Thr에 포함하며, 위치 405에 Leu를 포함하고 위치 409에 Lys를 포함한다.

[0241] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역는 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 405에 Phe 이외의 아미노산, 예컨대 위치 405에 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 아미노산을 갖거나; 또는 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 가지며, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 갖는다.

[0242] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는 제1 Fc-영역; 및 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 갖는 제2 Fc-영역을 포함한다.

[0243] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 갖는 제1 Fc-영역; 및 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는 제2 Fc-영역을 포함한다.

[0244] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Arg를 갖는 제1 Fc-영역; 및 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산을 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는 제2 Fc-영역을 포함한다.

[0245] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp, 또는 Cys를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 갖는다.

[0246] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1

Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 갖는다.

[0247] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp, 또는 Cys를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0248] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0249] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0250] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Arg를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp, 또는 Cys를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0251] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Arg를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0252] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역은 위치 407에 Tyr를 가지며, 위치 409에 Arg를 가지며; 상기 제2 Fc-영역은 위치 407에 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 가지며, 위치 409에 Lys를 갖는다.

[0253] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 또 다른 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 가지며; 제2 Fc-영역은

[0254] (i) 위치 368에 Phe, Leu 및 Met 이외의 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, 또는 Cys를 갖거나, 또는

[0255] (ii) 위치 370에 Trp를 갖거나, 또는

[0256] (iii) 위치 399에 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 아미노산, 예를 들어 Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr, 또는 Cys를 갖거나, 또는

[0257] (iv) 위치 366에 Lys, Arg, Ser, Thr, 또는 Trp 이외의 아미노산, 예를 들어 Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr, 또는 Cys를 갖는다.

[0258] 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 409에 Arg, Ala, His 또는 Gly을 가지며; 제2 Fc 영역은

[0259] (i) 위치 368에 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를 갖거나, 또는

[0260] (ii) 위치 370에 Trp를 갖거나, 또는

[0261] (iii) 위치 399에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr를 갖거나, 또는

[0262] (iv) 위치 366에 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, 또는 Tyr을 갖는다.

[0263] 한 실시양태에서, 제1 Fc-영역은 위치 409에 Arg를 가지며; 제2 Fc 영역은

[0264] (i) 위치 368에 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val, 또는 Trp를 갖거나, 또는

[0265] (ii) 위치 370에 Trp를 갖거나, 또는

[0266] (iii) 위치 399에 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr을 갖거나, 또는

[0267] (iv) 위치 366에 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln을 갖는다.

[0268] 상기 명시된 아미노산 치환 이외에도, 상기 제1 및 제2 Fc 영역은 야생형 Fc 서열과 비교해서 추가의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다.

[0269] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 Fc 영역을 포함하는 상기 제1 및 제2 Fab-아암 (또는 중쇄 불변 도메인)은 명시된 돌연변이를 제외하고는, 다음으로부터 독립적으로 선택된 CH3 서열을 포함한다:

[0270] (IgG1m(a)) (서열식별번호: 60), (IgG1m(f)) (서열식별번호: 61), 및 (IgG1m(ax) (서열식별번호: 62).

[0271] 한 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역 또는 상기 제2 Fc-영역 중 어느 것도 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는다.

[0272] 추가 실시양태에서, 상기 제1 Fc-영역과 상기 제2 Fc-영역 둘 다는 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다.

[0273] 별도의 및 구체적 실시양태에서, Fab 아암 중 하나 또는 둘 다는 서열식별번호: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 및 71로부터 독립적으로 선택된 중쇄 불변 영역 서열을 포함한다 (표 1 참조).

[0274] 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 임의의 것에 따르는 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, (a) 제1 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 1, 2, 및 3에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 서열, 서열 GTN, 및 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 서열을 각각 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하고; (b) 인간 CD20과 결합하는 제2 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 32의 VH CDR1 영역, 서열식별번호: 33의 VH CDR2 영역, 서열식별번호: 34의 VH CDR3 영역, 서열식별번호: 35의 VL CDR1 영역, DAS의 VL CDR2 영역, 및 서열식별번호: 36의 VL CDR3 영역을 각각 포함한다.

[0275] 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 임의의 것에 따르는 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, (a) 제1 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고; (b) 제2 항원 결합성 영역은 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 VH 서열, 및 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함한다.

[0276] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 항원 결합성 영역은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL로부터 유래된 Fab 아암이고, 제2 항원 결합성 영역은 IgG1-7D8-FEAR로부터 유래된 Fab 아암이다.

[0277] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체 (즉, 하나의 중쇄와 하나의 경쇄를 포함함)이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체이다.

[0278] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체이다.

[0279] *이중특이적 항체의 제조 방법*

[0280] 전통적인 방법, 예컨대 하이브리드 하이브리도마 및 화학적 접합 방법 (문헌 [Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649])을 본 발명의 이중특이적 항체의 제조에 사용할 수 있다. 상이한 중쇄와 경쇄로 이루어진 두 항체를 숙주 세포에서 공동 발현시키면, 목적하는 이중특이적 항체 이외에도, 가능한 항체 생성물의 혼합물이 초래되는데, 이어서 이를, 예를 들어 친화 크로마토그래피 또는 유사한 방법에 의해 단리할 수 있다.

[0281] 상이한 항체 구축물의 공동 발현시 기능적 이중특이적 생성물의 형성을 촉진시키는 전략은, 예를 들어 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)]에 기재된 방법을 사용할 수도 있다. 상이한 항체를 생산하는 래트 하이브리도마와 마우스 하이브리도마를 융합시키면, 제한된 수의 이종이량체성 단백질이 초래되는데, 이는

우선적 종-제한된 중쇄/경쇄 짝짓기 때문이다. 동종이량체에 비해 이종이량체의 형성을 증진시키는 또 다른 전략은 제1 중쇄 폴리펩티드 상에는 융기가 도입되고 제2 중쇄 폴리펩티드 내에 상응하는 공동이 생겨, 이종이량체 형성을 증진시키고 동종이량체 형성을 방해하도록 이들 두 중쇄의 계면에서 공동 내에 상기 융기가 위치할 수 있도록 하는 "크놉 인투 홀" 전략이다. "융기"는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄로 대체시킴으로써 구축된다. 융기와 동일하거나 또는 유사한 크기의 대상성 "공동"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것으로 대체시킴으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 창출시킨다 (미국 특허 번호 5,731,168). EP1870459 (추가이) 및 WO2009089004 (암젠)에는 숙주 세포에서의 상이한 항체 도메인의 공동 발현시 이종이량체 형성을 촉진시키는 다른 전략이 기재되어 있다. 이들 방법에서는, 양 CH3 도메인 내에 CH3-CH3 계면을 구성하는 하나 이상의 잔기를, 전하를 띤 아미노산으로 대체시켜 동종이량체 형성이 정전기적으로 유리하지 않고 이종이량체화가 정전기적으로 유리하도록 한다. WO2007110205 (머크)에는 IgA CH3 도메인과 IgG CH3 도메인 간의 차이를 활용하여 이종이량체화를 증진시키는 또 다른 전략이 기재되어 있다.

[0282] 이중특이적 항체를 생성시키는 또 다른 시험관내 방법이 WO2008119353 (젠맙)에 기재되었는데, 여기서는 환원성 조건하에서의 인큐베이션시 두 단일특이적 IgG4- 또는 IgG4-유사 항체 간의 "Fab-아암" 또는 "절반-분자" 교환 (중쇄와 부착된 경쇄의 스와핑)에 의해 이중특이적 항체가 형성된다. 이로써 생성되는 생성물은 상이한 서열을 포함할 수 있는 2개의 Fab 아암을 갖는 이중특이적 항체이다.

[0283] 본 발명의 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제조하는 데 바람직한 방법은

[0284] a) 제1 CH3 영역을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 제1 항체를 제공하는 단계;

[0285] b) 제2 CH3 영역을 포함하는 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 항체를 제공하는 단계 (여기서, 제1 항체는 CD3 항체이며, 제2 항체는 CD20 항체이거나 또는 그 반대의 경우도 가능하다)

[0286] [여기서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고; 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 이종이량체성 상호작용이 상기 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 동종이량체성 상호 작용 각각보다 더 강력하도록 설정된다];

[0287] c) 환원성 조건하에 상기 제1 항체를 상기 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0288] d) 상기 이중특이적 CD3xCD20 항체를 수득하는 단계

[0289] 를 포함하는, WO2011131746 및 WO013060867 (젠맙)에 기재된 방법을 포함한다.

[0290] 한 실시양태에서, 상기 제1 항체는 상기 제2 항체와 함께, 힌지 영역 내의 시스테인이 디술피드 결합 이성화를 진행할 수 있기에 충분한 환원성 조건하에 인큐베이션하는데, 여기서 이로써 생성되는 이종이량체성 항체 내에서 상기 제1 항체와 제2 항체 간의 이종이량체성 상호 작용은, 37℃에서의 24시간 후에 0.5 mM GSH 하에 Fab-아암 교환이 일어나지 않도록 이루어진다.

[0291] 특정 이론에 제한되는 것은 아니지만, 단계 c)에서, 모 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 디술피드 결합이 환원되고, 이때 이로써 생성되는 시스테인은 또 다른 모 항체 분자 (원래 상이한 특이성을 수반함)의 시스테인 잔기와 중쇄간 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 이러한 방법의 한 실시양태에서, 단계 c)에서의 환원성 조건은 환원제, 예를 들어 2-메르캅토에틸아민 (2-MEA), 디티오트레이톨 (DTT), 디티오에리트리톨 (DTE), 글루타치온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토-에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된 환원제, 바람직하게는 2-메르캅토에틸아민, 디티오트레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된 환원제를 부가하는 것을 포함한다. 추가 실시양태에서, 단계 c)는, 예를 들어 환원제를 제거함으로써, 예를 들어 탈염시킴으로써, 상기 조건이 비-환원성이 되거나 또는 덜 환원성이 되도록 복원시키는 것을 포함한다.

[0292] 이러한 방법을 위하여, 제1 및/또는 제2 Fc 영역을 포함하는 제1 및 제2 CD3 및 CD20 항체를 각각 포함한, 상기 언급된 CD3 및 CD20 항체 중 임의의 것을 사용할 수 있다. 이러한 제1 Fc 영역과 제2 Fc 영역의 조합을 포함한, 상기 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역의 예는 상기 언급된 것 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 특별한 실시양태에서, 제1 및 제2 CD3 및 CD20 항체는 각각, 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체를 수득하도록 선택될 수 있다.

[0293] 상기 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 항체는 완전한 길이의 항체이다.

[0294] 제1 및 제2 항체의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 이소형의 것일 수 있다. 상기 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 항체와 상기 제2 항체 둘 다의 Fc 영역은 IgG1 이소형

의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체의 Fc 영역 중 하나는 IgG1 이소형의 것이고, 다른 것은 IgG4 이소형의 것이다. 후자 실시양태에서, 이로써 생성되는 이중특이적 항체는 IgG1의 Fc 영역 및 IgG4의 Fc 영역을 포함하므로, 이펙터 기능의 활성화와 관련하여 흥미로운 중간 특성을 가질 수 있다.

[0295] 추가 실시양태에서, 항체 출발 단백질 중 하나는 단백질 A와 결합하지 않도록 조작하였으므로, 생성물을 단백질 A 칼럼 상으로 통과시킴으로써 이종이량체성 단백질을 상기 동종이량체성 출발 단백질로부터 분리시킬 수 있다.

[0296] 상기 언급된 바와 같이, 동종이량체성 출발 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고; 상기 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 이종이량체성 상호 작용이 상기 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 동종이량체성 상호 작용 각각보다 더 강력하도록 설정된다. 이들 상호 작용 및 이들을 달성할 수 있는 방법에 관한 보다 상세 내역이 WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맙)에 제공되는데, 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0297] 특히, 안정적인 이중특이적 CD3xCD20 항체는 CD3 및 CD20과 각각 결합하고, CH3 영역 내에 소수의 꽤 보존적인 비대칭적 돌연변이만을 함유하는 2개의 동종이량체성 출발 항체를 기준으로 한 상기 본 발명의 방법을 이용하여 고 수율로 수득할 수 있다. 비대칭적 돌연변이는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 동일하지 않은 위치에서 아미노산 치환을 함유한다는 것을 의미한다.

[0298] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한, 제1 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 구축물을 단일 세포에서 공동-발현시킴으로써 수득할 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 이중특이적 항체의 생성 방법에 관한 것인데, 이러한 방법은

[0299] a) 제1 항체 중쇄의 제1 Fc 영역 및 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 (여기서, 상기 제1 Fc 영역은 제1 CH3 영역을 포함한다) 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 구축물을 제공하는 단계;

[0300] b) 제2 항체 중쇄의 제2 Fc 영역 및 제2 항원 결합성 영역을 포함하는 (여기서, 상기 제2 Fc 영역은 제2 CH3 영역을 포함한다) 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 구축물을 제공하는 단계

[0301] [여기서, 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고, 상기 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 이종이량체성 상호 작용은 상기 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 간의 동종이량체성 상호 작용 각각보다 더 강력하도록 설정되며; 상기 제1 동종이량체성 단백질은 위치 409에 Lys, Leu 또는 Met 이외의 아미노산을 가지며, 상기 제2 동종이량체성 단백질은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 가지며;

[0302] 임의로 상기 제1 및 제2 핵산 구축물은 상기 제1 및 제2 항체의 경쇄 서열을 코딩한다];

[0303] c) 상기 제1 및 제2 핵산 구축물을 숙주 세포에서 공동-발현하는 단계; 및

[0304] d) 세포 배양물로부터 상기 이종이량체성 단백질을 수득하는 단계

[0305] 를 포함한다.

[0306] 따라서, 본 발명은 또한, 본 발명의 이중특이적 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포에 관한 것이다.

[0307] 본 발명의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 본 발명에 따르는 방법 중 임의의 것에 의해 수득된다.

[0308] 프로모터, 증강인자 등을 포함한 적합한 발현 벡터, 및 항체를 생산하는 데 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아 및 포유류 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK 세포를 포함한다.

[0309] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 명시된 돌연변이를 제외하고는, 서열식별번호: 60 (IgG1m(a))의 서열을 포함하는 제1 및 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0310] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 상기 제1 Fc-영역 또는 상기 제2 Fc-영역 중 어느 것도 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는다.

[0311] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 상기 제1 Fc-영역과 상기 제2 Fc-영역 둘 다는 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다.

[0312] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 제1 및 제2 Fc-영역은 인간 항체 Fc-영역이다.

[0313] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 상기 제1 및 제2 Fc 영역은 명시된 돌연변이를 제외하고는, 서열식별번호: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 및 71로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 서열을 포함한다.

[0314] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 제1 및 제2 항원 결합성 영역은 인간 항체 VH 서열 및, 임의로, 인간 항체 VL 서열을 포함한다.

[0315] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 제1 및 제2 항원 결합성 영역은 중쇄 항체로부터의 것이다.

[0316] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 Fc-영역 및 제2 Fc-영역을 포함하는데, 여기서 제1 및 제2 항원 결합성 영역은 제1 및 제2 경쇄를 포함한다.

[0317] 추가 실시양태에서, 본 발명에 따르는 공동-발현 방법은 상기 시험관내 방법하에 기재된 추가의 특색 중 임의의 것을 포함한다.

[0318] 추가 측면에서, 본 발명은 상기 본원에 명시된 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 추가 실시양태에서, 이러한 발현 벡터는 추가로, 항체, 예를 들어 인간 항체의 경쇄, 중쇄, 또는 경쇄와 중쇄 둘 다의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0319] 본 발명의 맥락에서 발현 벡터는 임의의 적합한 벡터일 수 있는데, 이는 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터 (적합한 세트의 발현 제어 요소를 포함하는 핵산 서열)를 포함한다. 이러한 벡터의 예는 SV40의 유도체, 박테리아 플라스미드, 파지 DNA, 바쿨로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드와 파지 DNA의 조합물로부터 유래된 벡터, 및 바이러스 핵산 (RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, CD20 또는 CD3 항체-코딩 핵산은 있는 그대로의(naked) DNA 또는 RNA 벡터 내에 포함되는데, 이러한 벡터는, 예를 들어 선형 발현 요소 (예를 들어, 문헌 [Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)]에 기재된 바와 같음), 꽉 찬 핵산 벡터 (예를 들어, US 6,077,835 및/또는 WO 00/70087에 기재된 바와 같음), 플라스미드 벡터, 예컨대 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, 최소한의 크기의 "미지(midge)" 핵산 벡터 (예를 들어, 문헌 [Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)]에 기재된 바와 같음)를 포함하거나, 또는 침전된 핵산 벡터 구축물로서, 예컨대 CaP04-침전된 구축물로서 (예를 들어, WO200046147, 문헌 [Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)], [Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)], 및 [Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)]에 기재된 바와 같음) 포함된다. 이러한 핵산 벡터 및 그의 활용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어 US 5,589,466 및 US 5,973,972 참조).

[0320] 한 실시양태에서, 상기 벡터는 박테리아 세포에서 CD20 항체 및/또는 CD3 항체를 발현시키는 데 적합하다. 이러한 벡터의 예는 발현 벡터, 예컨대 블루스크립트(BlueScript) [스트라타젠(Stratagene)], pIN 벡터 (문헌 [Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)]), pET 벡터 [노바젠 (Novagen; 미국 위스콘신주 매디슨) 등]를 포함한다.

[0321] 발현 벡터는 또한 또는 또 다른 한편으론, 효모 시스템에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템에서의 발현에 적합한 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 적합한 벡터는, 예를 들어, 구성적 또는 유도성 프로모터 예컨대, 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH를 포함하는 벡터를 포함한다 (문헌 [F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)], 및 [Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)]에서 고찰됨).

[0322] 발현 벡터는 또한 또는 또 다른 한편으론, 포유류 세포에서의 발현에 적합한 벡터, 예를 들어 선별성 마커로서 글루타민 신테타제를 포함하는 벡터, 예컨대 문헌 [Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175]에 기재된 벡터일 수 있다.

[0323] 핵산 및/또는 벡터는 또한, 폴리펩티드, 예컨대 초기 폴리펩티드 쇄가 주변세포질 공간을 표적으로 하거나 또는 세포 배양 배지 내로 표적화될 수 있는, 분비/국재화 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 분비 리더 또는 시그널 펩티드를 포함한다.

[0324] 발현 벡터는 임의의 적합한 프로모터, 증강인자, 및 다른 발현-촉진성 요소를 포함할 수 있거나 또는 이와 회합

될 수 있다. 이러한 요소의 예는 강력한 발현 프로모터 (예를 들어, 인간 CMV IE 프로모터/증강인자 뿐만 아니라 RSV, SV40, SL3-3, MMTV, 및 HIV LTR 프로모터), 유효한 폴리 (A) 종결 서열, 이. 콜라이 (*E. coli*)에서의 플라스미드 생성물에 대한 복제 기점, 선별성 마커로서의 항생제 내성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위 (예를 들어, 폴리링커)를 포함한다. 핵산은 또한, 구성적 프로모터, 예컨대 CMV IE가 아닌 유도성 프로모터를 포함할 수 있다.

[0325] 한 실시양태에서, CD20 및/또는 CD3 항체-코딩 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통하여 숙주 세포 또는 숙주 동물 내에 위치 설정될 수 있고/있거나 전달될 수 있다.

[0326] 훨씬 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 본원에 명시된 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0327] 따라서 본 발명은 또한, 본 발명의 이중특이적 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예컨대 형질감염세포에 관한 것이다.

[0328] 제1 CD20-특이적 항체는 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예컨대 형질감염세포에서 발현될 수 있다. CD3-특이적 항체는 마찬가지로, 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예컨대 형질감염세포에서 발현될 수 있다.

[0329] 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아, 식물 및 포유류 세포, 예컨대 CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 또는 NS0 세포 또는 림프구성 세포를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 숙주 세포는 세포성 게놈 내로 안정적으로 통합된 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 명시된 바와 같은 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는, 비-통합된 핵산, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 또는 선형 발현 요소를 포함하는 세포를 제공한다.

[0330] 훨씬 추가의 측면에서, 본 발명은 1개 또는 2개 세트의 인간 중쇄 및 인간 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물 또는 식물에 관한 것인데, 여기서 이러한 동물 또는 식물은 본 발명의 이중특이적 항체를 생산한다.

[0331] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에 사용하기 위한 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 훨씬 추가의 측면에서, 본 발명은 1개 또는 2개 세트의 인간 중쇄 및 인간 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물 또는 식물에 관한 것인데, 여기서 이러한 동물 또는 식물은 이중특이적 항체 또는 본 발명의 이중특이적 항체에 사용하기 위한 항체를 생산한다.

[0332] 한 측면에서, 본 발명은 표 1에 제시된 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 구축물에 관한 것이다.

[0333] 한 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다:

[0334] (i) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 제1 결합성 아암의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열;

[0335] (ii) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 제1 결합성 아암의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열;

[0336] (iii) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 제2 결합성 아암의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열;

[0337] (iv) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 제2 결합성 아암의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열;

[0338] (v) (i)에 제시된 핵산 및 (ii)에 제시된 핵산;

[0339] (vi) (iii)에 제시된 핵산 및 (iv)에 제시된 핵산;

[0340] (vii) (i), (ii), (iii) 및 (iv)에 제시된 핵산.

[0341] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체를 생성하는 방법에 관한 것인데, 이는

[0342] a) 본원에 개시된 바와 같은 제1 항체를 발현하는 본원에 개시된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 본원에 개시된 바와 같은 숙주 세포를 배양하고, 상기 항체를 배양 배지로부터 정제하는 단계;

[0343] b) 본원에 개시된 바와 같은 제2 항체를 발현하는 본원에 개시된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 본원에 개시된 바와 같은 숙주 세포를 배양하고, 상기 항체를 배양 배지로부터 정제하는 단계;

[0344] c) 상기 제1 항체를 상기 제2 항체와 함께, 힌지 영역 내의 시스테인이 디술피드 결합 이성화를 진행할 수 있기에 충분한 환원성 조건하에 인큐베이션하는 단계; 및

[0345] d) 상기 이중특이적 항체를 수득하는 단계

[0346] 를 포함한다.

[0347] 한 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 재조합 진핵, 재조합 원핵, 또는 재조합 미생물 숙주 세포이다.

[0348] *Fc 영역*

[0349] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 CD3xCD20 항체는 추가로, 상기 언급된 제1 및 제2 항원 결합성 영역을 각각 추가로 포함하는 제1 및 제2 Fab-아암 내에 포함될 수 있는 제1 Fc 영역 및 제2 Fc 영역을 포함한다 (또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다).

[0350] 본 발명의 또 다른 측면에서, 이중특이적 CD3xCD20 항체는 제1 및 제2 항원 결합성 영역을 각각 포함하는 제1 및 제2 Fab-아암을 포함한다. 이중특이적 CD3xCD20 항체는 추가로, 제1 및 제2 Fc 영역을 포함한다. 본 발명의 한 측면에서, 이중특이적 CD3xCD20 항체는 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 제1 Fab-아암 및 제1 Fc 영역, 및 제2 항원 결합성 영역을 포함하는 제2 Fab-아암 및 제2 Fc 영역을 포함한다.

[0351] 본 발명의 또 다른 측면에서, 이중특이적 CD3xCD20 항체는 제2 항원 결합성 영역을 포함하는 제2 Fab-아암 및 제1 Fc 영역, 및 제1 항원 결합성 영역을 포함하는 제1 Fab-아암 및 제2 Fc 영역을 포함한다.

[0352] 제1 및 제2 Fc-영역은 각각, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 이소형의 것일 수 있고, 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 제1 및 제2 Fc 영역은 IgG4 이소형의 것이거나 또는 임의로 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 수반하여, 그로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 각각의 제1 및 제2 Fc 영역은 IgG1 이소형의 것이거나 또는 임의로 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 수반하여, 그로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역 중 하나는 IgG1 이소형의 것이고 다른 것은 IgG4 이소형의 것이거나, 또는 임의로 하나 이상의 돌연변이 또는 변형을 수반하여, 이러한 각각의 이소형으로부터 유래된다.

[0353] 한 실시양태에서, Fc 영역 중 하나 또는 둘 다는 Asn-연결된 글리코실화를 위한 수용체 부위를 제거하는 돌연변이를 포함하거나, 또는 글리코실화 특성을 변화시키도록 달리 조작된다. 예를 들어, IgG1 Fc-영역에서, N297Q 돌연변이를 이용하여 Asn-연결된 글리코실화 부위를 제거할 수 있다. 따라서, 구체적 실시양태에서, Fc-영역 중 하나 또는 둘 다는 N297Q 돌연변이를 수반한 IgG1 야생형 서열 (서열식별번호: 66; 표 1 참조)을 포함한다.

[0354] 한 실시양태에서, Fc-영역 중 하나 또는 둘 다는 효과기-기능-결핍성이다. 예를 들어, Fc-영역(들)은 이펙터 기능을 매개할 수 있는 능력, 예를 들어 ADCC를 저하시키거나 또는 심지어 제거시키도록 돌연변이시킨, IgG4 이소형의 것 또는 비-IgG4 유형, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG3의 것일 수 있다. 이러한 돌연변이는, 예를 들어 문헌 ([Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006)] 및 [Hezareh M, J Virol.;75(24):12161-12168 (2001)])에 기재되었다. 한 실시양태에서, Fc-영역 중 하나 또는 둘 다는 IgG1 야생형 서열 (서열식별번호: 63; 표 1 참조)을 포함한다.

[0355] 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 Fc 영역 내에 변형을 포함할 수 있다. 이중특이적 항체가 이러한 변형을 포함하는 경우, 이는 불활성, 또는 불활성화 이중특이적 항체가 될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "불활성", 또는 "불활성화"는 적어도 임의의 Fcγ 수용체와 결합할 수 없거나, FcR의 Fc-매개된 가교 결합을 유도시킬 수 없거나, 또는 개개의 항체의 두 Fc 영역을 통하여 표적 항원의 FcR-매개된 가교 결합을 유도시킬 수 없거나, 또는 C1q와 결합할 수 없는 Fc 영역을 지칭한다. 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 Fc 영역의 불활성은 항체를 단일특이적 포맷으로 사용하여 시험하는 것이 유리하다.

[0356] 치료용 항체 개발을 위하여 Fcγ (감마) 수용체 및 C1q와의 상호 작용에 대하여 불활성인 항체의 Fc 영역을 만들기 위해 몇 가지 변이체를 구축할 수 있다. 이러한 변이체의 예가 본원에 기재된다.

[0357] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는, 이러한 항체가 야생형 항체와 비교해서 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 만큼 저하된 Fc-매개된 T-세포 증식을 매개하도록 변형시킨 Fc 영역을 포함하는데, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정에서 측정된다.

[0358] 따라서, C1q 및 Fcɣ 수용체와의 상호 작용에서 우세한 역할을 하는 Fc 영역 내의 아미노산이 변형될 수 있다. 변형될 수 있는 아미노산 위치의 예는 위치 L234, L235 및 P331을 포함한다. 그의 조합, 예컨대 L234F/L235E/P331S가 인간 CD64, CD32A, CD16 및 C1q와의 결합에 있어서 현저한 감소를 유발시킬 수 있다.

[0359] 이런 이유로, 한 실시양태에서, L234, L235 및 P331에 상응하는 적어도 하나의 위치에서의 아미노산은 각각 A, A 및 S일 수 있다 (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26; Oganesyan et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4). 또한, L234F 및 L235E 아미노산 치환으로 인해, Fcɣ 수용체 및 C1q와의 상호 작용을 없앤 Fc 영역이 초래될 수 있다 (Canfield et al., 1991, J. Exp. Med. (173):1483-91; Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40). 이런 이유로, 한 실시양태에서, L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 F 및 E일 수 있다. D265A 아미노산 치환은 모든 Fc 감마 수용체와의 결합성을 저하시킬 수 있고 ADCC를 방지시킬 수 있다 (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604). 이런 이유로, 한 실시양태에서, D265에 상응하는 위치 내의 아미노산은 A일 수 있다. C1q와의 결합성은 위치 D270, K322, P329, 및 P331을 돌연변이시킴으로써 없앨 수 있다. 이들 위치를 돌연변이시켜 D270A 또는 K322A 또는 P329A 또는 P331A로 치환시키는 것은 CDC 활성에 있어서 결핍성인 항체를 만들 수 있다 (Idusogie EE, et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84). 이런 이유로, 한 실시양태에서, D270, K322, P329 및 P331에 상응하는 적어도 하나의 위치 내의 아미노산은 각각 A, A, A, 및 A일 수 있다.

[0360] Fc 영역과 Fcɣ 수용체 및 C1q의 상호 작용을 최소화시키는 대체 접근 방식은 항체의 글리코실화 부위를 제거하는 것이다. 위치 N297을 돌연변이시켜, 예를 들어 Q, A, 또는 E로 만들면, IgG-Fc 감마 수용체 상호 작용에 매우 중요한 글리코실화 부위가 제거된다. 이런 이유로, 한 실시양태에서, N297에 상응하는 위치 내의 아미노산은 G, Q, A 또는 E일 수 있다 (Leabman et al., 2013, MAbs; 5(6):896-903). Fc 영역과 Fcɣ 수용체의 상호 작용을 최소화시키는 또 다른 대체 접근 방식은 다음 돌연변이에 의해 수득될 수 있다: P238A, A327Q, P329A 또는 E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604).

[0361] 또 다른 한편으론, 인간 IgG2 및 IgG4 하위부류는 Fcɣ 수용체와의 상호 작용이 보고되긴 하였지만, C1q 및 Fc 감마 수용체와의 상호 작용에 있어서 자연적으로 손상되는 것으로 간주된다 (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725). 이들 잔류 상호 작용을 없애는 돌연변이가 양 이소형에서 이루어져서, FcR 결합성과 연관된 원치 않는 부작용이 감소될 수 있다. IgG2의 경우에는, 이들 돌연변이가 L234A 및 G237A를 포함하고, IgG4의 경우에는, L235E를 포함한다. 이런 이유로, 한 실시양태에서, 인간 IgG2 중쇄 내의 L234 및 G237에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 A 및 A일 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 IgG4 중쇄 내의 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산은 E일 수 있다.

[0362] IgG2 항체에서 Fc 감마 수용체 및 C1q와의 상호 작용을 추가로 최소화하기 위한 다른 접근 방식은 WO2011066501 및 문헌 [Lightle, S., et al., 2010, Protein Science (19):753-62]에 기재된 방식을 포함한다.

[0363] 항체의 힌지 영역은 또한, Fcɣ 수용체 및 보체와의 상호 작용과 관련하여 중요할 수 있다 (Brekke et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138; Dall'Acqua WF, et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138). 따라서, 힌지 영역 내에서의 돌연변이 또는 힌지 영역의 결실은 항체의 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다.

[0364] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "가교 결합"은 항체 Fc 영역과의 결합을 통하여 FcR-보유 세포에 의해 표적 항원과 결합된 항체 Fab 아암(들)의 간접적 브릿징 (1가 또는 2가적으로)을 지칭한다. 따라서, 표적 항원-보유 세포 상의 그의 표적 항원과 결합하는 항체는 FcR을 발현하는 또 다른 세포와 그 세포를 가교 결합시킬 수 있다.

[0365] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비특이적 사멸"은 세포의 종양 표적 항원-비의존성 활성화를 통하여, T 세포 또는 다른 이펙터 세포의 세포독성 기능에 의해 세포를 사멸시키는 것을 지칭한다. 따라서, 비특이적 사멸이란, 이펙터 세포, 예를 들어 세포독성 T 세포가, 예를 들어 항체와 CD3 및 FcɣR의 결합에 의해 활성화되고 종양 표적 결합과 관계없이 세포독성을 유도시킨다는 것을 의미한다.

[0366] 따라서, 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄를 포함하는데, 여기서 상기 제1 면역글로불린 중쇄 및 제2 면역글로불린 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 상응하는 위치 내의 하나 이상의 아미노산이 각각 L, L, D, N, 및 P가 아니다.

[0367] 한 실시양태에서, 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 상응하는 위치 내의 하나 이상의 아미노산이 각각 L, L, D, N, 및 P가 아니다.

[0368] 또 다른 실시양태에서, 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및

D265에 상응하는 위치 내의 하나 이상의 아미노산이 각각 L, L 및 D가 아니고; 인간 IgG1 중쇄 내의 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0369] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "위치에 상응하는 아미노산"은 인간 IgG1 중쇄 내의 아미노산 위치 번호를 지칭한다. 다른 면역글로불린 내의 상응하는 아미노산 위치는 인간 IgG1과의 정렬에 의해 찾을 수 있다. 문맥상 달리 언급되거나 또는 모순되지 않는 한, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 EU-지수 넘버링 (문헌 [Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662, 680, 689]에 기재됨)에 따라서 넘버링된다. 따라서, 또 다른 서열 내의 아미노산 또는 절편에 "상응하는" 하나의 서열 내의 아미노산 또는 절편은 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, 클러스털(Clustal)W, 또는 전형적으로 디폴트 환경하에서 유사한 프로그램을 이용하여 다른 아미노산 또는 절편과 정렬되고, 인간 IgG1 중쇄와 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 것이다. 특정 서열 또는 특정 서열 내의 절편을 정렬시킴으로써, 본 발명에 따르는 아미노산 위치에 상응하는 특정 서열 내의 위치를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지된 것으로 간주된다.

[0370] 본 발명의 맥락에서, 아미노산은 상기 언급된 바와 같이 정의될 수 있다.

[0371] 중쇄 내의 아미노산을 지칭하는 경우의 용어 "아미노산은 ...이 아니다" 또는 유사한 표현은 그 아미노산이 언급된 구체적 아미노산 이외의 임의의 아미노산임을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 인간 IgG1 중쇄 내의 L234에 상응하는 위치 내의 아미노산이 L이 아니라는 것은, 그 아미노산이 L 이외의 자연적 또는 비-자연적 발생 아미노산 중 임의의 것일 수 있다는 것을 의미한다.

[0372] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D가 아니다.

[0373] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0374] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0375] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "소수성"은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기를 지칭한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택된다.

[0376] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "극성"은 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 아미노산 잔기를 지칭한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0377] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 지방족의 전하를 띠지 않는 아미노산, 방향족 또는 산성 아미노산이다.

[0378] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지방족의 전하를 띠지 않는 것"은 A, G, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 아미노산 잔기를 지칭한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, G, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0379] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "방향족"은 F, T, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 아미노산 잔기를 지칭한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 F, T, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0380] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "산성"은 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 아미노산 잔기를 지칭한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는,

인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0381] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0382] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D가 아니다.

[0383] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0384] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0385] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택된다.

[0386] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택된다.

[0387] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0388] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 지방족의 전하를 띠지 않는 아미노산, 방향족 또는 산성 아미노산이다.

[0389] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, G, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0390] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 F, T, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0391] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0392] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0393] 추가 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297에 상응하는 위치 내의 아미노산이 N이 아니다.

[0394] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297에 상응하는 위치 내의 아미노산이 N이 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 P이다.

[0395] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297에 상응하는 위치 내의 아미노산이 N이 아니다.

[0396] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297에 상응하는 위치 내의 아미노산이 N이 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 P이다.

[0397] 추가 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L 및 L이 아니다.

[0398] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L 및 L이 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0399] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V로 이루어진 군으로부

터 선택된다.

[0400] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0401] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0402] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택된다.

[0403] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0404] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L 및 L이 아니다.

[0405] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L 및 L이 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0406] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0407] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0408] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택된다.

[0409] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0410] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 지방족의 전하를 띠지 않는 아미노산, 방향족 또는 산성 아미노산이다.

[0411] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, G, I, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0412] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, T, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0413] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0414] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0415] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이다.

[0416] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0417] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이다.

[0418] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0419] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E이다.

[0420] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F 및 E이다.

[0421] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A 및 A이다.

[0422] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A 및 A이다.

[0423] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L, L, 및 D가 아니다.

[0424] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L, L 및 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0425] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 아미노산이 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택되고, 위치 D265에 상응하는 아미노산이 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0426] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0427] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0428] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0429] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0430] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 소수성 또는 극성 아미노산이다.

[0431] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0432] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0433] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0434] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 지방족의 전하를 띠지 않는 아미노산, 방향족 또는 산성 아미노산이다.

[0435] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, G, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, G, I, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0436] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, T, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0437] 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0438] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0439] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L, L, 및 D가 아니다.

[0440] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 L, L, 및 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0441] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 지방족의 전하를 띠지 않는 아미노산, 방향족 또는 산성 아미노산이다.

[0442] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, G, I, L, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, G, I, 및 V로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0443] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 D 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0444] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0445] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이다.

[0446] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0447] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이다.

[0448] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 N297 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 N 및 P이다.

[0449] 특별한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0450] 특별히 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0451] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, A, 및 A이다.

[0452] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 A, A, 및 A이다.

[0453] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, A, Q, 및 S이다.

[0454] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, A, Q, 및 S이다.

[0455] 특별한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0456] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0457] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0458] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0459] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0460] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 VH 서열, 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서는, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치 내의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이다.

[0461] 한 측면에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 서열식별번호: 29의 인간 IgLC2/IgLC3 불변 도메인 람다 경쇄를 포함한다.

[0462] Fc 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 수반한 몇 가지 항체 변이체가 생성되었다. 불활성화 Fc 영역은 항체가 혈액 세포, 예컨대 단핵구 상에 존재하는 Fc-수용체와 상호 작용하지 못하게 하거나, 또는 고전적 보체 경로를 활성화시키기 위해 C1q와 상호 작용하지 못하게 한다. Fc 활성의 저하는 Fc 영역 내에서의 아미노산 치환의 상이한 조합을 함유하는 항체 변이체에서 시험하였다. 최대 5개의 아미노산 치환이 도입되었는데, 이는 돌연변이 N297Q, L234A, L235A, L234F, L235E, D265A, 및 P331S를 포함한다. 이들 5개의 아미노산 위치 중 하나 이상에서의 치환이 K409R 및/또는 F405L IgG1 백본 내에 도입되었다. huCLB-T3/4 항체의 다음 Fc 영역 변이체가 생성되었다: N297Q (N297Q 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-N297Q로 일컬어짐), LFLE (L234F/L235E 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LFLE로 일컬어짐), LALA (L234A/L235A 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LALA로 일컬어짐), LFLENQ (L234F/L235E/N297Q 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ로 일컬어짐), LFLEDA (L234F/L235E/D265A 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA로 일컬어짐), DA (D265A 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-DA로 일컬어짐), DAPS (D265A/P331S 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-DAPS로 일컬어짐), DANQ (D265A/N297Q 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-DANQ로 일컬어짐), LFLEPS (L234F/L235E/P331S 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS로 일컬어짐), 및 LFLEDANQPS

(L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S 치환을 지칭하는데; IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS로 일컬어짐).

[0463] 특히, IgG1-huCD3 항체 변이체에서는, 돌연변이 L234F, L235E 및 D265A를 포함하고 LFLEDA 또는 FEA로서 지칭된, 3개의 아미노산 치환의 조합이 K409R 및 F405L IgG1 백본 내에 도입되어 불활성화 Fc 영역을 수반한 항체가 생성되었다. 이로써 생성되는 불활성화 항체 변이체는 각각 접미사 "FEAR" 또는 "FEAL"을 수반하여 일컬어진다.

[0464] 한 측면에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 발현 수준 및/또는 생산 수율을 증가시키기 위해 경쇄 및/또는 중쇄에서 변형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 경쇄에서 변형될 수 있다. 이러한 변형은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Zheng, L., Goddard, J.-P., Baumann, U., & Reymond, J.-L. (2004). Expression improvement and mechanistic study of the retro-Diels-Alderase catalytic antibody 10F11 by site-directed mutagenesis. Journal of Molecular Biology, 341(3), 807-14]에 기재된 방법에 따라서 수행될 수 있다.

[0465] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 중쇄 및 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41에 상응하는 위치 내의 아미노산은 T가 아니다.

[0466] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41에 상응하는 위치 내의 아미노산은 H, I, K, L, Q, R 및 V로부터 선택된다.

[0467] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41에 상응하는 위치 내의 아미노산은 H, K 또는 R이다.

[0468] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41에 상응하는 위치 내의 아미노산은 K이다.

[0469] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 F가 아니고, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41, K55, 및 L97에 상응하는 아미노산 위치 중 하나 이상은 각각 T, K 및 L이 아니다.

[0470] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 F, T, K 및 L이 아니다.

[0471] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 L, K, N, 및 H이다.

[0472] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 R23 및 A35에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 R 및 A가 아니다.

[0473] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 R23 및 A35에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 A 및 P이다.

[0474] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, R23, A35, R47, D71, A82, D83, S86, I87, 및 F89에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 F, R, A, R, D, A, D, S, I, 및 F가 아니다.

[0475] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, R23, A35, R47, D71, A82, D83, S86, I87, 및 F89에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 L, A, P, T, G, P, E, A, E, 및 Y이다.

[0476] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서,

[0477] (i) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 F가 아니거나, 또는

[0478] (ii) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 K가 아니거나,

또는

[0479] (iii) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 F가 아니고, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 K가 아니다.

[0480] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서,

[0481] (i) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 L이거나, 또는

[0482] (ii) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 N이거나, 또는

[0483] (iii) 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 L이고, 제1 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 N이다.

[0484] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 위치 T41에 상응하는 위치 내의 아미노산은 H, I, K, L, Q, R 또는 V로부터 선택되고, 예컨대 H, K 및 R로부터 선택되고, 예컨대 K이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치 내에 아미노산 L, K, N, 및 H를 각각 갖는 제1 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 위치 R23에 상응하는 위치 내의 아미노산은 A, G, H, K, Q, S, 및 T로부터 선택되고, 예컨대 A 및 G로부터 선택되며, A35에 상응하는 위치 내의 아미노산은 I, L, M, P, V, G, F 및 W로부터 선택되고, 예컨대 I, L, M, P, 및 V로부터 선택된다.

[0485] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 위치 R23에 상응하는 위치 내의 아미노산은 A 또는 G, 예컨대 A이고, 위치 A35에 상응하는 위치 내의 아미노산은 P이다.

[0486] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, R23, A35, R47, D71, A82, D83, S86, I87, 및 F89에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 F, R, A, R, D, A, D, S, I, 및 F가 아니다.

[0487] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 위치 R23에 상응하는 위치 내의 아미노산은 A, G, H, K, Q, S, 및 T로부터 선택되고, 예컨대 A 및 G로부터 선택되며, 위치 A35에 상응하는 위치 내의 아미노산은 I, L, M, P, V, G, F 및 W로부터 선택되고, 예컨대 I, L, M, P로부터 선택되며, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, R47, D71, A82, D83, S86, I87, 및 F89에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 L, T, G, P, E, A, E, 및 Y이다.

[0488] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 위치 R23에 상응하는 위치 내의 아미노산은 A 또는 G이고, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, A35, R47, D71, A82, D83, S86, I87, 및 F89에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 L, P, T, G, P, E, A, E, 및 Y이다.

[0489] 한 측면에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 항체의 친화성을 증가시키기 위해 제1 및/또는 제2 경쇄에서 변형될 수 있다.

[0490] 한 측면에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 항체의 친화성을 저하시키기 위해 제1 및/또는 제2 결합성 아암의 경쇄에서 변형될 수 있다. 이는 일부 환경에서 유리할 수 있고, 효능 증가를 초래할 수 있다. 특히, 제1 결합성 아암 [인간 CD3ε (엡실론)과 결합함]의 낮은 친화성은 순환 중인 T 세포 및 종양 부위에서의 T 세포의 운동성에 영향을 주므로, T 세포와 종양 세포의 더 양호한 결합을 초래할 수 있다 (문헌 [Mølhøj et al., Molecular Immunology 44 (2007)] 참조). 특히, 이는 이중특이적 포맷에 유용할 수 있는데, CD3 항체가 결합성 아암 중 하나로서 사용된다. 항체 친화성 저하를 초래하는 변형은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Webster et al. Int J Cancer Suppl. 1988;3:13-6] 참조).

[0491] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서

[0492] (i) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 F가 아니거나, 또는

[0493] (ii) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 K가 아니거나, 또는

[0494] (iii) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 F가 아니고, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 K가 아니다.

[0495] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 항체는 불변 경쇄 (LC)를 포함하는데, 여기서

[0496] (i) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 L이거나, 또는

[0497] (ii) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 N이거나, 또는

[0498] (iii) 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10에 상응하는 위치 내의 아미노산은 L이고, 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 K55에 상응하는 위치 내의 아미노산은 N이다.

[0499] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 경쇄를 포함하는데, 여기서 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 F, T, K 및 L이 아니다. 이러한 변형은 발현 수준을 증가시키면서 친화성을 저하시키는 작용을 한다.

[0500] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 제1 경쇄를 포함하는데, 여기서 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치 내의 아미노산은 각각 L, K, N, 및 H이다. 이러한 변형은 발현 수준을 증가시키면서 친화성을 저하시키는 작용을 한다.

[0501] 본 발명의 추가 측면에서, huCD3의 CDR 영역 내의 돌연변이는, 예컨대 CD3 결합성 아암의 결합 친화성을 저하시키기 위해, CD3 결합성 아암의 결합 친화성을 최적화하도록 만들었다.

[0502] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체의 CD3 결합성 아암은 하기 표 2에 제시된 CDR 서열로부터 선택된 6개의 CDR 서열을 포함한다.

[0503] <표 2>

VH CDR1 (SEQ ID NO)	VH CDR2 (SEQ ID NO)	VH CDR3 (SEQ ID NO)	VL CDR1 (SEQ ID NO)	VL CDR2	VL CDR3 (SEQ ID NO)
72	2	3	4	GTN	5
72	2	3	81	GTN	5
72	2	3	4	GTN	82
72	2	3	4	GTN	83
73	2	3	4	GTN	5
73	2	3	81	GTN	5
73	2	3	4	GTN	82
73	2	3	4	GTN	83
74	2	3	4	GTN	5
74	2	3	81	GTN	5
74	2	3	4	GTN	82
74	2	3	4	GTN	83
1	75	3	4	GTN	5
1	75	3	81	GTN	5
1	75	3	4	GTN	82
1	75	3	4	GTN	83
1	76	3	4	GTN	5
1	76	3	81	GTN	5
1	76	3	4	GTN	82
1	76	3	4	GTN	83
1	2	77	4	GTN	5
1	2	77	81	GTN	5
1	2	77	4	GTN	82
1	2	77	4	GTN	83
1	2	78	4	GTN	5

[0504]

1	2	78	81	GTN	5
1	2	78	4	GTN	82
1	2	78	4	GTN	83
1	2	79	4	GTN	5
1	2	79	81	GTN	5
1	2	79	4	GTN	82
1	2	79	4	GTN	83
1	2	80	4	GTN	5
1	2	80	81	GTN	5
1	2	80	4	GTN	82
1	2	80	4	GTN	83
1	2	3	81	GTN	5
1	2	3	4	GTN	82
1	2	3	4	GTN	83

[0505]

[0506] 한 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 VH 및 VL 프레임워크 서열 VH1, VH2, VH3 및 VH4, 및 VL1, VL2, 및 VL3 중 어느 하나에 각각 삽입되어, huCD3의 CDR 서열을 대체할 수 있다. 한 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입된다.

[0507] 추가 실시양태에서, CD3 결합성 아암은 표 2로부터 선택된 6개의 CDR 서열을 포함하는데, 여기서

[0508] 서열식별번호: 72의 X_1은 V, H, F, T, P, L, Q, D, K, W, G, A, C 및 R로부터 선택되고;

[0509] 서열식별번호: 73의 X_2는 N, A, H, Q, P, F, M, Y, L, W, D, E 및 C로부터 선택되며;

[0510] 서열식별번호: 75의 X_4는 Y, Q, W, L, A, I, M, D, T, K, R, G, F, E, V, C 및 P로부터 선택되고;

[0511] 서열식별번호: 76의 X_5는 N, L, Y, W, H, M, G, F, K, S, V, R, Q, D, C, E 및 P로부터 선택되며;

[0512] 서열식별번호: 81의 X_{10}은 A, G, R, V, F, E, M, H, N, Y, P, Q, D, K 및 L로부터 선택되고;

[0513] 서열식별번호: 83의 X_{12}는 D, K, Q, G, V, E, T, N, Y, S, P, W, F 및 M으로부터 선택된다.

[0514] 이러한 huCD3 CDR 변이체 서열은 huCD3 야생형 CDR 서열과 비교해서 저하된 결합 친화성을 갖는다. 6개의 CDR 서열은 huCD3 VH 및 VL 프레임워크 서열 VH1, VH2, VH3 및 VH4, 및 VL1, VL2, 및 VL3 중 임의의 것에 각각 삽입되어, huCD3의 CDR 서열을 대체할 수 있다. 한 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입된다. 추가 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입되었는데, 여기서 VL1 (서열식별번호: 10)의 위치 41 내의 아미노산 T가 K로 돌연변이되었다.

[0515] 추가 실시양태에서, CD3 결합성 아암은 표 2로부터 선택된 6개의 CDR 서열을 포함하는데, 여기서

[0516] 서열식별번호: 72의 X_1은 L, P, Q, D, K, W, S, G, A, C 및 R로부터 선택되고;

[0517] 서열식별번호: 73의 X_2는 S, N, G, A,K, V, R, H, Q, P, I, F, M, Y, L, W, D, E 및 C로부터 선택되며;

[0518] 서열식별번호: 74의 X_3은 M, W, G, Q, V, T, S, L, P, I, A, K, R 및 C로부터 선택되고;

[0519] 서열식별번호: 75의 X_4는 W, L, A, I, M, D, T, K, R, G, F, E, V, C 및 P로부터 선택되며;

[0520] 서열식별번호: 76의 X_5는 C, E, P 및 T로부터 선택되고:

[0521] 서열식별번호: 77의 X_6은 A, S, V, N, K, L, T, I, P, Q, C, G, Y, W, F, 및 R로부터 선택되며;

[0522] 서열식별번호: 78의 X_7은 P, C, S, 및 T로부터 선택되고;

[0523] 서열식별번호: 79의 X_8은 A, T, G, L, N, C, P, F, Q, H, R, K, E, W, 및 Y로부터 선택되며;

[0524] 서열식별번호: 80의 X_9는 P, L, T, C, A, I, L, Q, V, E, M, K, R, G 및 P로부터 선택되고;

[0525] 서열식별번호: 81의 X_{10}은 E, H, I, M, N, Y, P, Q, D, K 및 L로부터 선택되며;

[0526] 서열식별번호: 82의 X_{11}은 F, Y, I, T, V, M, A, S, N, G, W, E, K, P, R 및 D로부터 선택되고;

[0527] 서열식별번호: 83의 X_{12}는 G, Y, V, N, T, S, H, E, P, W, F 및 M으로부터 선택된다.

[0528] 이러한 HuCD3 CDR 변이체 서열은 huCD3 야생형 CDR 서열과 비교해서 저하된 결합 친화성을 갖는다. 6개의 CDR 서열은 huCD3 VH 및 VL 프레임워크 서열 VH1, VH2, VH3 및 VH4, 및 VL1, VL2, 및 VL3 중 임의의 것에 각각 삽입되어, huCD3의 CDR 서열을 대체할 수 있다. 한 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입된다. 추가 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입되었는데, 여기서 VL1 (서열식별번호: 10)의 위치 41 내의 아미노산 T가 K로 돌연변이되었다.

[0529] 또한 추가 실시양태에서, CD3 결합성 아암은 하기 표 3에 제시된 CDR 서열로부터 선택된 6개의 CDR 서열을 포함하는데, 여기서

[0530] 서열식별번호: 73의 X_2는 M 및 P로부터 선택되고;

[0531] 서열식별번호: 74의 X_3은 A이며;

[0532] 서열식별번호: 75의 X_4는 E이고;

[0533] 서열식별번호: 77의 X_6은 F, G, I, K, L, 및 N으로부터 선택되며;

[0534] 서열식별번호: 78의 X_7은 P이고;

[0535] 서열식별번호: 79의 X_8은 A 및 G로부터 선택되며;

[0536] 서열식별번호: 80의 X_9는 M, R 및 V로부터 선택된다.

[0537] <표 3>

[0538]

VH CDR1 (SEQ ID NO)	VH CDR2 (SEQ ID NO)	VH CDR3 (SEQ ID NO)	VL CDR1 (SEQ ID NO)	VL CDR2	VL CDR3 (SEQ ID NO)
73	2	3	4	GTN	5
74	2	3	4	GTN	5
1	75	3	4	GTN	5
1	2	77	4	GTN	5
1	2	78	4	GTN	5
1	2	79	4	GTN	5
1	2	80	4	GTN	5

[0539] 이러한 HuCD3 CDR 변이체 서열은 huCD3 야생형 CDR 서열과 비교해서 저하된 결합 친화성을 갖는다. 6개의 CDR 서열은 huCD3 VH 및 VL 프레임워크 서열 VH1, VH2, VH3 및 VH4, 및 VL1, VL2, 및 VL3 중 임의의 것에 각각 삽입되어, huCD3의 CDR 서열을 대체할 수 있다. 한 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입된다. 추가 실시양태에서, 6개의 CDR 서열은 huCD3 프레임워크 서열 VH1 및 VL1에 삽입되었는데, 여기서 VL1 (서열식별번호: 10)의 위치 41 내의 아미노산 T가 K로 돌연변이되었다.

[0540] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 추가 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 인간 CD3 엡실론에 대한 결합 친화성 값 (K_D)이, 바이오-층 간섭계에 의해 결정된 바와 같은 $3.4x10^{-8}$ M 초과, 예컨대 바이오-층 간섭계에 의해 결정된 바와 같은 $3.5x10^{-8}$ M 내지 $9.9x10^{-8}$ M, 또는 $1.0x10^{-7}$ M 내지

$9.9x10^{-7}$ M인 CD3 항체로부터 유래된다.

[0541] 본 발명의 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체의 항체 형성 부분 중 하나 또는 둘 다는 이중특이적 항체의 혈청 반감기를 조작하기 위하여 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합을 감소 또는 증가시키도록 조작되었다. 혈청 반감기를 증가 또는 감소시키기 위한 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24]; [Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176:346-56]; 및 [Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28:157-9] 참조).

[0542] 한 측면에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 불변 중쇄 (HC) 및 제1 불변 경쇄 (LC)를 포함하는데, 여기서 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다의 서열식별번호: 15의 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치는 각각 F, E, 및 A이다.

[0543] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 및 제2 불변 중쇄 (HC) 및 제1 및 제2 불변 경쇄 (LC)를 포함하는데, 여기서 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 다의 서열식별번호: 15의 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치는 각각 F 및 E이다.

[0544] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAR로부터 유래된 Fab 아암이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAL로부터 유래된 Fab 아암이다.

[0545] 본원에서, huCD3-H1L1은 표 1에서 서열식별번호: 6 및 10으로서 제시되는 VH1 및 VL1을 갖는 인간화 SP34 항-CD3 항체를 지칭한다. FEAL은 항체의 불변 영역 내의 L234F, L235E 및 D265A 및 F405L 돌연변이를 지칭하는 반면, FEAR은 항체의 불변 영역 내의 L234F, L235E 및 D265A 및 K409R 돌연변이를 지칭하는데, 여기서 아미노산 위치는 인간 IgG1의 아미노산 위치에 상응한다. "IgG1"은 항체 불변 영역이 명시된 돌연변이를 제외한 인간 IgG1로부터 유래된다는 것을 지칭한다. 7D8은 표 1에서 서열식별번호: 27 및 28로서 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는 항-CD20 항체를 지칭한다.

[0546] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체이다.

[0547] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL로부터 유래된 Fab 아암이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAR로부터 유래된 Fab 아암이다.

[0548] 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 제1 결합성 아암은 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체 (즉, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함함)이고, 제2 결합성 아암은 IgG1-7D8-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체 (Fab 아암 및 Fc 아암)이다.

[0549] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 제1 및 제2 불변 중쇄 (HC) 및 제1 및 제2 불변 경쇄 (LC)를 포함하는데, 여기서 제1 불변 중쇄와 제2 불변 중쇄 둘 다의 서열식별번호: 15의 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, 및 D265에 상응하는 위치는 각각 F, E, 및 A이고; 제1 불변 중쇄의 서열식별번호: 15의 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치는 L이며, 제2 불변 중쇄의 서열식별번호: 15의 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치는 R이고; (i) 제1 불변 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 F10, T41, K55, 및 L97에 상응하는 위치는 각각 L, K, N, 및 H이거나, 또는 (ii) 제1 불변 경쇄의 서열식별번호: 10의 람다 경쇄 내의 위치 T41에 상응하는 위치는 K이다.

[0550] *이중특이적 항체의 추가 실시양태*

[0551] 본 발명의 이중특이적 항체는 임의의 이소형의 것일 수 있다. 이소형의 선택은 전형적으로, 목적하는 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 유도에 의해 가이드될 것이다. 예시적인 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 영역인 카파 또는 람다 중 하나를 사용할 수 있다. 본 발명의 항체의 이펙터 기능은 이소형 전환에 의해, 예를 들어 각종 치료 용도를 위하여 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM 항체로 변화될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 Fc-영역 둘 다는 IgG1 이소형의 것, 예를 들어 IgG1,κ이다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체의 두 Fc-영역은 각각 IgG1 및 IgG4 이소형의 것이다. 임의로, Fc-영역은 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같은 힌지 및/또는 CH3 영역에서 변형될 수 있다.

[0552] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 완전한 길이의 항체, 바람직하게 IgG1 항체, 특히 IgG1,κ 항체 또는 그의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 항체 단편 또는 단일 쇄 항체를 포함한다. 항체 단편은, 예를 들어 통상적인 기술을 이용하여 단편화함으로써 수득될 수 있고, 이러한 단편을 대상으로 하여 전체 항체에 대하여 본원에 기재된 바와 동일한 방식으로 그 유용성에 관하여 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편은 항체를 펩신으로 처리함으로써 생성될 수 있다. 이로써 생성되는 $F(ab')_2$ 단편은 환원제, 예컨대 디티오트레이톨로 처리하여 디술피드 브릿지를 환원시켜 Fab' 단편을 생성시킬 수 있다. Fab 단편은 항체를 파파인으로 처리함으로써 수득될 수 있다. $F(ab')_2$ 단편은 또한, 티오에테르 결합 또는 디술피드 결합을 통하여 Fab' 단편을 결합시킴으로써 생성될 수 있다. 항체 단편은 또한, 이러한 단편을 코딩하는 핵산을 재조합 세포에서 발현시킴으로써 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)] 참조). 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편의 특정 부분을 코딩하는 키메라 유전자는 H 쇄의 힌지 영역 및 C_H1 도메인을 코딩하는 DNA 서열을 포함한 다음, 번역 정지 코돈을 포함하여 상기 말단절단된 항체 단편 분자를 산출시킬 수 있었다.

[0553] 본 발명의 이중특이적 CD3xCD20 항체는 또한, 단일 쇄 항체로부터 제조될 수 있다. 단일 쇄 항체는 중쇄 Fv 영역과 경쇄 Fv 영역을 연결시킨 펩티드이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 단일 쇄 Fv (scFv)를 포함하는데, 여기서 본 발명의 CD20 항체의 Fv 내의 중쇄 및 경쇄는 단일 펩티드 쇄 내에서 가요성 펩티드 링커 (전형적으로, 약 10, 12, 15개 또는 그 초과의 아미노산 잔기)와 연결된다. 이러한 항체의 생성 방법이, 예를 들어 US 4,946,778, 문헌 ([Pluckthun in 'The Pharmacology of Monoclonal Antibodies', vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)], [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)], [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 및 [McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990)])에 기재되어 있다. 이어서, 이중특이적 항체는 단일 쇄 CD20 항체 및 단일 쇄 CD3 항체, 또는 2개 초과의 V_H 및 V_L 쇄로부터 형성된 다가 항체로부터의 2개의 V_H 및 V_L로부터 형성될 수 있다.

[0554] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체를 생성하기 위한 CD3 및 CD20 모노클로날 항체의 Fc-영역 중 하나 또는 둘 다가 효과기-기능-결핍성이다.

[0555] *접합체*

[0556] 추가 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 치료 모이어티(moiety), 예컨대 시토카인, 면역억제제, 면역자극성 분자 및/또는 방사성 동위원소와 연결되거나 또는 접합된 이중특이적 CD3xCD20 항체를 제공한다. 이러한 접합체는 본원에서 "면역접합체" 또는 "약물 접합체"로서 지칭된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로서 지칭된다.

[0557] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc-영역은 약물 또는 전구 약물과 접합되거나 또는 이를 위한 수용체 군을 함유한다. 이러한 수용체 군은, 예를 들어 비자연 아미노산일 수 있다.

[0558] *조성물*

[0559] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0560] 추가 측면에서, 본 발명은

[0561] - 본원에 개시된 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 이중특이적 CD3xCD20 항체, 및

[0562] - 제약상 허용되는 담체

[0563] 를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0564] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 하나의 이중특이적 항체 또는 본 발명의 상이한 이중특이적 항체의 조합물을 함유할 수 있다.

[0565] 제약 조성물은 통상적인 기술, 예컨대 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 기술에 따라서 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은, 예를 들어 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세정제 [예를 들어, 비이온성 세정제, 예컨대 트윈(Tween)-20 또는 트윈-80], 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-무함유 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 제약 조성물에 포함되기에 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0566] 제약상 허용되는 담체는 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제, 항산화제 및 흡수 지연제, 및 본 발명의 이중특이적 항체와 생리학적으로 화합성인 기타 물질을 포함한다. 본 발명의 제약 조성물에 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 에탄올, 덱스트로스, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 카르복시메틸 셀룰로스 콜로이드성 용액, 트라가칸트 검 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및/또는 각종 완충제를 포함한다. 제약상 허용되는 담체는 멸균성 수성 용액 또는 분산액, 및 멸균성 주사 가능한 용제 또는 분산제의 즉시 제조를 위한 멸균성 분말을 포함한다. 예를 들어, 코팅 재료, 예컨대 레시틴을 사용하고, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하며, 계면활성제를 사용함으로써, 적당한 유동성을 유지할 수 있다.

[0567] 본 발명의 제약 이중특이적 항체는 또한, 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 소듐 메타비술파이트, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함할 수 있다.

[0568] 본 발명의 제약 이중특이적 항체는 조성물 내에 또한, 등장제, 예컨대 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 포함할 수 있다.

[0569] 본 발명의 제약 이중특이적 항체는 또한, 제약 조성물의 저장 수명 또는 유효성을 증강시킬 수 있는, 선택된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 완충제를 함유할 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체는 이러한 이중특이적 항체가 신속하게 방출되지 못하게 해줄 담체와 함께 제조될 수 있는데, 예컨대 체내 이식제, 경피 패치 및 미세피막화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 담체는 젤라틴, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성의 생체 적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락르산을 단독으로 포함할 수 있거나, 또는 왁스 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 물질과 함께 포함할 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 일반적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0570] 적절한 용매 중의 필요한 양의 활성 화합물을, 예를 들어 필요한 만큼의 상기 열거된 바와 같은 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 혼입시킨 다음, 멸균 미세여과함으로써, 멸균성 주사 가능한 용제를 제조할 수 있다. 일반적으로, 활성 화합물을, 기본 분산 매질 및 예를 들어, 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균성 비히클 내로 혼입시킴으로써 분산제를 제조한다. 멸균성 주사 가능한 용제를 제조하기 위한 멸균성 분말의 경우, 제조 방법의 예는 기존의 멸균-여과된 그의 용액으로부터의 임의의 부가 목적 성분이 활성 성분에 부가된 분말을 산출하는 진공 건조 및 냉동 건조 (동결건조)이다.

[0571] 제약 조성물 중의 활성 성분의 실제적 투여량 수준은 환자에게 독성이 아니면서, 특별한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대하여 목적하는 치료 반응을 달성하는 데 유효한 활성 성분의 양을 수득하도록 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 이용된 본 발명의 특별한 조성물, 또는 그의 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특별한 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 이용된 특별한 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받고 있는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적 건강 및 이전의 병력, 및 의학 분야에 널리 공지된 기타 요인들을 포함한 각종 약동학적 요인에 좌우될 것이다.

[0572] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식에 의해 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구적으로 투여된다. 본원에 사용된 바와 같은 "비경구적으로 투여하는"이란 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 힘줄내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0573] 한 실시양태에서, 상기 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.

[0574] <u>용도</u>

[0575] 한 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체, 본원에 개시된 바와 같은 조성물, 또는 본원에 개시된 바와 같은 제약 조성물에 관한 것이다.

[0576] 한 측면에서, 본 발명은 질환을 치료하는 데에 사용하기 위한, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는

이중특이적 항체, 본원에 개시된 바와 같은 조성물, 또는 본원에 개시된 바와 같은 제약 조성물에 관한 것이다.

[0577] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체, 본원에 개시된 바와 같은 조성물, 또는 본원에 개시된 바와 같은 제약 조성물을, 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이러한 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0578] 한 실시양태에서, 질환은 성숙한 B-세포 악성 종양이다.

[0579] 한 실시양태에서, 질환은 암, 예컨대 NHL 또는 B 세포 백혈병이다.

[0580] 본 발명의 이중특이적 항체는 수많은 목적을 위해 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 이중특이적 항체는 전이성 암 및 불응성 암을 포함한, 각종 형태의 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0581] 특히, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는, CD20을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 치료적 환경에 유용할 수 있고, 특정의 이러한 적응증과 환경에서 일반적인 CD20 항체와 비교해서 더 효율적일 수 있다.

[0582] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한, 각종 CD20 관련 질환의 요법 및 진단에 있어 부가의 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이중특이적 항체를 사용하여 다음 생물학적 활성 중 하나 이상을 생체내 또는 시험관 내에서 유발시킬 수 있다: CD20을 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 활성; CD20을 발현하는 세포를 사멸시키는 활성; 인간 이펙터 세포의 존재하에 CD20을 발현하는 세포의 포식작용 또는 ADCC를 매개하는 활성; 보체의 존재하에 CD20을 발현하는 세포의 CDC를 매개하는 활성; CD20을 발현하는 세포의 아폽토시스(apoptosis)를 매개하는 활성; 및/또는 CD20 결합시 지질 래프트 내로의 전위를 유도시키는 활성.

[0583] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체를 사용하여 T 세포-매개된 면역 반응, 염증 및 미세환경 리모델링을 수행할 수 있다.

[0584] 특별한 실시양태에서, 이중특이적 항체를 생체 내에서 사용하여 각종 CD20 관련 질환을 치료, 예방 또는 진단한다. CD20 관련 질환의 예는 특히, B 세포 림프종, 예를 들어, 비-호지킨 림프종 (NHL), B 세포 백혈병 및 면역 질환, 예를 들어, 자가면역 질환, 예컨대 다음에 열거된 것을 포함한다.

[0585] 한 실시양태에서 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 NHL 또는 B 세포 백혈병의 치료를 위해 사용된다.

[0586] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 CD20 항체-저항성 NHL 또는 B 세포 백혈병, 예컨대 리툭시맙- 또는 오파투무맙-저항성 NHL 또는 B 세포 백혈병, 예를 들어 리툭시맙-저항성 비-침습성 B-세포 림프종의 치료를 위해 사용된다.

[0587] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 예컨대 재발성 또는 불응성 ALL의 치료를 위해 사용된다.

[0588] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 CLL, 예컨대 재발성 또는 불응성 CLL의 치료를 위해 사용된다.

[0589] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 FL, 예컨대 재발성 또는 불응성 FL의 치료를 위해 사용된다.

[0590] 한 실시양태에서, 본 발명에 따르는 이중특이적 항체는 성체 등급 III 림프종모양 육아종증; 성체 비강 유형 림프절외성 NK/T-세포 림프종; 역형성 대형 세포 림프종; 혈관면역모세포성 T-세포 림프종; 접촉성 병기 II 성체 버킷(Burkitt) 림프종; 접촉성 병기 II 성체 확산성 대형 세포 림프종; 접촉성 병기 II 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 접촉성 병기 II 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 접촉성 병기 II 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 접촉성 병기 II 성체 림프모구성 림프종; 접촉성 병기 II 등급 1 여포성 림프종; 접촉성 병기 II 등급 2 여포성 림프종; 접촉성 병기 II 등급 3 여포성 림프종; 접촉성 병기 II 외투 세포 림프종; 접촉성 병기 II 번연부 림프종; 접촉성 병기 II 소형 림프구성 림프종; 피부 B-세포 비-호지킨 림프종; 엡스타인 바(Epstein-Barr) 바이러스 감염; 점막 관련 림프성 조직의 림프절외성 번연부 B-세포 림프종; 간비장 T-세포 림프종; 안내 림프종; 결절성 번연부 B-세포 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 버킷 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 확산성 대형 세포 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 비접촉성 병기 II 성체 림프모구성 림프종; 비접촉성 병기 II 등급 1 여포성 림프종; 비접촉성 병기 II 등급 2 여포성 림프종; 비접촉성 병기 II 등급 3 여포성 림프종; 비접촉성 병기 II 외투 세포 림프종; 비접촉성 병기 II 번연부 림프종; 비접촉성 병기 II 소

형 림프구성 림프종; 비-피부 림프절외성 림프종; 말초 T-세포 림프종; 이식 후 림프증식성 장애; 진행성 모발 세포 백혈병, 초기 치료; 재발성 성체 버킷 림프종; 재발성 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 재발성 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 재발성 성체 등급 III 림프종모양 육아종증; 재발성 성체 호지킨 림프종; 재발성 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 재발성 성체 림프모구성 림프종; 재발성 성체 T-세포 백혈병/림프종; 재발성 피부 T-세포 비-호지킨 림프종; 재발성 등급 1 여포성 림프종; 재발성 등급 2 여포성 림프종; 재발성 등급 3 여포성 림프종; 재발성 외투 세포 림프종; 재발성 번연부 림프종; 재발성 균상 식육종(Mycosis Fungoides)/세자리(Sezary) 증후군; 재발성 소형 림프구성 림프종; 불응성 모발 세포 백혈병; 소장 림프종; 비장 번연부 림프종; 병기 I 성체 버킷 림프종; 병기 I 성체 확산성 대형 세포 림프종; 병기 I 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 병기 I 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 병기 I 성체 호지킨 림프종; 병기 I 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 병기 I 성체 림프모구성 림프종; 병기 I 성체 T-세포 백혈병/림프종; 병기 I 피부 T-세포 비-호지킨 림프종; 병기 I 등급 1 여포성 림프종; 병기 I 등급 2 여포성 림프종; 병기 I 등급 3 여포성 림프종; 병기 I 외투 세포 림프종; 병기 I 번연부 림프종; 병기 I 소형 림프구성 림프종; 병기 IA 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 IB 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 II 성체 호지킨 림프종; 병기 II 성체 T-세포 백혈병/림프종; 병기 II 피부 T-세포 비-호지킨 림프종; 병기 IIA 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 IIB 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 III 성체 버킷 림프종; 병기 III 성체 확산성 대형 세포 림프종; 병기 III 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 병기 III 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 병기 III 성체 호지킨 림프종; 병기 III 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 병기 III 성체 림프모구성 림프종; 병기 III 성체 T-세포 백혈병/림프종; 병기 III 피부 T-세포 비-호지킨 림프종; 병기 III 등급 1 여포성 림프종; 병기 III 등급 2 여포성 림프종; 병기 III 등급 3 여포성 림프종; 병기 III 외투 세포 림프종; 병기 III 번연부 림프종; 병기 III 소형 림프구성 림프종; 병기 IIIA 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 IIIB 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 IV 성체 버킷 림프종; 병기 IV 성체 확산성 대형 세포 림프종; 병기 IV 성체 확산성 혼합 세포 림프종; 병기 IV 성체 확산성 소형 절단된 세포 림프종; 병기 IV 성체 호지킨 림프종; 병기 IV 성체 면역모세포성 대형 세포 림프종; 병기 IV 성체 림프모구성 림프종; 병기 IV 성체 T-세포 백혈병/림프종; 병기 IV 피부 T-세포 비-호지킨 림프종; 병기 IV 등급 1 여포성 림프종; 병기 IV 등급 2 여포성 림프종; 병기 IV 등급 3 여포성 림프종; 병기 IV 외투 세포 림프종; 병기 IV 번연부 림프종; 병기 IV 소형 림프구성 림프종; 병기 IVA 균상 식육종/세자리 증후군; 병기 IVB 균상 식육종/세자리 증후군; T-세포 대형 과립상 림프구 백혈병; 고환 림프종; 미처리된 모발 세포 백혈병; 또는 발덴스트롬 매크로글로불린혈증의 치료를 위해 사용된다.

[0591] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 NHL을 치료하거나 또는 예방하기 위해 사용되는데, 이는 상기 항체가 CD20 보유 종양 세포를 고갈시키기 때문이다.

[0592] NHL는 특정 유형의 B 세포 림프종이다. 림프종, 예를 들어, B 세포 림프종은 림프구 (혈액 세포)가 악성으로 될때 발생하는 관련 암의 군이다. 림프구의 정상적인 기능은 침략자, 즉 병균, 바이러스, 진균, 심지어 암에 대항하여 신체를 방어하는 것이다. 많은 하위유형 및 성숙 단계의 림프구가 있으므로, 많은 종류의 림프종이 있다. 정상 세포와 마찬가지로, 악성 림프구도 신체의 여러 부위로 이동할 수 있다. 전형적으로, 림프종 세포는 림프계: 골수, 림프절, 비장, 및 혈액에서 종양을 형성한다. 그러나, 이들 세포는 다른 기관으로 이동할 수 있다. 특정 유형의 림프종은 세포의 정상적인 버전이 있는 위치에서 성장하는 경향이 있을 것이다. 예를 들어, 여포성 NHL 종양이 림프절에서 발생하는 것이 통상적이다.

[0593] CD20은 통상적으로, NHL과 연관된 신생물성 (즉, 종양발생성) B 세포 상에 상승된 수준으로 발현된다. 따라서, 본 발명의 CD20 결합성 항체를 사용하여, NHL을 초래하는 CD20 보유 종양 세포를 고갈시킬 수 있으므로, 상기 항체를 사용하여 이러한 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0594] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한, CD20의 다른 효과를 차단 또는 억제하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, CD20이 B 림프구 상에 발현되고 이들 세포의 증식 및/또는 분화에 관여하는 것으로 공지되어 있다. B 림프구는 면역조정제로서 기능하기 때문에, CD20은 자가면역 장애에 관여한 B 림프구를 표적으로 하기 위한, 예를 들어 B 림프구를 불활성화 또는 사멸시키기 위한 항체 매개된 요법에 중요한 표적이다. 이러한 자가면역 장애는, 예를 들어 상기 열거된 질환을 포함한다.

[0595] 유사하게, 본 발명은 CD20을 발현하는 종양 세포의 사멸을 필요로 하는 개체에게, 본 발명의 이중특이적 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 CD20을 발현하는 종양 세포의 사멸 방법에 관한 것이다.

[0596] 본 발명은 또한, CD20을 발현하는 하나 이상의 종양 세포의 성장 및/또는 증식의 억제를 필요로 하는 개체에게 본 발명의 이중특이적 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 CD20을 발현하는 하나 이상의 종양 세포의 성장 및

/또는 증식의 억제 방법에 관한 것이다.

[0597] 본 발명은 또한,

[0598] a) CD20을 발현하는 종양 세포를 포함하는 암으로 인해 고통받고 있는 대상체를 선택하는 단계, 및

[0599] b) 상기 대상체에게 본 발명의 이중특이적 항체 또는 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계

[0600] 를 포함하는, 암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0601] 또한, 본 발명은 암, 예컨대 본원에 언급된 구체적 암 적응증 중 하나의 치료를 위한 의약을 제조하기 위한, 인간 CD3 및 인간 CD20과 결합하는 이중특이적 항체의 용도에 관한 것이다.

[0602] 본 발명은 추가로, 암, 예컨대 상기 언급된 암 적응증 중 하나의 치료에 사용하기 위한 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0603] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 성숙한 B-세포 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 CD20을 발현하는 종양의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 B 세포 림프종의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 B 세포 림프종, 예컨대 NHL의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 것이다. 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 B 세포 만성 림프구성 백혈병 (CLL)의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0604] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 소형 림프구성 림프종 (SLL)의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0605] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 B 세포 전림프구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0606] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 림프혈장세포모양 림프종의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0607] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 외투 세포 림프종 (MCL)의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0608] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 여포성 림프종 (FL) (저 악성도, 중간 악성도 및 고 악성도 FL 포함)의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0609] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 B 세포 호지킨 림프종의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0610] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 CD20 발현성 B 세포가 관여하는 면역 장애의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0611] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 건선의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0612] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 경화증의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0613] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 염증성 장 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0614] 상기 언급된 용도에 대하여, 항체가 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR인 것이 바람직하지만, 이는 본원에 개시된 이중특이적 CD3xCD20 항체 중 임의의 것일 수 있다.

[0615] 본 발명의 이중특이적 항체는 CD20을 발현하는 세포와 관련된 장애의 진단 및 치료를 포함한 수많은 시험관내 및 생체내 진단 및 치료적 유용성을 갖는다. 예를 들어, 상기 항체는, 예를 들어 시험관내 또는 생체 외에서 배양 중인 세포, 또는 인간 대상체, 예를 들어 생체내에 투여하여, 각종 장애를 치료, 예방 및 진단할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 CD3 및 CD20에 대한 이중특이적 항체에 반응하는 인간 및 비-인간 동물을 포함하고자 한다. 바람직한 대상체는 B 세포 (정상 또는 악성)를 억제하거나 또는 제어함으로써 정정 또는 완화될 수 있는 장애가 있는 인간 환자를 포함한다.

[0616] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다.

[0617] 한 실시양태에서, 이러한 진단 조성물은 이중특이적 항체를 이용한 치료로부터 이득을 보게될 환자를 스크리닝하고 선별하기 위해 사용되는 동반 진단이다.

[0618] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 종양발생성 장애, 예를 들어, CD20을 발현하는 종양 세포의 존재를 특징으로 하는 장애, 예를 들어 B 세포 림프종, 예를 들어, NHL이 있는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 치료 및/또는 예방될 수 있는 종양발생성 질환의 예는 B 세포 림프종, 예를 들어, NHL, 예를 들어 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병/림프종 및 성숙한 B 세포 신생물, 예컨대 B 세포 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소

형 림프구성 림프종 (SLL), B 세포 전림프구성 백혈병, 림프혈장세포모양 림프종, 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL) (저 악성도, 중간 악성도 및 고 악성도 FL 포함), 피부 난포 중심 림프종, 변연부 B 세포 림프종 (MALT 유형, 결절성 및 비장 유형), 모발 세포 백혈병, 확산성 대형 B 세포 림프종 (DLBCL), 버킷 림프종, 형질세포종, 혈장 세포 골수종, 이식 후 림프증식성 장애, 발덴스트롬 매크로글로불린혈증, 악성 흑색종 및 역형성 대형 세포 림프종 (ALCL)을 포함한다.

[0619] B 세포 비-호지킨 림프종의 추가 예는 림프종모양 육아종증, 원발성 삼출 림프종, 혈관내 대형 B 세포 림프종, 종격 대형 B 세포 림프종, 중쇄 질환 (γ, μ, 및 α 질환 포함), 면역억제제를 이용한 요법에 의해 유도된 림프종, 예컨대 시클로스포린-유도된 림프종, 및 메토트렉세이트-유도된 림프종이다.

[0620] 추가 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 B 세포 호지킨 림프종을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0621] 치료 및/또는 예방될 수 있는, CD20 발현성 B 세포와 관련된 면역 장애의 예는 자가면역 장애, 예컨대 건선, 건선성 관절염, 피부염, 전신성 피부 경화증 및 경화증, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 결장염, 호흡 곤란 증후군, 수막염, 뇌염 [만성 피로 증후군/근통성 뇌척수염 (CFS/ME) 및 만성 피로 증후군/근통성 뇌척수염 (CFS/ME) 포함], 포도막염, 사구체신염, 습진, 천식, 아테롬성 경화증, 백혈구 부착 결핍증, 다발성 경화증, 레이노이드(Reynaud) 증후군, 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 유년성 발병 당뇨병, 라이터병(Reiter's disease), 베체트병(Behcet disease), 면역 복합 신염, IgA 신병증, IgM 다발신경병증, 면역 매개된 혈소판감소증, 예컨대 급성 특발성 혈소판감소성 자반증 및 만성 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 중증 근무력증, 루푸스 신염, 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염 (RA), 아토피성 피부염, 천포창, 그레이브병(Graves' disease), 하시모토(Hashimoto) 갑상선염, 베게너(Wegener) 육아종증, 오멘(Omenn) 증후군, 만성 신부전증, 급성 감염성 단핵구증, HIV, 및 헤르페스 바이러스 관련 질환을 포함한다. 추가 예는 중증의 급성 호흡 곤란 증후군 및 맥락 망막염이다. 더욱이, 다른 질환 및 장애는 B-세포를 바이러스, 예컨대 엡스타인 바 바이러스 (EBV)로 감염시킴으로써 유발되거나 또는 매개되는 질환 및 장애를 포함한다.

[0622] 자기항체 및/또는 과도한 B 림프구 활성이 두드러지고 치료 및/또는 예방될 수 있는 염증성, 면역 및/또는 자가면역 장애의 추가 예는 다음을 포함한다:

[0623] *혈관염 및 다른 혈관 장애*, 예컨대 현미경적 다발성 혈관염, 추르크-스트라우쓰(Churg-Strauss) 증후군, 및 다른 ANCA-관련 혈관염, 결절성 다발성 동맥염, 본태성 한랭글로불린혈증성 혈관염, 피부 백혈구파괴성 혈관염, 가와사키병(Kawasaki disease), 타카야수(Takayasu) 동맥염, 거대 세포 관절염, 헤노흐-쉔라인(Henoch-Schonlein) 자반증, 원발성 또는 단리된 뇌성 혈관염, 결절성 홍반, 폐색성 혈전혈관염, 혈전성 혈소판감소성 자반증 (용혈성 요독 증후군 포함), 및 피부 백혈구파괴성 혈관염을 포함한 이차 혈관염 (예를 들어, B형 간염, C형 간염, 발덴스트롬 매크로글로불린혈증, B-세포 신생물, 류마티스성 관절염, 쇼그렌 증후군, 또는 전신성 홍반성 루푸스에 대해 이차적임); 추가 예는 결절성 홍반, 알레르기성 혈관염, 지방층염, 웨버-크리스찬병(Weber-Christian disease), 고글로불린혈증성 자반증, 및 버거병(Buerger's disease)이다;

[0624] *피부 장애*, 예컨대 접촉성 피부염, 선형 IgA 피부병, 백반증, 괴저 농피증, 후천성 수포성 표피박리증, 심상성 천포창 (흉터성 유사천포창 및 수포성 유사천포창 포함), 원형 탈모증 (전신 탈모증 및 전체 탈모증 포함), 포진성 피부염, 다형 홍반, 및 만성 자가면역성 두드러기 (혈관신경성 부종 및 두드러기성 혈관염 포함);

[0625] *면역-매개된 혈구감소증*, 예컨대 자가면역성 호중구감소증, 및 진성 적혈구 무형성증;

[0626] *결합 조직 장애*, 예컨대 CNS 루푸스, 원판상 홍반성 루푸스, CREST 증후군, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 근염/피부근염, 봉입체 근염, 이차 아밀로이드증, 한랭글로불린혈증 유형 I 및 유형 II, 섬유근육통, 인지질 항체 증후군, 이차 혈우병, 재발성 다발연골염, 사르코이드증, 근육강직 증후군, 및 류마티스성 열; 추가 예는 호산구성 근막염, 근염, 및 유년성 피부근염이다;

[0627] *관절성피진*, 예컨대 강직성 척추염, 유년성 만성 관절염, 성인 스틸병(Still's disease), 및 SAPHO 증후군; 추가 예는 천장 관절염, 반응성 관절염, 스틸병, 및 통풍이다;

[0628] *혈액학적 장애*, 예컨대 재생불량성 빈혈, 원발성 용혈성 빈혈 (저온 응집소 증후군 포함), CLL 또는 전신성 홍반성 루푸스에 대한 이차적 용혈성 빈혈; POEMS 증후군, 악성 빈혈, 및 발덴스트롬 고글로불린혈증성 자반증; 추가 예는 과립구결핍증, 자가면역성 호중구감소증, 프랭클린병(Franklin's disease), 셀리그만병(Seligmann's disease), μ-쇄 질환, 흉선종 및 림프종에 대한 이차적 부신생물성 증후군, 및 인자 VIII 억제제 형성이다;

[0629] *내분비병증*, 예컨대 다발성 내분비병증, 및 애디송병(Addison's disease); 추가 예는 자가면역성 저혈당증, 자

가면역성 갑상선 기능저하증, 자가면역성 인슐린 증후군, 드 쿠르베인(de Quervain's) 갑상선염, 및 인슐린 수용체 항체-매개된 인슐린 저항성이다;

[0630] *간-위장 장애*, 예컨대 셀리악병(celiac disease), 휘플병(Whipple's disease), 원발성 담즙성 간경변, 만성 활동성 간염, 및 원발성 경화성 담관염; 추가 예는 자가면역성 위염이다;

[0631] *신증*, 예컨대 급속 진행성 사구체신염, 연쇄상구균 감염후 신염, 구드패스츄어(Goodpasture's) 증후군, 막성 사구체신염, 및 한랭글로불린혈증성 신염; 추가 예는 미소 변화형 질환이다;

[0632] *신경학적 장애*, 예컨대 자가면역성 신경병증, 다발성 단신경염, 람버트-이튼(Lambert-Eaton's) 근무력증 증후군, 시드남(Sydenham's) 무도병, 척수 매독, 및 길랑-바레(Guillain-Barre's) 증후군; 추가 예는 골수증/열대성 경직 하반신마비, 중증 근무력증, 급성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 및 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증이다;

[0633] *심장 및 폐 장애*, 예컨대 섬유화 폐포염, 폐쇄성 세기관지염, 알레르기성 아스페르길루스증, 낭포성 섬유증, 로플러(Loffler's) 증후군, 심근염, 및 심막염; 추가 예는 과민성 폐렴, 및 폐암에 대한 이차적 부신생물성 증후군;

[0634] *알레르기성 장애*, 예컨대 기관지 천식 및 고-IgE 증후군; 추가 예는 일과성 흑내장이다;

[0635] *안과학적 장애*, 예컨대 특발성 맥락망막염;

[0636] *감염성 질환*, 예컨대 파르보바이러스 B 감염 [핸즈 앤 삭스(hands-and-socks) 증후군 포함]; 및

[0637] *부인과-산과 장애*, 예컨대 재발성 유산, 재발성 태아 사망, 및 자궁내 성장 지연; 추가 예는 부인과 신생물에 대한 이차적 부신생물성 증후군이다;

[0638] *남성 생식기 장애*, 예컨대 고환 신생물에 대한 이차적 부신생물성 증후군; 및

[0639] *이식 유래 장애*, 예컨대 동종이식편 및 이종이식편 거부, 및 이식편 대 숙주 질환 (만성 이식편 대 숙주 질환 포함).

[0640] 한 실시양태에서, 상기 질환은 궤양성 결장염, 크론병, 유년성 발병 당뇨병, 다발성 경화증, 면역 매개된 혈소판감소증, 예컨대 급성 특발성 혈소판감소성 자반증 및 만성 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈 (자가면역성 용혈성 빈혈 포함), 중증 근무력증, 전신성 경화증, 및 심상성 천포창으로부터 선택된 염증성, 면역 및/또는 자가면역 장애이다.

[0641] 본 발명의 치료 방법의 추가 실시양태에서, 치료 효능은 관련된 종양 세포 상에서의 종양 조직량 또는 CD20 발현 수준을 결정함으로써, 요법 동안, 예를 들어 미리 규정된 시간에 모니터링된다.

[0642] 상기 치료 방법 및 용도에 있어서의 투여량 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 거환을 투여할 수 있거나, 수 회분 용량으로 나누어 일정 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나 또는 용량은 치료 상황의 긴급성에 따라 비례하여 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해서는 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제제화할 수 있다.

[0643] 이중특이적 항체에 대하여 효율적인 투여량 및 투여량 요법은 치료하고자 하는 질환 또는 병태에 좌우되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 화합물의 치료상 유효량에 대한 예시적인 비제한적 범위는 약 0.001 내지 10 mg/kg, 예컨대 약 0.001 내지 5 mg/kg, 예를 들어 약 0.001 내지 2 mg/kg, 예컨대 약 0.001 내지 1 mg/kg, 예를 들어 약 0.001, 약 0.01, 약 0.1, 약 1 또는 약 10 mg/kg이다. 본 발명의 이중특이적 항체의 치료상 유효량에 대한 또 다른 예시적인 비제한적 범위는 약 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1 내지 20 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 예컨대 약 0.3, 약 1, 약 3, 약 5, 또는 약 8 mg/kg이다.

[0644] 관련 기술분야에 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 목적하는 치료 효과를 달성하고 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차적으로 증가시키기 위해 요구되는 수준보다 낮은 수준으로 제약 조성물에 이용된 이중특이적 항체의 용량으로 시작할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 이중특이적 항체의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 생성시키는 데 유효한 가장 낮은 용량인 화합물의 양일 것이다. 투여는, 예를 들어 비경구, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 피하 투여일 수 있다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 mg/m^2으로써 계산된 1주 투여량으로 주

입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 투여량은, 예를 들어 다음에 따라서 상기 제공된 mg/kg 투여량에 근거할 수 있다: 용량 (mg/kg) x 70: 1.8. 이러한 투여는, 예를 들어 1회 내지 8회, 예컨대 3회 내지 5회 반복될 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예컨대 2 내지 12시간의 기간에 걸쳐 연속적으로 주입함으로써 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 독성 부작용을 감소시키기 위해, 장기간, 예컨대 24시간 초과하여 서서히 연속적으로 주입함으로써 투여될 수 있다.

[0645] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 1주에 1회 제공되는 경우에 8회 이하, 예컨대 4회 내지 6회 동안 고정된 용량으로서 계산된 1주 투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 요법은 필요에 따라, 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에, 1회 이상 반복될 수 있다. 이러한 고정된 투여량은, 예를 들어 체중을 70 kg으로 추정하여, 상기 제공된 mg/kg 투여량에 근거할 수 있다. 투여량은, 예를 들어 생물학적 샘플을 취하고 본 발명의 이중특이적 항체의 CD20 항원 결합성 영역을 표적으로 하는 항-이디오타입 항체를 사용하여, 투여시 혈액 중의 본 발명의 이중특이적 항체의 양을 측정함으로써 결정되거나 또는 조정될 수 있다.

[0646] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 유지 요법으로서 투여될 수 있는데, 예컨대, 예를 들어, 6개월 이상의 기간 동안 1주 1회 투여될 수 있다.

[0647] 이중특이적 항체는 또한, 암 발생의 위험을 저하시키고/시키거나, 암 진행에서의 특정 현상의 발병을 지연시키고/시키거나, 암에 대한 차도가 있을 때 재발의 위험을 감소시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다.

[0648] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한, 조합 요법으로 투여될 수 있는데, 즉 치료하고자 하는 질환 또는 병태와 관련된 다른 치료제와 조합될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 이중특이적 항체-함유 의약은 하나 이상의 추가 치료제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제 또는 항혈관형성제와 조합된다.

[0649] 이와 같은 조합 투여는 동시, 별도 또는 순차적일 수 있다. 동시에 투여하는 경우, 상기 작용제는 적당히 하나의 조성물로서 또는 별도의 조성물로서 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 하기 언급된 바와 같은 하나 이상의 부가 치료제와 조합된 본 발명의 이중특이적 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 언급된 바와 같은 CD20 발현성 세포와 관련된 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0650] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 이중특이적 항체, 및 임의로, 적어도 하나의 부가 치료제, 또는 상기 항체와 상이한 CD20 에피토프와 결합하는 항체를, CD20 발현성 세포와 관련된 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 특정 대상체에게서 CD20 발현성 세포와 관련된 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0651] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 이중특이적 항체 및 적어도 하나의 부가 치료제를, 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0652] 한 실시양태에서, 이러한 부가 치료제는 티로신 키나제 억제제 (TKI), 예컨대 이마티닙 [글리벡(Glivec), 글리벡 STI571], 이브루티닙 [PCI-32765, 임브루비카(Imbruvica)] 또는 라파티닙 (PTK787/ZK222584)으로부터 선택될 수 있다.

[0653] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 브루톤(Bruton) 티로신 키나제 (BTK) 억제제, 예컨대 이브루티닙으로부터 선택될 수 있다.

[0654] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 프로테아솜 억제제 (PI), 예컨대 카르필조밉으로부터 선택될 수 있다.

[0655] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 면역조정제 (IMID), 예컨대 포말리도미드, 탈리도미드, 또는 레날리도미드로부터 선택될 수 있다.

[0656] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 포스포이노시티드 3-키나제 억제제, 예컨대 이델라리십 또는 두벨리십으로부터 선택될 수 있다.

[0657] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 아우로라 A 키나제 억제제, 예컨대 알리세르팁으로부터 선택될 수 있다.

[0658] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 B-세포 림프종-2 (Bcl-2) 억제제, 예컨대 베네토클락스로부터 선택될 수 있다.

[0659] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 히스톤 데아시텔라제 (HDAC) 억제제, 예컨대 파노비노스타트로부터 선택될 수 있다.

[0660] 본 발명의 제약 조성물은 또한, 조합 요법으로 투여될 수 있는데, 즉 다른 작용제와 조합될 수 있다. 한 실시

양태에서, 이러한 치료제는 알킬화제, 항대사제, 유사분열 억제제, 항-종양 항생제, 토포이소머라제 억제제 또는 백금 유사체의 부류로부터의 하나 이상의 화학요법제를 포함한다. 이러한 화학요법제의 예는 독소루비신 [아드리아마이신(Adriamycin)], 시스플라틴 [플라티놀(Platinol)], 블레오마이신 [블레녹산(Blenoxane)], 카르무스틴 [글리아델(Gliadel)], 시클로포스파미드 [시톡산(Cytoxan), 프로시톡스(Procytox), 네오사르(Neosar)], 벤다무스틴, 및 클로람부실 [류케란(Leukeran)]이다.

[0661] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 클로람부실; CHOP (시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 온코빈, 프레드니손 또는 프레드니솔론); 시클로포스파미드 및 프레드니솔론; 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 및 프레드니손; 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신, 및 프레드니손; 플루다라빈 및 알킬화제; 용량-조정된 EPOCH (에토포시드, 프레드니솔론, 빈크리스틴, 시클로포스파미드 및 독소루비신); GemOx (젬시타빈 및 옥살리플라틴); GDP (젬시타빈, 덱사메타손 및 시스플라틴)과 조합하여 투여될 수 있거나, 또는 예컨대, 예를 들어 문헌 [Non-Hodgkin's Lymphomas: Making sense of Diagnosis, Treatment, and Options, Lorraine Johnston, 1999, O'Reilly and Associates, Inc.]에 개시된 NHL에 대한 다른 통상의 다중 약물 요법과 조합하여 투여될 수 있다.

[0662] 한 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 항대사제, 예컨대 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 젬시타빈 또는 클라드리빈으로부터 선택될 수 있다.

[0663] 또 다른 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 알킬화제, 예컨대 메클로르에타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예컨대 카르보플라틴으로부터 선택될 수 있다.

[0664] 또 다른 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 항-유사분열제, 예컨대 탁산, 예를 들어 도세탁셀, 및 파클리탁셀, 및 빈카 알카로이드, 예를 들어 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 및 비노렐빈으로부터 선택될 수 있다.

[0665] 또 다른 실시양태에서, 상기 부가 치료제는 토포이소머라제 억제제, 예컨대 토포테칸 또는 이리노테칸, 또는 세포증식 억제 약물, 예컨대 에토포시드 및 테니포시드로부터 선택될 수 있다.

[0666] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 이중특이적 항체 및 혈관형성, 신생혈관증식 및/또는 다른 혈관증식의 적어도 하나의 억제제를, CD20 발현성 세포와 관련된 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 특정 대상체에게서 상기 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0667] 이러한 혈관형성 억제제의 예는 우로키나제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제 (예컨대 마리마스타트, 네오바스타트, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 및 유사한 작용제), 내피 세포 이동 및 증식의 억제제 [예컨대, TNP-470, 스쿠알라민, 2-메톡시에스트라디올, 콤브레타스타틴, 엔도스타틴, 안지오스타틴, 페니실라민, SCH66336 (쉐링-플라우 코포레이션 (Schering-Plough Corp; 미국 뉴저지주 매디슨)), R115777 (얀센 파르마슈티카, 인크. (Janssen Pharmaceutica, Inc.; 미국 뉴저지주 타이터스빌)) 및 유사한 작용제], 혈관형성성 성장 인자의 길항제 [예컨대, ZD6474, SU6668, 혈관형성제 및/또는 그의 수용체에 대항한 항체 (예컨대 VEGF (예를 들어 베바시주맙), bFGF, 및 안지오포이에틴-1), 탈리도미드, 탈리도미드 유사체 (예컨대 CC-5013), 수젠 (Sugen) 5416, SU5402, 항혈관형성 리보자임 (예컨대 안지오자임), 인터페론 α (예컨대 인터페론 α2a), 수라민 및 유사한 작용제], VEGF-R 키나제 억제제 및 다른 항-혈관형성 티로신 키나제 억제제 (예컨대 SU011248), 내피-특이적 인테그린/생존 시그널링의 억제제 (예컨대 비탁신 및 유사한 작용제), 구리 길항제/킬레이트제 (예컨대 테트라티오몰리브데이트, 캅토프릴 및 유사한 작용제), 카르복시아미도-트리아졸 (CAI), ABT-627, CM101, 인터류킨-12 (IL-12), IM862, PNU145156E 뿐만 아니라 혈관형성을 억제하는 뉴클레오티드 분자 (예컨대 안티센스-VEGF-cDNA, 안지오스타틴을 코딩하는 cDNA, p53을 코딩하는 cDNA 및 결핍성 VEGF 수용체-2를 코딩하는 cDNA)이다.

[0668] 상기 혈관형성, 신생혈관증식 및/또는 다른 혈관증식의 억제제의 다른 예는 항-혈관형성성 헤파린 유도체 (예를 들어, 헤페리나제 III), 테모졸로미드, NK4, 대식세포 이동 억제성 인자, 시클로옥시게나제-2 억제제, 저산소증 유도성 인자 1의 억제제, 항-혈관형성성 대두 이소플라본, 올티프라즈, 푸마길린 및 그의 유사체, 소마토스타틴 유사체, 펜토산 폴리술페이트, 테코갈란 소듐, 달테파린, 툼스타틴, 트롬보스폰딘, NM-3, 콤브레스타틴, 칸스타틴, 아바스타틴, 다른 표적에 대항한 항체, 예컨대 항-알파-v/베타-3 인테그린 및 항-키니노스타틴 항체이다.

[0669] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한

치료제는 항암 면역원, 예컨대 암 항원/종양 관련 항원 (예를 들어, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM/TACSTD1), 뮤신 1 (MUC1), 암배아 항원 (CEA), 종양 관련 당단백질 72 (TAG-72), gp100, 멜란-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, 암 관련 바이러스 백신 (예를 들어, 인간 유두종 바이러스 백신) 또는 종양 유래 열 쇼크 단백질일 수 있다.

[0670] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제는 항암 시토카인, 케모카인, 또는 그의 조합물일 수 있다. 적합한 시토카인 및 성장 인자의 예는 IFNγ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFNα (예를 들어, INFα2b), IFNβ, GM-CSF, CD40L, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 안세스팀 (ancestim), 및 TNFα를 포함한다. 적합한 케모카인은 Glu-Leu-Arg (ELR)-음성 케모카인, 예컨대 인간 CXC 및 C-C 케모카인 계열로부터의 IP-10, MCP-3, MIG, 및 SDF-1α를 포함할 수 있다. 적합한 시토카인은 시토카인 유도체, 시토카인 변이체, 시토카인 단편, 및 시토카인 융합 단백질을 포함한다.

[0671] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제는 세포 주기 제어/아폽토시스 조절제 (또는 "조절성 작용제")일 수 있다. 세포 주기 제어/아폽토시스 조절제는 세포 주기 제어/아폽토시스 조절제, 예컨대 (i) cdc-25 (예컨대 NSC 663284), (ii) 세포 주기를 과자극하는 시클린-의존성 키나제 [예컨대, 플라보피리돌 (L868275, HMR1275), 7-히드록시스타우로스포린 (UCN-01, KW-2401), 및 로스코비틴 (R-로스코비틴, CYC202)], 및 (iii) 텔로머라제 조정제 (예컨대, BIBR1532, SOT-095, GRN163, 및 예를 들어, US 6,440,735 및 US 6,713,055에 기재된 조성물)를 표적으로 하여 이를 조정하는 분자를 포함할 수 있다. 아폽토시스 경로를 방해하는 분자의 비제한적 예는 TNF-관련 아폽토시스-유도성 리간드 (TRAIL)/아폽토시스-2 리간드 (Apo-2L), TRAIL 수용체를 활성화시키는 항체, 인터페론-γ (IFN-γ) 및 안티센스 Bcl-2를 포함한다.

[0672] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제는 호르몬 조절성 작용제, 예컨대 항안드로겐 및 항에스트로겐 요법에 유용한 작용제일 수 있다. 이러한 호르몬 조절성 작용제의 예는 타목시펜, 이독시펜, 풀베스트란트, 드롤록시펜, 토레미펜, 랄록시펜, 디에틸스틸베스트롤, 에티닐 에스트라디올/에스티닐, 항안드로겐 (예컨대 플루타미드/에울렉신), 프로게스틴 (예컨대 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시-프로게스테론/프로베라, 메게스트롤 아세페이트/메가세), 부신 피질스테로이드 (예컨대 히드로코르티손, 프레드니손), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (및 그의 유사체 및 다른 LHRH 효능제, 예컨대 부세렐린 및 고세렐린), 아로마타제 억제제 (예컨대 아나스트라졸/아리미덱스, 아미노글루테티미드/시트라덴, 엑세메스탄) 또는 호르몬 억제제 (예컨대 옥트레오티드/산도스타틴)이다.

[0673] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제는 면역 체크포인트 억제제, 예컨대 CTLA-4의 활성을 차단시키는 분자, 예를 들어 이필리무맙, PD-1, 예를 들어 펨브롤리주맙, PD-L1, TIM3, TIGIT, BTLA, VISTA 또는 LAG-3일 수 있다.

[0674] 한 실시양태에서, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제는 항암 핵산 또는 항암 억제성 RNA 분자일 수 있다.

[0675] 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 본 발명에 따르는 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 분화 유도성 작용제; 레티노산 유사체 (예컨대 모든 트랜스 레티노산, 13-시스 레티노산 및 유사한 작용제); 비타민 D 유사체 (예컨대 세오칼시톨 및 유사한 작용제); ErbB3, ErbB4, IGF-IR, 인슐린 수용체, PDGFRa, PDGFR베타, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, RON (예컨대 항-RON 항체), Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7의 억제제; 및 유사한 작용제이다.

[0676] 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 본 발명에 따르는 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 에스트라무스틴 및 에피루비신이다.

[0677] 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 본 발명에 따르는 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 HSP90 억제제 유사 17-알릴 아미노 겔드-아나마이신; 종양 항원, 예컨대 PSA, CA125, KSA, 인테그린, 예를 들어 인테그린 β1에 대항하여 유도된 항체; 또는 VCAM의 억제제이다.

[0678] 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료하기 위하여 이중특이적 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 칼시뉴린-억제제 (예컨대 발스포다르, PSC 833 및 다른 MDR-1 또는 p-당단백질 억제제); TOR-억제제 (예컨대 시롤리무스, 에베롤리무스 및 라파마이신); 및 "림프구 귀소" 기전의 억제제 (예컨

대 FTY720); 및 세포 시그널링에 영향을 주는 작용제, 예컨대 부착 분자 억제제 (예를 들어 항-LFA)이다.

[0679] 또한 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 방사선 요법 및/또는 자가 또는 동종이계 말초 줄기 세포 또는 골수 이식과 연계해서 투여될 수 있다.

[0680] 또한 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 항-CD25 항체, 항-CD19 항체, 항-CD20 항체 (예를 들어, 오파투무맙 또는 리툭시맙), 항-CD21 항체, 항-CD22 항체, 항-CD37 항체, 항-CD38 항체, 항-IL6R 항체, 항-IL8 항체, 항-IL15 항체, 항-IL15R 항체, 항-CD4 항체, 항-CD11a 항체 (예를 들어, 에팔리주맙), 항-알파-4/베타-1 인테그린 (VLA4) 항체 (예를 들어, 나탈리주맙), 및 CTLA4-Ig로부터 선택된 하나 이상의 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

[0681] 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체는 면역 체크포인트를 차단시키는 하나 이상의 항체, 예컨대 항-CTLA-4 (CD152) 항체, 항-PD-1 (CD279) 항체, 항-PD-L1 (CD274) 항체, 항-LAG-3 (CD223) 항체, 항-TIM3 항체, 항-CEACAM1 (CD66a) 항체, 항-VISTA 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA (CD272) 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

[0682] 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체는 면역 세포 상의 공동-자극성 수용체에 대해 특이적인 하나 이상의 효능 작용 항체, 예컨대 항-4-1BB (CD137) 항체 (예를 들어, 우렐루맙), 항-OX40 (CD134) 항체, 항-CD40 항체, 항-CD27 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

[0683] 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나 이상의 유형 II 대식세포 고갈성 또는 편광 항체, 예컨대 항-CSF-1R (CD115) 항체와 조합하여 투여될 수 있다.

[0684] 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체는 선천 면역 체계의 조절에 관여하는 분자와 결합하는 하나 이상의 항체, 예컨대 항-CD47 항체, 항-CD200 항체, 항-CD200R 항체, 킬러 세포 억제성 수용체 (KIR)에 대항한 항체, CD94/NKG2 수용체에 대항한 항체, 항-CD305 (LAIR1)와 조합하여 투여될 수 있다.

[0685] 또 다른 특별한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 악성 질환을 치료하기 위하여 항-CD19 항체, 항-CD21 항체, 항-CD22 항체, 항-CD37 항체, 및 항-CD38 항체로부터 선택된 하나 이상의 항체와 조합하여 투여된다.

[0686] 또 다른 특별한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 항-CD20 항체, 예컨대 오파투무맙과 조합하여 투여된다.

[0687] 또한 또 다른 특별한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 염증성 질환을 치료하기 위하여 항-IL6R 항체, 항-IL8 항체, 항-IL15 항체, 항-IL15R 항체, 항-CD4 항체, 항-CD11a 항체 (예를 들어, 에팔리주맙), 항-알파-4/베타-1 인테그린 (VLA4) 항체 (예를 들어, 나탈리주맙), 및 CTLA4-Ig로부터 선택된 하나 이상의 항체와 조합하여 투여된다.

[0688] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 하나 이상의 다른 치료용 항체, 예컨대 자놀리무맙, 다라투무맙 [다르잘렉스(Darzalex)], 라니비주맙, 니모투주맙, 파니투무맙, hu806, 다클리주맙 [제나팍스(Zenapax)], 바실릭시맙 [시뮬렉트(Simulect)], 인플릭시맙 [레미카데(Remicade)], 아달리무맙 [후미라(Humira)], 나탈리주맙 [티사브리(Tysabri)], 오말리주맙 [졸라이르(Xolair)], 및/또는 에팔리주맙 [랍티바(Raptiva)]과 조합하여 사용된다.

[0689] 또 다른 실시양태에서 본 발명의 이중특이적 항체는 하나 이상의 항체-약물 접합체 (ADC), 예를 들어 브렌툭시맙-베도틴 [애드세트리스(Adcetris)], 이노투주맙 오조가미신 (CMC-544), 폴라투주맙 베도틴 (RG7593), 콜툭시맙 라브탄신 (SAR3419), 인다툭시맙 라브탄신 (BT-062), 이노투주맙 오조가미신 (CMC-544), 데닌투주맙 마포도틴 (SGN-CD19), 폴라투주맙 베도틴 (RG7596) 또는 CD37-특이적 항체 약물 접합체 (예를 들어 IMGN529 또는 AGS67E)와 조합하여 사용된다.

[0690] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 소염제 또는 면역억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 하나의 소염제 또는 적어도 하나의 면역억제제를 수반한 본 발명의 조성물을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서 이러한 치료제는 하나 이상의 소염제, 예컨대 스테로이드성 약물 또는 NSAID (비스테로이드성 소염 약물)를 포함한다. 바람직한 작용제는, 예를 들어, 아스피린 및 다른 살리실레이트, Cox-2 억제제, 예컨대 셀레콕십 [셀레브렉스(Celebrex)], NSAID, 예컨대 이부프로펜 [모트린(Motrin), 애드빌(Advil)], 페노프로펜 [날폰(Nalfon)], 나프록센 [나프로신(Naprosyn)], 술린닥 [클리노릴(Clinoril)], 디클로페낙 [볼타렌(Voltaren)], 피록시캄 [펠덴(Feldene)], 케토프로펜 [오루디스(Orudis)], 디플루니살 [돌로비드(Dolobid)], 나부메톤 [렐라펜(Relafen)], 에토돌락 [로딘(Lodine)], 옥사프로진 [다이프로(Daypro)], 및 인도메타신 [인도신(Indocin)]을 포함한다.

[0691] 또 다른 실시양태에서, 상기 치료제는 하나 이상의 DMARD, 예컨대 메토트렉세이트 [류마트렉스(Rheumatrex)], 히드록시클로로퀸 [플라퀘닐(Plaquenil)], 술파살라진 [아술피딘(Asulfidine)], 피리미딘 합성 억제제, 예를 들어, 레플루노미드 (아라바), IL-1 수용체 차단제, 예를 들어, 아나킨라 [키네레트(Kineret)], 및 TNF-α 차단제, 예를 들어, 에타네르셉트 [엔브렐(Enbrel)], 인플릭시맙 (레미카데) 및 아달리무맙을 포함한다.

[0692] 또 다른 실시양태에서, 상기 치료제는 하나 이상의 면역억제제, 예컨대 시클로스포린 [샌드임뮨(Sandimmune), 네오랄(Neoral)] 및 아자티오프린 [이무랄(Imural)]을 포함한다.

[0693] 특별한 실시양태에서, 이중특이적 항체는, 예를 들어 이식편 대 숙주 질환이 있는 환자에게서 수포성 유사천포창을 치료하기 위하여 항-CD25 항체와 조합하여 투여된다.

[0694] *방사선 요법 - 수술*

[0695] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 CD3xCD20 이중특이적 항체, 및 방사선 요법을, CD20 발현성 세포와 관련된 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 특정 대상체에게서 상기 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0696] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 CD3xCD20 이중특이적 항체, 및 방사선 요법을, 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0697] 한 실시양태에서, 본 발명은 방사선 요법과 조합하여 투여될 암을 치료하기 위한 제약 조성물을 제조하기 위한, 본 발명의 이중특이적 항체의 용도를 제공한다.

[0698] 방사선 요법은 환자에게 방사선 또는 방사성 의약품의 관련 투여를 포함할 수있다. 방사선의 공급원은 치료받는 환자의 외부 또는 내부 중 하나일 수 있다 [방사선 치료는, 예를 들어 외부 빔 방사선 요법 (EBRT) 또는 근접조사 요법 (BT)의 형태일 수 있다]. 상기 방법을 실시하는 데 사용될 수 있는 방사성 원소는, 예를 들어 라듐, 세슘-137, 이리듐-192, 아메리슘-241, 금-198, 코발트-57, 구리-67, 테크네튬-99, 아이오다이드-123, 아이오다이드-131, 및 인듐-111을 포함한다.

[0699] 추가 실시양태에서, 본 발명은 치료상 유효량의 본 발명의 이중특이적 항체를 수술과 조합하여, 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0700] *진단 용도*

[0701] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 이중특이적 CD3xCD20 항체를 포함하는 진단 조성물, 및 그의 용도에 관한 것이다.

[0702] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0703] i) 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체; 및

[0704] ii) 키트의 사용 설명서

[0705] 를 포함하는, 환자로부터 유래된 샘플, 예컨대 혈액 샘플, 림프절 샘플 또는 골수 샘플 중에서 CD3-발현성 세포와 CD20-발현성 세포 간의 교차 결합을 검출하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0706] 한 실시양태에서, 본 발명은 이중특이적 CD3xCD20 항체, 및 CD20 발현성 세포와 CD3 발현성 세포의 교차 결합을 검출하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 용기를 포함하는, 암의 진단을 위한 키트를 제공한다. 시약은, 예를 들어 형광성 태그, 효소 태그, 또는 다른 검출 가능한 태그를 포함할 수 있다. 상기 시약은 또한, 2차 또는 3차 항체 또는 효소 반응을 위한 시약을 포함할 수 있는데, 여기서 효소 반응으로 인해, 가시화될 수 있는 생성물이 생성된다.

[0707] 추가 측면에서, 본 발명은

[0708] (i) 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체와 CD3-발현성 세포 및 CD20-발현성 세포 간에 복합체를 형성할 수 있게 해주는 조건하에, 환자로부터 유래된 샘플을 상기 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계; 및

[0709] (ii) 복합체가 형성되었는 지를 분석하는 단계

[0710] 를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 실시양태 중 어느 하나에 따르는 이중특이적 항체의 투여시, 환자로부터 유래된 샘플, 예컨대 혈액 샘플, 림프절 샘플 또는 골수 샘플 중에서 CD3-발현성 세포와 CD20-발현성 세포 간의

교차 결합이 일어나는 지를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0711] 복합체의 검출은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 실시예 5에 개시된 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0712] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 제1 항원 결합성 영역과 결합하거나, 또는 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 제2 항원 결합성 영역과 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

[0713] 본 발명은 다음 실시예에 의해 추가로 예시되는데, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

[0714] **실시예**

[0715] **실시예 1 - 인간화 CD3 항체 및 불활성화 항체 변이체의 생성**

[0716] *CD3 항체의 인간화*

[0717] 뮤린 CD3 항체 SP34 (US8236,308; 본원에 IgG1-CD3으로서 기재됨)의 인간화는 생식세포 계열 인간화 (CDR-이식) 기술 (EP0629240)의 개선된 버전을 이용하여 안티토프 (Antitope; 영국 케임브리지)에 의해 수행되었다. 이러한 기술을 이용하여, 4개의 상이한 VH 쇄 (서열식별번호: 6, 7, 8, 및 9) 및 3개의 상이한 VL 쇄 (서열식별번호: 10, 11, 및 12)를 설계하였다. 이들 4개의 VH 쇄를 3개의 VL 쇄와 조합함으로써, 12개의 상이한 항체를 생성시켰다. 인간화 변이체가 본원에 huCD3으로서 기재된다. 따라서, 본 발명에 따르는 VH 및 VL을 포함하는 인간화 변이체는, 예를 들어, IgG1-huCD3-H1L1로서 기재되는데, 이는 상기 특이적 변이체가 IgG1 이소형의 것이고, 인간화 SP34 CD3-특이적 항체이며, "H1"로 일컬어지고 서열식별번호: 6에 따라서 정의된 VH 아미노산 서열 및 "L1"로 일컬어지고 서열식별번호: 10에 따라서 정의된 VL 아미노산 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 따라서, H1은 가변 중쇄 영역 VH1을 지칭하고, L1은 가변 경쇄 영역 VL1을 지칭하는 등등이다.

[0718] 특히, 변이체 IgG1-huCD3-H1L1 (서열식별번호: 6에 제시된 VH1 서열 및 서열식별번호: 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H1L2 (서열식별번호: 6에 제시된 VH1 서열 및 서열식별번호: 11에 제시된 VL2 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H1L3 (서열식별번호: 6에 제시된 VH1 서열 및 서열식별번호: 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L3 (서열식별번호: 8에 제시된 VH3 서열 및 서열식별번호: 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H4L1 (서열식별번호: 9에 제시된 VH4 서열 및 서열식별번호: 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L1 (서열식별번호: 8에 제시된 VH3 서열 및 서열식별번호: 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L3 (서열식별번호: 8에 제시된 VH3 서열 및 서열식별번호: 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), 및 IgG1-huCD3-H4L3 (서열식별번호: 9에 제시된 VH4 서열 및 서열식별번호: 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3)을 본 발명에 따르는 이중특이적 항체의 제1 항원 결합성 영역으로서 사용하였다. 본원에서, "IgG1-huCD3"은 추가로 정의되지 않는 경우, IgG1-huCD3-H1L1을 지칭한다.

[0719] 일부 실시예에서는, huCLB-T3/4의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 (각각 서열식별번호: 17 및 18)을 포함하는 CD3 항체가 본 발명에 따르는 이중특이적 항체의 제1 항원 결합성 영역으로서 사용되었다. huCLB-T3/4는 뮤린 CD3 항체 CLB-T3/4의 인간화 버전이다 (Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9):749-63). 양 서열 (서열식별번호: 17 및 18)을 관련 pcDNA3.3 [인비트로젠(Invitrogen)] 발현 벡터 내로 클로닝하고, HEK293F 세포에서 공동 형질감염시킴으로써 발현시켰다. 이로써 생성되는 CD3 항체가 IgG1-huCLB-T3/4로서 기재된다.

[0720] 인간화 CD3 항체는 WO2015001085에 추가로 개시되어 있다.

[0721] *CD20 항체*

[0722] 본 발명의 이중특이적 항체의 제2 결합성 아암으로서 사용된 CD20 항체는 WO2004035607 (젠맙) 및 WO2005103081 (젠맙)에 추가로 개시되어 있다.

[0723] *대조군 항체*

[0724] 다음 항체를 본 실시예에서 대조군 항체로서 사용하였다:

[0725] *CD3 항체*

[0726] IgG1-CD3 (서열식별번호: 25 및 서열식별번호: 26에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는 모 CD3 항체 SP34);

[0727] IgG1-huCD3 (H1L1) (서열식별번호: 6 및 서열식별번호: 10에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0728] IgG1-huCLB-T3/4;

[0729] bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR (gp120 특이적 항체인 항체 b12 (문헌 [Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23])를 제2 아암으로서 사용하는 이중특이적 항체);

[0730] IgG1-huCD3-H1L1-FEAL;

[0731] IgG1-huCLB-T3/4-FEAL.

[0732] *CD20 항체*

[0733] IgG1-7D8 (서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 28에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0734] IgG1-11B8 (서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 41에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0735] IgG1-2F2 (서열식별번호: 37 및 서열식별번호: 28에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0736] IgG1-RTX (리툭시맙의 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0737] IgG1-GA101 (야생형 인간 IgG1 Fc 도메인을 수반한, 오비누투주맙, CHEMBL1743048, US8883980의 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0738] IgG1-2C6 (서열식별번호: 47 및 서열식별번호: 48에 각각 제시된 VH 및 VL 서열을 갖는다);

[0739] IgG1-7D8-FEAR;

[0740] IgG1-11B8-FEAR;

[0741] IgG1-2F2-FEAR;

[0742] IgG1-GA101-FEAR;

[0743] IgG1-2C6-FEAR.

[0744] 정량적 유동 세포계수법 [QIFIKIT®, 다코(Dako); cat. no K0078]을 문헌 (Poncelet and Carayon, 1985, J. Immunol. Meth.85: 65-74)에 기재된 바와 같이 수행하여, CD20 발현의 지표로서 본 실시예에서 사용된 상이한 인간 B-세포주 상에서의 7D8 CD20 항체의 결합성을 정량화하였다. 이 목적을 달성하기 위해서, 인간 B-세포주를 포화 농도의 7D8과 함께 인큐베이션하고, 결합된 7D8 분자의 수를 정량적 유동 세포계수법을 이용하여 결정하였다.

[0745] 뮤린 Fc 도메인을 발현하도록 조작시킨 항-인간 CD20 항체 7D8 (10 μg/mL, mmIgG1-7D8) (문헌 [Overdijk et al. 2012, J. Immunol. 189:3430-3438])을 본 검정에 사용하였다. B-ALL: B 세포 급성 림프모구성 백혈병, ABC-DLBCL: 활성화된 B 세포 확산성 대형 B-세포 림프종, GC-DLBCL: 배아 중심 확산성 대형 B-세포-림프종, FL: 여포성 림프종.

[0746] <표 4>

[0747] **상이한 B 세포주 상에서 7D8 CD20 항체 결합성의 정량화**

림프종 유형	*세포주*	***50,000-100,000 ABC*/세포***	***100,000-200,000 ABC/세포***	***> 200,000 ABC/세포***
버킷 림프종	*다우디*		*X*	
버킷 림프종	*라지*		*X*	
B-ALL	*Nalm-16*	*X*		
ABC-DLBCL	*OCI-Ly7*			*X*
GC-DLBCL	*SU-DHL-4*			*X*
FL	*WSU-NHL*			*X*

[0748]

[0749] *ABC: 항체-결합 능력

[0750] **실시예 2 - 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성**

[0751] 이중특이적 항체를 생성하기 위한 시험관내 방법이 WO2008119353 (젠맙)에 기재되어 있고, 문헌 [van der Neut-Kolfschoten et al., Science. 2007 Sep 14; 317(5844):1554-7]에 보고되었다. 여기서는, 순한 환원성 조건하에 인큐베이션시 2개의 단일특이적 IgG4- 또는 IgG4-유사 항체 간의 "Fab-아암" 또는 "절반-분자" 교환 (중쇄와 부착된 경쇄의 스와핑)에 의해 이중특이적 항체가 형성되었다. 특정 이론에 제한되는 것은 아니지만, 이러한 Fab-아암 교환 반응은 디술피드-결합 이성화 반응의 결과였는데, 이러한 반응에서는 단일특이적 항체의 힌지 영역 내의 중쇄간 디술피드 결합이 환원되었고, 이로써 생성되는 유리 시스테인이, 상이한 특이성을 수반한 또 다른 항체 분자의 시스테인 잔기와 새로운 중쇄간 디술피드 결합을 형성한다. 이로써 생성된 생성물은 상이한 서열을 수반한 2개의 Fab 아암을 갖는 이중특이적 항체였다.

[0752] 이러한 자연적 IgG4 Fab-아암 교환에 관한 지식을 적응시켜, 안정적인 IgG1-기반 이중특이적 항체의 제조 방법을 생성시켰다 (WO2011131746 (젠맙)). 이러한 방법에 의해 생성된, 다음에 기재된 이중특이적 항체 생성물은 더 이상 IgG4 Fab-아암 교환에 참여하지 않을 것이다. 이러한 방법에 대한 기준은 특이적 검정 조건하에 이종이량체의 형성을 증진시키는 상보적 CH3 도메인을 사용하는 것이었다. 이러한 방법에 의해 이중특이적 항체의 생성을 가능하게 하기 위해, CH3 도메인 내에 특정의 돌연변이를 수반하는 IgG1 분자를 생성시켰는데: 모 IgG1 항체 중 하나에서는 T350I, K370T 및 F405L 돌연변이 (또는 최소한 F405L)를 수반하고, 다른 모 IgG1 항체에서는 K409R 돌연변이를 수반한다.

[0753] 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 각각의 항체가 0.5 mg/mL (등몰 농도)의 최종 농도로 존재하는 이들 2개의 모 항체를 37℃ 하에 90분 동안 100 μL 트리스-EDTA (TE)의 총 용적 중에서 25 mM 2-메르캅토에틸아민-HCl (2-MEA)과 함께 인큐베이션하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라서 스핀 칼럼 [마이크로콘 원심분리용 필터, 30k, 밀리포어(Millipore)]을 이용함으로써 환원제 2-MEA를 제거시킨 경우에는, 환원 반응을 중단시킨다.

[0754] **실시예 3 - 인간화 CD3 항체의 생성을 최적화하기 위한 돌연변이체의 생성**

[0755] *huCD3-L1 돌연변이체 플라스미드의 생성*

[0756] 일시적 형질감염 검정에서 IgG1-huCD3-H1L1의 발현 수준을 개선하기 위해, L1 경쇄 내에 돌연변이를 수반한 몇 가지 IgG1-huCD3-H1L1 변이체를 생성시켰다 (표 5 참조). 잔기의 선택은 생식세포 계열 서열과의 비교에 근거하거나 또는 상동 항체로부터의 결정 구조와 조합하여 huCD3-L1 서열 내에서의 희귀 잔기의 존재에 관하여 스크리닝하는 것에 근거하였다. 이와 같이 선택된 서열을 진아트(GeneArt) [라이프 테크놀로지 (Life Technologies; 독일)]에서 합성하였다. p33L은 서열식별번호: 29의 인간 IgLC2/IgLC3 람다 경쇄의 불변 도메인을 코딩한다. p33G1f는 서열식별번호: 15의 IgG1m(f) 중쇄 불변 영역을 코딩한다.

[0757] <표 5>

LC 구축물	**LC** 돌연변이체	**HC VH1** 코딩 플라스미드와의 공동-발현 후 항체 명칭
p33L-huCD3-VL1	-	IgG1-huCD3-H1L1
p33L-huCD3-VL1-F10L	F10L	IgG1-huCD3-H1L1-LF10L
p33L-huCD3-VL1-R23A	R23A	IgG1-huCD3-H1L1-LR23A
p33L-huCD3-VL1-A35P	A35P	IgG1-huCD3-H1L1-LA35P
p33L-huCD3-VL1-T41K	T41K	IgG1-huCD3-H1L1-LT41K
p33L-huCD3-VL1-K55N	K55N	IgG1-huCD3-H1L1-LK55N
p33L-huCD3-VL1-L97H	L97H	IgG1-huCD3-H1L1-LL97H
p33L-huCD3-VL1-LKNH	F10L, T41K, K55N, L97H	IgG1-huCD3-H1L1-LLKNH
p33L-huCD3-VL1-LTGPEAEY	F10L, R47T, D71G, A82P, D83E, S86A, I87E, F89Y	IgG1-huCD3-H1L1-LLTGPEAEY
p33L-huCD3-VL1-LAPTGPEAEY	F10L, R23A, A35P, R47T, D71G, A82P, D83E, S86A, I87E, F89Y	IgG1-huCD3-H1L1-LLAPTGPEAEY

[0758]

[0759] *Expi293F 세포에서의 일시적 발현*

[0760] 단일 항체의 경우에는, 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 코딩하는 플라스미드를, 엑스피펙타민(ExpiFectamine) 293 (라이프 테크놀로지)을 이용하여 프리스타일 Expi293F 세포 (라이프 테크놀로지; 미국)에서 일시적으로 형질감염시켰다. 전체로서, 1.5 μg HC 코딩 플라스미드 및 1.5 μg LC 코딩 플라스미드 (표 5)를 150 μL 옵티(Opti)-MEM [깁코 (Gibco; 미국)]에서 희석시켰다. 형질감염 혼합물을 제조하기 위해, 8 μL 엑스피펙타민 293을 150 μL 옵티-MEM에서 희석시키고, 실온하에 5분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, DNA/옵티-MEM과 엑스피펙타민 293/옵티-MEM 용액을 혼합하고, 실온하에 20분 동안 인큐베이션하며, 7.5x106 Expi293F 세포 및 50 U/mL Pen-Strep를 함유하는 2.55 mL Expi293 발현 배지에 부가하였다. 상기 세포를 37℃, 8% CO2 하에 인큐베이션하고, 200 rpm으로 진탕시켰다. 발현을 증강시키기 위해, 형질감염 후 21시간에, 15 μL 증강인자 혼합물 1 및 150 μL 증강인자 혼합물 2를 부가하였다. 세포를 4일 동안 인큐베이션한 다음, 상등액을 수거하였다. 상등액을 3,000 xg 하에 회전시키고, 0.2 μm 필터 상으로 필터 멸균시켰다. IgG 발현 수준을, 항-인간 IgG 센서 [포르테바이오 (ForteBio; 미국)]를 이용하여 옥텟 RED (포르테바이오; 미국) 상에서 측정하였다.

[0761] *IgG 농도 분석*

[0762] IgG1-huCD3-H1L1 항체가 72 μg/mL 하에 발현되었다. IgG1-huCD3-H1L1-LT41K 돌연변이체에 대해서는 IgG 발현 상의 4배 증가가 관찰되었다 (295 μg/mL). 다른 돌연변이 중에서 T41K 돌연변이를 포함한 IgG1-huCD3-H1L1-LLKNH 돌연변이체에 대하여 유사한 발현 수준이 관찰되었다 (311 μg/mL). 개별적으로 (IgG1-huCD3-H1L1-LF10L, IgG1-huCD3-H1L1-LK55N, IgG1-huCD3-H1L1-LL97H) 시험된 경우에는 이들 구축물 내에서의 다른 돌연변이가, IgG1-huCD3-H1L1과 비교해서 발현 증강을 나타내지 못하였다.

[0763] 제2 세트의 발현 증강성 돌연변이가 R23A와 A35P의 조합물에 대해서 관찰되었다. R23A 및 A35P가 결여된 IgG1-huCD3-H1L1-LLTGPEAEY 변이체는 증강된 발현을 나타내지 못하였지만 (83 μg/mL), 부가의 R23A 및 A35P 돌연변이를 함유하는 IgG1-huCD3-H1L1-LLAPTGPEAEY는 발현 상의 3배 증가를 나타내었다 (237 μg/mL). 개별적으로, R23A 또는 A35P는 증강된 발현 수준을 나타내지 못하였다 (각각 56 및 81 μg/mL).

[0764] **실시예 4 - 다우디 및 저캇 세포에 대한 이중특이적 CD3xCD20 항체의 결합성**

[0765] 인간 CD3-음성 CD20-양성 다우디 [아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection), ATCC® CCL-213™; 인간 버킷 림프종으로부터 유래됨] 및 인간 CD3-양성 CD20-음성 저캇 [도이체 잠룽 폰 미크로올가니즈멘 운트 젤쿨투어렌(Deutsche Sammlung von Mikroorgansimen und Zellkulturen), DSMZ® ACC 282™; 급성 T-세포 백혈병으로부터 유래됨] 세포주에 대한 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 결합성을 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 양 아암 상에서의 불활성화 돌연변이, L234F, L235E, D265A 이외에도, 이중특이적 항체는 하나의 아암 상에 F405L 돌연변이를 함유하였고, 다른 아암 상에 K409R 돌연변이를 함유하였다.

[0766] 세포 ($1x10^5$개 세포/웰)를 4℃에서 30분 동안 폴리스티렌 96-웰 환저 플레이트 [그라이너 바이오-원(Greiner bio-one), cat. no. 650101]에서, 100 μL PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (본원에서 염색 완충제로서 지명된 것으로부터) 중의 일련의 항체 희석물 (3배 희석 단계 [a-e]에서는 0.041 내지 30 μg/mL의 범위 및 4배 희석 단계 [f-i]에서는 0.00061 내지 10 μg/mL의 범위)과 함께 인큐베이션하였다.

[0767] 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 4℃에서 30분 동안 50 μL 2차 항체에서 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 염색 완충제에서 1:200으로 희석시킨 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG $F(ab')_2$ [cat. no. 109-116-098; 잭슨 임뮤노리서치 라보라토리즈, 인크. (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; 미국 펜실베니아주 웨스트 그로브)]를 모든 실험에 사용하였다. 이어서, 세포를 염색 완충제에서 2회 세척하고, 30 μL 염색 완충제에 재현탁시키며, iQue 스크리너 [인텔리시트 코포레이션 (Intellicyt Corporation; 미국)] 상에서 분석하거나 (도 1a-e의 경우) 또는 100 μL 염색 완충제에 재현탁시키고, FACSCANTOII [BD 바이오사이언스(Biosciences)] 상에서 분석하였다 (도 1f-i의 경우). 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) V75.04 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)를 사용하여, 비-선형 회귀 (가변 기울기를 수반한 S자 모양의 용량 반응)를 이용하여 결합 곡선을 분석하였다.

[0768] 도 1a-f는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR이 단일특이적, 2가 CD20 항체 IgG1-7D8 및 IgG1-2F2보다 더 높은 최대 결합성으로, 다우디 세포에 대한 용량-의존성 결합을 나타냈다는 것을 도시한 것이다. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR의 경우에는, 최대 결합성이 2가의 단일특이적 CD20 항체

IgG1-11B8, IgG1-RTX 및 IgG1-GA101의 최대 결합성과 유사하였다. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR, 및 2가의 단일특이적 CD20 항체 IgG1-11B8, IgG1-RTX 및 IgG1-GA101의 최대 결합성은 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR 및 2가의 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8 및 IgG1-2F2의 최대 결합성보다 더 낮았다. huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR의 최대 결합성은 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8의 최대 결합성과 거의 동등한 수준이었다.

[0769] 도 1g는 CD3-특이적 huCLB-T3/4 Fab-아암을 함유하는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 다우디 세포에 대한 결합성을 나타낸다. BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR은 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8과 거의 동등한 수준의 결합성을 나타낸다. CD3-특이적 huCD3-H1L1 Fab-아암을 함유하는 CD3xCD20 이중특이적 항체에 관해서는, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-GA101-FEAR에 대한 결합성이 단일특이적 CD20 항체 IgG1-7D8의 결합성 및 CD20-특이적 7D8- 또는 2F2-Fab-아암을 함유하는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 결합성보다 더 낮았다.

[0770] 도 1h 및 i는 CD3-특이적 huCD3-H1L1- 또는 huCLB-T3/4-Fab-아암을 각각 함유하는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 저캇 세포에 대한 결합성을 도시한 것이다. IgG1-huCD3-H1L1-FEAL로부터 유래되는 CD3-특이적 Fab-아암을 수반한 모든 CD3xCD20 이중특이적 항체는 CD20-특이적 Fab-아암의 기원과 관계없이 저캇 세포에 대한 거의 동등한 수준의 결합성을 나타냈다 (도 1h). 유사하게, IgG1-huCLB-T3/4-FEAL로부터 수득된 CD3 Fab-아암을 수반한 모든 CD3xCD20 이중특이적 항체는 거의 동등한 수준의 결합성을 나타냈다 (도 1g). 단일특이적, 2가 모 CD3-특이적 항체인 IgG1-huCD3-H1L1 및 IgG1-huCLB-T3/4는 CD3xCD20 이중특이적 항체보다 더 낮은 EC_{50} 값으로 저캇 세포와 결합하였다.

[0771] **실시예 5 - T 세포 및 B 세포에 대한 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 농도-의존성 동시 결합성**

[0772] 인간 B 세포는 표면 항원 CD20을 발현하지만, CD3의 발현은 결여된다. 이와는 대조적으로, 인간 T 세포는 표면 항원 CD3을 발현하지만, CD20의 발현은 결여된다. 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR은 CD3과 CD20 둘 다를 인식하므로, 인간 B 세포와 T 세포 둘 다와 결합할 수 있다. B 및 T 세포에 대한 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 동시 결합성은, 37℃에서 2시간 동안 일정 농도 범위의 항체 (상이한 용적의 희석되지 않은 항체를 혈액 샘플에 부가함으로써 수득된, 10배 희석 단계에서 0.001 내지 100 μg/mL의 범위)의 존재하에 건강한 공여자로부터의 100 μL 헤파린 처리된 전혈을 인큐베이션함으로써 나타냈다. CD20 또는 CD3만을 각각 인식하므로, B 및 T 세포와 동시에 결합할 수 없는 CD20 항체 2F2 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR을 음성 대조군 항체로서 사용하였다. 세포를 염색 완충제에서 2회 세척하였고 (1200 RPM, 3분), 4℃에서 30분 동안 CD4 [CD4-PE; 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), cat. no. 555347] 또는 CD8 [CD8-PE; 밀테니(Miltenyi), cat. no. BW135/80] (상이한 T 세포 서브세트를 확인하기 위함) 및 CD19 (CD19-APC; 다코, cat. no. C7224) (B 세포를 확인하기 위함)에 대해 특이적인 항체와 함께 인큐베이션하였다. 분석하기 전에, 100 μL 적혈구 용해 완충제 (dH_2O 중에 용해된 10 mM $KHCO_3$/0.01 mM EDTA/155 mM NH_4Cl) [$KHCO_3$: 시그마(Sigma), cat. no. P9144; EDTA: FLUKA, cat. no. 036; NH_4Cl: 시그마, cat. no. A-5666]를 부가함으로써 적혈구를 용해시켰다. 자동화 플레이트 부하기가 장착된 FACSCANTOII (벡톤 디킨슨)를 이용하여, 샘플을 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 인간 T 및 B 세포에 대한 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 동시 결합성을 표시하는 $CD4^+CD19^+$ 또는 $CD8^+CD19^+$ 이중-양성 현상의 수는 CD4/CD19 및 CD8/CD19 사분면 분석에 의해 정량화하였다.

[0773] 도 2A 및 2B는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 존재하에서만, T 세포-B 세포 이중선을 나타내는 특정 집단의 $CD4^+CD19^+$ 및 $CD8^+CD19^+$ 이중-양성 현상이 관찰되었다는 것을 나타내는데, 이는 이들 이중특이적 항체가 2개의 세포 유형과 동시에 결합할 수 있다는 것을 표시한다. 이중선의 출현은 항체 농도-의존성이고 $CD4^+$ T 세포 (A)와 $CD8^+$ T 세포 (B) 둘 다에 대하여 발생되었다.

[0774] **실시예 6 - CD3xCD20 이중특이적 항체에 의한 시험관 내에서의 세포독성의 유도**

[0775] 표적 세포로서 종양 세포주를 사용하고 이펙터 세포로서 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 또는 정제된 T 세포를 사용하여 시험관내 세포독성 검정에서 상이한 CD3xCD20 이중특이적 항체를 시험하였다.

[0776] *표적 세포*: 다음 종양 세포주를 사용하였다: 다우디 및 라지 (상기 언급됨), OCI-Ly7 (DSMZ; cat. no. ACC

688; DLBCL로부터 유래됨), SU-DHL-4 (DSMZ; cat. no. ACC 495; DLBCL로부터 유래됨), RI-1 (DSMZ; cat. no. ACC 585; DLBCL로부터 유래됨), NALM-16 (DSMZ; cat. no. ACC 680; B-ALL로부터 유래됨) 및 WSU-NHL (DSMZ, cat. no.ACC 58; NHL로부터 유래됨). 세포를 $RPMI^{++}$ (10% 소 혈청 [깁코; cat. no. 10371-029] 및 25,000 단위 페니실린/25,000 μg 스트렙토마이신 [론자(Lonza); cat. no. 17-603E]이 보충된 RPMI-1640 [25 mM HEPES 및 L-글루타민을 수반함; 론자, cat. no. BE12-115F])에서 수집하고 (5 x 10^6개 세포), 침강시키며 (1,200 RPM, 5분), 1 mL $RPMI^{++}$에 재현탁시키고, 100 μCi ^{51}Cr [크로뮴-51; 펄킨 엘머(Perkin Elmer), cat. no. NEZ030002MC]을 부가하며 인큐베이션하였다 (37℃ 수욕, 진탕; 1시간). 세포를 PBS에서 2회 세척한 후 (1,200 RPM, 5분), 세포를 $RPMI^{++}$에 재현탁시키고, 트립판 블루 배제에 의해 계수하였다. 1 x 10^5개 세포/mL의 세포 현탁액을 제조하였다.

[0777] *이펙터 세포*: 제조업자의 지시에 따라서 피콜(Ficoll) 구배 (론자; 림프구 분리 배지, cat. no. 17-829E)를 이용하여 40 mL의 연막 [산퀸(Sanquin)]으로부터 신선한 PBMC를 단리하였다. 세포를 $RPMI^{++}$에 재현탁시킨 후, 적혈구를 배제하기 위하여 투에르크(Tuerk) 용액을 이용하여 세포를 계수하고, 10 x 10^6개 세포/mL의 농도가 되도록 조정하였다. 정제된 T 세포는, 제조업자의 지시에 따라서 로제트셉(RosetteSep™) 인간 T 세포 강화 칵테일 [스템셀 테크놀로지(Stemcell Technologies), cat. no. 15061]을 이용하여 연막으로부터 수득하거나 또는 디나비즈(Dynabeads®) 언터치된(Untouched™) 인간 T 세포 단리 키트 (인비트로젠; cat. no. 11344D)를 이용하여 PBMC로부터 수득하였다. 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 투에르크 용액을 이용하여 세포를 계수하며, 1 x 10^6개 세포/mL의 농도가 되도록 조정하였다.

[0778] *세포독성 검정*: 50 μL ^{51}Cr-표지된 표적 세포를 96-웰 환저 플레이트에 부가하였다. $RPMI^{++}$ 중의 50 μL 항체 (10 pg/mL 내지 10 μg/mL의 범위의 최종 농도)를 부가한 후, 세포를 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0779] 50 μL 이펙터 세포 (표시된 바와 같은 이펙터 대 표적 비), 트리톤-X-100 (1.7% 최종 농도; 최대 용해를 결정하기 위함), 또는 $RPMI^{++}$ (배경 용해를 결정하기 위함)를 부가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2 하에 24 내지 48시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 침강시킨 후 (1,200 RPM, 3분), 75 μL의 상등액을 1.4-mL 튜브 [마이크로닉(Micronic); cat. no. MP226RN] 내로 수거하고, 감마 계수기 (펄킨 엘머)로 계수하였다. 특이적 용해 비율 (%)을 다음과 같이 계산하였다:

[0780] % 특이적 용해 = (cpm 샘플 - cpm 표적 세포 단독)/(cpm 최대 용해 - cpm 표적 세포 단독) x 100. Cpm = 분당 계수치.

[0781] 도 3은 CD3-특이적 Fab 아암 (절반-분자) (IgG1-huCD3-H1L1-FEAL 또는 IgG1-huCLB-T3/4-FEAL로부터 유래됨) 및 CD20-특이적 Fab 아암 (즉, 절반-분자) (IgG1-CD20-7D8-FEAR, IgG1-CD20-11B8-FEAR, IgG1-CD20-2F2-FEAR, IgG1-CD20-RTX-FEAR, IgG1-CD20-2C6-FEAR 또는 IgG1-CD20-GA101-FEAR로부터 유래됨)을 함유하는 모든 이중특이적 항체가, 이펙터 세포로서 PBMC (도 3a, 3m) 및 정제된 T 세포 (도 3b-3l, 3n)를 사용하는 경우 둘 다에서, 시험된 B 세포주에서 세포독성을 유도시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 불활성 Fc 도메인을 수반한 단일특이적 2가 항체 (IgG1-7D8-FEAR, IgG1-11B8-FEAR, IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, IgG1-huCLB-T3/4-FEAL)는 B 세포주에서 T 세포- 또는 PBMC-매개된 세포독성을 유도시킬 수 없었다. 이는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 경우에는, 세포독성이 이러한 이중특이적 항체에 의한 CD3 및 CD20 결합성 둘 다에 의존성이었다는 것을 표시한다. 앞서 개시된 바와 같이, 활성 Fc를 수반한 단일특이적 2가 CD20 항체 (IgG1-7D8 및 IgG1-11B8-F405L)는 다우디 세포에서 PBMC에 의한 항체-의존성 세포-매개된 세포독성을 유도시킬 수 있었다 (도 3a, 3m). 이러한 경우에는, 우세한 이펙터 세포가 자연 킬러 (NK) 세포이다. CD3xC20 이중특이적 항체는 단일특이적 2가 CD20 항체보다 더 낮은 농도에서 활성이었다. 도 3c-3f는 IgG1-huCLB-T3/4-유래된 CD3 아암과 IgG1-huCD3-H1L1-유래된 CD3 아암 둘 다가 유사한 효능으로 세포독성을 유도시켰다는 것을 나타낸다. 도 3g-3m은 더욱이, 광범위한 B 세포주로부터 수득된 종양 세포주를 이용하여 유사한 결과를 수득하였다는 것을 나타낸다. 이들 세포주는 표 4에 표시된 바와 같이 상이한 B 세포 종양으로부터 유래되었다. 이러한 표는 또한, 이들 세포주 상에서의 CD20 발현 수준을 나타낸다.

[0782] **실시예 7 - 이펙터 세포로서 정제된 인간 말초 혈액 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 사용하여 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR에 의한 시험관내 세포독성의 유도**

[0783] bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR이 CD4 T 세포와 CD8 T 세포 둘 다의 세포독성 활성을 유도시킬 수 있었는 지를 결정하기 위하여, 이펙터 세포로서 상이한 T 세포 서브세트를 사용하여 세포독성 검정을 수행하였다. 다우디 세포를 상기 언급된 바와 같이 표적 세포로서 제조하였다.

[0784] 상기 언급된 바와 같이, 림프구 분리 배지를 이용하여 건강한 공여자로부터의 연막으로부터 PBMC를 단리하였다.

[0785] 디나비즈® 언터치된™ 인간 T 세포, 디나비즈® 언터치된™ 인간 CD4 T 세포 또는 디나비즈® 언터치된™ 인간 CD8 T 세포의 세포 단리 키트 (각각 인비트로젠, cat. no. 11344D, 11352D 및 11348D)를 이용하여 PBMC로부터 T 세포 (전체 T 세포 집단, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포 집단)를 단리하였다. 단리 후, 각각의 분획의 순도를 유동 세포계수법에 의해 결정하였다. 세포를 4℃에서 30분 동안 CD3 항체 (CD3-PER-CP; 벡톤 디킨슨, cat. no. 345766) 및 CD8 항체 (CD8-APC; 벡톤 디킨슨, cat. no. 555369)와 함께 인큐베이션하여, 상이한 T 세포 서브세트를 확인하였다. 자동화 플레이트 부하기가 장착된 FACSCANTOII (벡톤 디킨슨)를 이용하여, 샘플을 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. CD3/CD8 사분면 분석을 수행하여 $CD3^+$ 현상 (전체 T 세포 집단), $CD3^+CD8^+$ 이중-양성 현상 ($CD8^+$ T 세포 집단) 및 $CD3^+CD8^-$ 현상 ($CD4^+$ T 세포 집단)의 빈도를 정량화하였다.

[0786] 전체 T 세포를 10:1 이펙터 대 표적 비로 다우디 세포에 부가하였고, $CD4^+$ T 세포를 8:1 이펙터 대 표적 비로 부가하였으며, $CD8^+$ T 세포를 4:1 또는 8:1 이펙터 대 표적 (E/T) 비 (표시된 바와 같음)로 부가하였고 (도 4A), 세포독성 검정을 상기 언급된 바와 같이 수행하였다. 이펙터 세포로서 부가될 때, $CD4^+$ T 세포가 $CD8^+$ T 세포의 활성을 억제하였는지를 시험하기 위하여, 이펙터 세포로서 $CD8^+$ T 세포 (E/T 비 4:1) 만을 사용하거나 또는 $CD8^+$ T 세포 (E/T 비 4:1)를 $CD4^+$ T 세포 (E/T 비 8:1)와 함께 사용하여 세포독성 검정을 수행하였다 (도 4B).

[0787] 도 4A는 이펙터 세포로서 전체 T 세포, $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포를 사용하여, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR이 다우디 세포에서 T-세포-의존성 세포독성을 유도시켰다는 것을 나타낸다. 여기서 음성 대조군으로서 사용된 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR 및 IgG1-7D8-FEAR은 다우디 세포의 세포독성을 유도시키지 못하였는데 (데이터는 제시되지 않음), 이는 세포독성이 이중특이적 분자에 의한 CD3과 CD20 둘 다의 인식에 의존적이라는 것을 표시한다. 도 4B는 이펙터 세포로서 $CD4^+$ T 세포를 $CD8^+$ T 세포에 부가하는 것이 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 효능을 저하시키지 못하였다는 것을 나타낸다.

[0788] 표 6은 단리된 세포 분획의 순도가 약 90% 이상이었다는 것을 제시한다.

[0789] <표 6>

[0790] 유동 세포계수법에 의해 결정된 바와 같은, T-세포 서브세트의 순도

	모든 T 세포 ($CD3^+$)	CD4+ T 세포 ($CD3^+CD8^-$)	CD8+ T 세포 ($CD3^+CD8^+$)
단리된 전체 T 세포	95	55	43
단리된 CD4	92	95	0.6
단리된 CD8	90	9.0	86

[0791]

[0792] **실시예 8 - 이펙터 세포로서 정제된 T 세포를 사용하여 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR에 의한 시험관내 세포독성 유도의 동역학**

[0793] 시험관 내에서 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR-유도된 세포독성의 동역학을 결정하기 위하여, 다우디 세포를 정제된 T 세포의 존재하에 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR과 함께 인큐베이션하고, 세포독성을 상이한 시점에서 평가하였다. 세포독성 검정을 상기 언급된 바와 같이 수행하였는데, 단 상등액을 24시간 후에 수거할 뿐만 아니라 인큐베이션 후 3 내지 24시간의 범위의 상이한 시점에 수거할 수 있었다.

[0794] 도 5는 2개의 상이한 공여자로부터 유래된 정제된 T 세포를 이용하여 수행된, 2가지 독립적 실험의 결과를 도시한 것이다. 제1 공여자로부터의 정제된 T 세포를 사용하여, 12시간 후에 용량-의존성 세포독성을 관찰하였고, 48 내지 72시간 후에는 세포독성이 훨씬 더 효율적이었다 (도 5A). 제2 공여자로부터의 정제된 T 세포의 존재

하에, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR은 인큐베이션 후 3시간 정도로 빨리 세포독성을 유도시킬 수 있었고, 그 효율은 16 내지 24시간 인큐베이션시 증가되었다 (도 5B).

[0795] **실시예 9 - 상이한 이펙터 대 표적 비에서 CD3xCD20 이중특이적 항체에 의한 시험관내 세포독성의 유도의 효능**

[0796] 상이한 CD20 항체로부터 유래되는 CD20 Fab-아암을 함유하는 CD3xCD20 이중특이적 항체에 의한 세포독성 유도의 효율을 결정하기 위하여, 상이한 이펙터 대 표적 비를 이용하여 상기 언급된 바와 같이 세포독성 검정을 수행하였다. PBMC를 이펙터 세포로서 사용하였고, 다우디 세포를 표적 세포로서 사용하였다.

[0797] 도 6에 도시된 바와 같이, 심지어 10:1 내지 25:1의 E/T 비에서도, CD3xCD20 이중특이적 항체에 대하여 세포 사멸이 관찰되었다.

[0798] **실시예 10 - NOD-SCID 마우스에서 라지-luc 공동-생착 모델 내에서의 CD3xCD20 이중특이적 항체의 세포독성**

[0799] bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR의 생체내 항종양 효능을 피하 라지-luc 공동-생착 모델에서 평가하였다. 이러한 모델에서는, 문헌 [Brischwein et al., Mol. Immunol. 43 (2006), 1129-1143]에 기재된 모델과 유사하게, 인간 T 세포의 공급원으로서의 인간 비자극된 PBMC를 종양 세포와 공동 접종하였다. 제0일에는, 200 μL PBS/0.1% BSA 중의 $5x10^6$개 PBMC 및 $5x10^6$개 라지-luc 세포를 함유하는 혼합물을 각각의 마우스 [암컷 NOD-SCID 마우스; NOD.C.B-17-Prkdcscid/J, 찰스-리버(Charles-River), 6 내지 11주생]의 오른쪽 옆구리에 피하 (s.c.) 접종하였다. 주사한지 1시간 이내에, 마우스를 처리군 (처리군 당 4 내지 5마리 마우스 [도 7a-f에 도시된 실험] 또는 처리군 당 10마리 마우스 [도 7g-i에 도시된 실험])으로 분류하고, 각각의 군에게 PBS 중의 100 내지 150 μL (이중특이적) 항체의 단일 용량을 정맥내 (i.v.) 주사하였다. 처리군은 표 7 (도 7a, b, c에 도시된 실험에 대함), 표 8 (도 7d, e, f에 도시된 실험에 대함) 및 표 8.1 (도 7g, h, i에 도시된 실험에 대함)에 제시된다. 종양 용적을 매주 적어도 2회 결정하였다. 종양 용적 (mm^3)은 캘리퍼 (PLEXX) 측정으로부터 다음과 같이 계산하였다: 0.52 x (길이) x $(폭)^2$.

[0800] 라지-luc 세포는 gWIZ 루시페라제 (GTS; 미국 샌디에이고)를 형질감염시킴으로써 생성시켰다. 세포를 해동시키고, 철 (깁코, cat. no. 10371-029), 페니실린/스트렙토마이신 및 소듐 피루베이트를 수반한 10% 공여자 소 혈청 및 1 μg/mL 푸로마이신 (시그마; 네덜란드 즈위들레흐트; cat. no. P-8833)을 보충시킨 RPMI (론자, BE12-115F)에서 배양하였다. 세포를 대수기에 수거하고 트립판 블루 배제에 의해 계수하였다.

[0801] 각각의 연구를 위하여, 상기 언급된 바와 같이 건강한 공여자 연막으로부터 인간 PBMC를 단리하고, 동결시킨 다음, 사용 전에 해동시켰다. 모든 세포를 PBS/0.1% BSA에서 세척하고, 세포 여과기를 통하여 여과시키며, PBS/0.1% BSA 중에서 50 x 10^6개 세포/mL의 농도가 되도록 재현탁시켰다.

[0802] 그 결과가 도 7에 도시된다. BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR은 0.05 및 0.5 mg/kg의 투여량에서 라지-luc 종양 크기를 효율적으로 감소시켰다. 0.005 mg/kg에서는, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR이 종양 성장에 영향을 미치지 못하였다 (도 7a). 종양 접종 후 제21일 (모든 처리군을 완료한 마지막 날)에, 0.5 mg/kg bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리시킨 마우스 내의 평균 종양 크기는 비히클 대조군 PBS로 처리시킨 마우스 내에서보다 상당히 더 작았다 (도 7b) ($p<0.01$, 크러스칼 왈리스 시험 후, 던의 다중 비교 사후 시험). 카플란-마이어 분석 결과, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.5 및 0.05 mg/kg)로 처리한 후 종양이 없는 생존율은, PBS로 처리한 후보다 상당히 더 우수한 것으로 입증되었다 (0.5 및 0.05 mg/kg 처리군 각각에 대하여 $p<0.01$ 및 $p<0.05$, 만텔 콕스 분석) (도 7c).

[0803] 유사하게, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리하면, 0.05 및 0.5 mg/kg의 용량에서 종양 성장이 상당히 억제되었다 (도 7d). 종양 접종 후 제25일 (모든 처리군을 완료한 마지막 날)에, 0.05 및 0.5 mg/kg bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리시킨 마우스 내의 평균 종양 크기는 비히클 대조군 (PBS)으로 처리시킨 마우스 내에서보다 상당히 더 작았다 ($p<0.05$, 크러스칼 왈리스 시험 후, 던의 다중 비교 사후 시험) (도 7e). 카플란-마이어 분석 결과, bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.5 및 0.05 mg/kg)로 처리한 후 종양이 없는 생존율은, 비히클 대조군 (PBS)으로 처리한 후보다 상당히 더 우수한 것으로 입증되었다 ($p<0.01$, 만텔 콕스 분석) (도 7f).

[0804] 도 7g는 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (시험된 모든 용량)과 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR (0.05 mg/kg) 둘 다가 종양 성장의 지연을 유도시켰다는 것을 나타낸다. 종양 접종 후 제20일 (모든 처리

군을 완료한 마지막 날)에, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR (0.005, 0.05 및 0.5 mg/kg)로 처리시킨 마우스 내에서의 평균 종양 크기 및 0.05 mg/kg bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR로 처리시킨 마우스 내에서의 평균 종양 크기는 비히클 대조군 (PBS)으로 처리시킨 마우스 내에서보다 상당히 더 작았다 (bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 0.005 μg/kg 군 ($p<0.01$)을 제외한 모든 군에 대하여 $p<0.05$; 일방향 ANOVA 후, 터키의 다중 비교 사후 시험) (도 7h). 카플란-마이어 분석 결과, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 0.005 mg/kg을 제외한 모든 처리군에서의 종양이 없는 생존율은, 비히클 대조군 (PBS)으로 처리된 마우스에서보다 상당히 더 우수한 것으로 입증되었다 ($p<0.05$, 만텔 콕스 분석) (도 7i).

[0805] <표 7>

군	항체	용량
1	PBS	
2	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	0.1 μg (~ 0.005 mg/kg)
3	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
4	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)

[0806]

[0807] <표 8>

군	항체	용량
1	PBS	
2	bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
3	bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)
4	bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxb12-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
5	bsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxb12-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)

[0808]

[0809] <표 8.1>

군	항체	용량
1	PBS	
2	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
3	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)
4	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
5	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)
6	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR	1 μg (~ 0.05 mg/kg)
7	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR	10 μg (~ 0.5 mg/kg)

[0810]

[0811] **실시예 11 - 인간화 면역 체계 마우스 이종이식편 모델에서 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 항종양 활성**

[0812] bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 생체내 항종양 효능을, 인간 다우디-luc 종양 세포 (BRGS-HIS-다우디-luc)를 접종시킨 인간화 면역 체계 (HIS) 마우스에서 평가하였다 [악세니스 (Axenis; 프랑스 파리)에서 수행된 실험]. 이러한 모델에서는, 인간 조혈 $CD34^+$ 전구 세포 (약 1 x 10^5개 세포)를 제대혈로부터 수득하고, 문헌 [Legrand et al., PNAS. 108 (2011), 13224-13229]에 기재된 바와 같이 신생아 BALB/c Rag2tm1Fwa IL-2Rγc tm1Cgn SIRPαNOD (BRGS) 마우스 내로 간내 주사하였다. 14주 후, BRGS 마우스의 인간화를 유동 세포계수법에 의해 확증하였다. 연속해서, 마우스를 인간 $CD45^+$ 집단 중의 인간 $CD3^+$ T 세포의 비율 (%) (PBS-처리군, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR-처리군 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR-처리군 각각에 대하여 29.5 ± 7.5, 28.4 ± 9.4 및 28.3 ± 11.6)을 근거로 하여, 3개 군 (군당 7마리 마우스)으로 나누었다. 15주에, 100 μL PBS 중의 5 x 10^6개 다우디-luc 세포를 BRGS-HIS 마우스에 정맥내 (i.v.) 주사하였고, 이를 본 연구에서 제0일로 표시하였다. 제3일 및 제7일에, 다우디-luc 세포를 수반한 BRGS-HIS 마우스에게 1 mg/kg (이중

특이적) 항체를 정맥내 주사하였다. 처리군은 표 9에 제시된다. 종양 성장을 생물발광 영상화 (BLI)에 의해 매주 평가하였다 (제2일에 시작함). 마우스에게 100 μL 반딧불이 D-루시페린 [30 mg/mL; 캘리퍼 라이프사이언스(Caliper LifeSciences)]을 복강내 (i.p) 주사하고, 바이오스페이스 생물발광 영상화 시스템 (펄킨 엘머)을 이용하여 생물발광을 측정하였다. 또한, 제9일에 각각의 개별적 마우스로부터 혈액 샘플을 취하고, 유동 세포계수법을 수행하여 상이한 백혈구 집단 (전체 인간 백혈구: $hCD45^+mCD45^-$ 집단; B 세포: $hCD3^-hCD19^+$ 집단; T 세포: $hCD3^+hCD19^-$ 집단 및 활성화된 T 세포: $hCD3^+hCD19^-FSC^{hi}$ 집단)의 비율 (%)을 결정하였다. 다음 항체를 염색에 사용하였다: 알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 700 [바이오레전드(BioLegend), cat. no. 304023; 최종 희석도 1:50]으로 표지시킨 항-hCD45 클론 HI30; 알로피코시아닌 (APC)-이플루오르(eFluor®) 780 [이바이오사이언스(eBioscience), cat. no. 47-0451-80; 최종 희석도 1:200]으로 표지시킨 항-mCD45 클론 30-F11; 이플루오르® 450 (이바이오사이언스, cat. no. 48-0038-80; 최종 희석도 1:50)으로 표지시킨 항-hCD3 클론 UCHT1; 피코에리트린 (PE) (벡톤 디킨슨, cat. no. 561741; 최종 희석도 1:25)으로 표지시킨 항-hCD19 클론 HIB19.

[0813] 그 결과가 도 8에 도시된다. 도 8a로부터 관찰될 수 있는 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR은 1 mg/kg의 용량에서 종양 조직량을 효율적으로 감소시켰다. 대조군 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR은 종양 성장을 억제하지 못하였다. 제21일에 종양 조직량을 통계적으로 비교한 결과 (크러스칼 왈리스 시험 후, 던의 다중 비교 사후 시험), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 처리군 내에서의 종양 조직량은 비히클 (PBS)-처리된 동물 내에서보다 상당히 더 낮은 것으로 입증되었다 ($p < 0.01$). bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR 처리군과 비히클 처리군 간의 차이는 유의적이지 않았다 (도 8b).

[0814] 도 8c에서, 유동 세포계수법에 의해 결정된 바와 같은, 상이한 인간 백혈구 집단의 비율 (%)이 표시된다. 순환성 인간 백혈구 ($hCD45^+$ 세포)의 비율 (%)은 모든 군에서 거의 동등한 수준이었다. 그러나, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리된 마우스 내에서의 인간 B 세포의 비율 (%)은 비히클 대조군과 비교해서 강력하게 감소되었다 [$p = 0.0012$, 만 휘트니(Mann Whitney) 시험에 따름]. 대조군 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR로 처리하는 것은 인간 B 세포의 비율 (%)에 영향을 미치지 못하였다. 활성화된 T 세포 ($hCD3^+FSC^{hi}$ 집단)의 비율 (%)은 비히클 대조군과 비교해서, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR로 처리된 마우스에서 증강되었다 ($p=0.0093$, 만 휘트니 시험에 따름). 대조군 이중특이적 항체 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR로 처리하는 것은 활성화된 T 세포의 수를 상당히 변화시키지 못하였다. 이는 CD3xCD20 이중특이적 항체로의 처리 후 T 세포 활성화가 CD3와 CD20 둘 다의 결합성에 의존적이었고, CD3 결합성 단독에는 그렇지 않았다는 것을 표시한다.

[0815] <표 9>

군	항체	용량
1	PBS	
2	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR	1 mg/kg (~ 20 μg)
3	bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	1 mg/kg (~ 20 μg)

[0816]

[0817] **실시예 12 - 시노몰구스 원숭이에서 CD3xCD20 이중특이적 항체의 약리학 및 약동학을 결정하기 위한 시험적 연구**

[0818] 본 발명에 따르는 CD3xCD20 이중특이적 항체 중 하나인 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 시노몰구스 원숭이에서의 B 세포 고갈의 유도, 안전성 프로파일 및 약동학을 다음에 기재된 연구에 따라서 시험하였다.

[0819] 본 연구의 목적은 꼬리 정맥을 통하여 단일 정맥내 주입한 후, 암컷 시노몰구스 원숭이 [모리셔스(Mauritius)로부터 유래되는 마카카 파스시쿨라리스 (*Macaca fascicularis*), 대략 2 내지 3년생; 체중 범위 2.5 내지 3 kg]에게서 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 약동학적 특징, 독성학적 및 약리학적 효과를 결정하는 것이었다. 본 연구는 찰스 리버 라보라토리즈 (Charles River Laboratories; 영국 트라넨트)에서 수행되었다. 이중특이적 분자를 제조하도록 조작시킨 모 IgG1 항체인 IgG1-huCD3-H1L1 및 IgG1-7D8은 시노몰구스 원숭이 CD3 및 CD20과 각각 교차 반응성인 것으로 밝혀졌다. 8마리의 암컷 시노몰구스 원숭이를 4개의 투여군으로 배정하고, 이들에게 10 mL/kg의 일정한 용량 용적으로 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR을 0.01, 0.1, 1 또는 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 각각의 투여군의 1마리 동물을 용량 투여 후 28일에 희생시킨 반면, 각각의 투여군의 두 번째 동물은 이러한 동물 내에서의 B-세포 계수치가 유동 세포계수법에 의해 평가된 바와 같이, 투

여 전 값과 거의 동등한 수준으로 회복된 경우에 (회복 동물) 희생시켰다. 본 연구 동안 적응시킨 실행 및 과정은 영국 보건부에 의해 제시된 바와 같은 OECD 의약품 안전성 시험실시기준과 일치하였다.

[0820] 말초 혈액 중의 B 및 T 세포 집단은 투여 후 상이한 시점에 유동 세포계수법에 의해 분석하였다. 세포 표면 마커 CD19 및 CD21 ($CD19^+CD21^+$ 세포)을 사용하여 B 세포를 확인하였고; 전체 T 세포는 $CD4^+$ 세포와 $CD8^+$ 세포의 합으로서 평가하였다. 도 9a에 도시된 바와 같이, 1 및 10 mg/kg의 용량 수준으로 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR을 투여하면 순환성 B 세포가, 측정된 제1 시점 (투여 후 1일) 정도에 검출 가능하지 않은 수준으로 고갈되었다. 0.01 및 0.1 mg/kg의 용량 수준은 단지 부분적 고갈을 나타냈거나 또는 고갈을 전혀 나타내지 않았다. B-세포 고갈은 1 mg/kg 투여군에서 투여 후 4주 내지 6주 (28일 내지 42일)까지 유지된 다음, 투여 후 9주 (63일)에 B-세포 수준이 투여 전 수준으로 도달하여 회복되었다. 10 mg/kg 투여군에서는, B-세포 수준의 회복이 단지 투여 후 9주 내지 10주 (70일)에 시작되었다. 모든 투여군에서 투여 후 1일에 순환성 T 세포 수의 일시적 감소가 관찰되었다 (도 9b). T-세포 수준은 제3일에 수행된 그 다음 측정에서 투여 전 수준으로 회복되었고, 실험이 종료될 때까지 일정하게 유지되었다.

[0821] 생검 (대략 20 mg)은 투여 후 상이한 시점에, 모든 동물로부터의 표재 림프절 (왼쪽 및 오른쪽 사타구니 및 겨드랑이)로부터 채취하였다. 생검을 균질화시키고, 전체 림프구 집단 [전방 산란 측 산란 (FSC-SSC)에 근거하여 확인됨]의 비율 (%)로서 B 및 T 세포의 빈도를 유동 세포계수법에 의해 평가하였다. 세포 표면 마커 CD19 및 CD21을 사용하여 B 세포를 확인하였고 ($CD19^+CD21^+$ 세포); 전체 T 세포는 $CD4^+$ 세포와 $CD8^+$ 세포의 합으로서 평가하였다. 도 9c에 도시된 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR을 투여하면, 1 및 10 mg/kg의 용량 수준에서 측정된 제1 시점 (투여 후 7일)에 B 세포가 검출 가능하지 않은 수준으로 고갈되었다. B-세포 고갈은 이들 투여군에서 투여 후 7주까지 유지된 다음, B-세포 수준을 회복하였는데, 투여 후 13주 내지 14주 (84일 내지 95일)에도 아직 완료되지 않았다. 0.01 및 0.1 mg/kg의 용량 수준은 투여 후 16일에 최대 B-세포 고갈을 유도시켰는데, 투여 (0.01 mg/kg) 후 28일에 완전한 회복이 관찰되거나 또는 투여 (0.1 mg/kg) 후 14주 (95일)에 부분적 회복이 관찰되었다. 임의의 용량 수준에서는 림프절에서 T 세포 빈도의 주요 변화가 관찰되지 않았다 (도 9d).

[0822] 혈장 샘플을 대상으로 하여 표준 분석 방법을 이용하여 시토카인 수준 (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ 및 TNF-α)에 관하여 분석하였다. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR을 투여하면, 혈장 시토카인 수준 상의 일시적 증가가 유도되었는데, 이는 용량-의존적인 것으로 여겨진다 (도 9e). 모든 시토카인 수준은 투여 후 24시간에 투여 전 수준으로 회복되었다.

[0823] bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 약동학적 프로파일은 투여 전에 수득된 혈장 샘플 및 투여 후 70일까지의 각종 시점에서 수득된 혈장 샘플을 분석함으로써 평가하였다. 이중특이적 항체의 총 농도는 면역 PCR에 의해 결정되었다. 약동학적 파라미터는 비-구획 분석 [포이닉스 윈논린(Phoenix WinNonLin)]에 의해 계산되었다. 그 결과가 표 10에 제시된다. 용량-정규화된 $AUC_{0-\infty}$ 값 ($AUC_{0-\infty}$/용량)은 혈장 노출에 있어서의 비선형 증가를 표시한다. 이들 $AUC_{0-\infty}$ 값에 있어서 비례적 증가보다 더 크다는 것은 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 표적-매개된 클리어런스를 표시한다. 또한, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 약동학적 프로파일은 시노몰구스 원숭이에 투여된 전형적인 IgG1-유형 모노클로날 항체와 비교해서 더 신속한 초기 분포 및 클리어런스를 나타낸다 (도 9f).

[0824] 또한, 시노몰구스 혈청 중의 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR에 대한 항-약물 항체 (ADA) 반응을 측정하였다 (데이터는 제시되지 않음). 제15일 이후부터 10 mg/kg 동물을 제외한 모든 동물에 대해서 ADA 반응이 관찰되었다.

[0825] <표 10>

[0826] **시노몰구스 원숭이에서 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR의 약동학적 특징**

파라미터	단위	처리 용량 (#은 개개의 동물 식별자를 표시한다)							
		0.01 mg/kg		0.1 mg/kg		1 mg/kg		10 mg/kg	
		#151	#157	#152	#158	#153	#159	#154	#160
C_{max}	ng/mL	7.26	10.73	478.5	364.6	36249	29154	364508	286869
C_{max}/용량	kg*ng/mL/mg	725.8	1074	4785	3646	36249	29154	36451	28687
t_{max}	일	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
$AUC_{0-\infty}$	ng* 일/mL	0.991	1.385	82.43	43.31	22559	14837	756967	471203
$AUC_{0-\infty}$/용량	kg*ng* 일/mL/mg	99.06	138.52	824.4	433.1	22559	14837	75697	47120
Vd	mL	30787	15797	4232	5078	114.5	136.3	42.2	100.9

[0827]

[0828] 투여군당 각각의 원숭이에 대한 데이터가 별도로 제시된다 (원숭이 수는 상기 칼럼에 표시되었다).

[0829] **실시예 13 - CD3xCD20 이중특이적 항체의 결합에 관여한 CD20 아미노산의 확인**

[0830] 이전의 연구는 CD20의 세포외 루프 내의 위치 170에서의 알라닌 잔기 (A170) 및 특히 위치 172에서의 프롤린 잔기 (P172)가 리툭시맙에 의한 CD20의 인식에 매우 중요하다는 것을 나타내었다 (Polyak et al. 2002, Blood 99:3256-3262; Perosa et al. 2005, Blood 107:1070-1077). 리툭시맙은 CD20 세포외 도메인 내에 A170S 및 P172S 돌연변이 ("AxP 돌연변이")의 도입시 HEK293F에서 발현된 CD20과의 결합성을 완전히 상실하였다. 마우스 mAb B1은 또한, 잔여 결합성이 관찰되긴 하였지만, AxP 돌연변이체에 대한 강력하게 저하된 결합성을 나타내었다. 이와는 반대로, CD20에 대한 IgG1-2F2, IgG1-7D8 및 IgG1-2C6의 결합성은 AxP 돌연변이에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나, 위치 163 또는 166에서의 아스파라긴 잔기를 아스파르트산으로 변화시키면 (각각 N163D 또는 N166D), IgG1-2C6의 결합성이 완전히 없어졌고, IgG1-2F2 및 IgG1-7D8의 결합성이 75% 이하 만큼 감소되었다. N163D 및 N166D 돌연변이 이외에도, 위치 159에서 트레오닌이 리신으로 변화되는 돌연변이 (T159K)를 수반한 삼중 돌연변이체 (T159K/N163D/N166D, "KDD 돌연변이")는 2F2, 7D8 및 2C6의 결합성을 없앴다. KDD 돌연변이는 리툭시맙 및 B1의 결합성에 대하여 단지 사소한 효과만을 나타냈다 (Teeling et al. 2006, The Journal of Immunology 177:362-371).

[0831] 야생형 (wt) CD20, AxP 돌연변이체 및 KDD 돌연변이체에 대한 CD3xCD20 이중특이적 항체의 결합성을 조사하기 위하여, 제한 부위를 도입하는 적합한 프라이머 및 최적의 발현을 위한 이상적인 코작(Kozak) 서열을 사용하여 CD20 코딩 서열을 증폭시킴으로써 CD20 발현 벡터를 구축하였다. 이와 같이 증폭시킨 단편을 소화시키고, 발현 벡터 pEE12.4 (론자; 영국 슬라우)에서 라이게이션하였다. 이. 콜라이에서 형질전환시킨 후, 집락을 대상으로 하여 삽입물에 대하여 스크리닝하고, 정확한 서열을 확증하기 위한 서열 분석을 위하여 2개의 클론을 선택하였다. 이러한 구축물은 pEE12.4CD20HS-GA로 명명되었다. 돌연변이유발을 수행하여 인간 CD20의 세포외 루프 영역 내에 AxP 또는 KDD 돌연변이를 도입하였다. 제한 효소 소화 및 서열 분석에 의해 돌연변이유발을 검사하였다. 구축물을 HEK293F 세포에서 일시적으로 발현시키고, 유동 세포계수법을 이용하여 형질감염 후 24시간에 분석하였다.

[0832] 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머: 올리고뉴클레오티드 프라이머를 합성하고 이소겐(Isogen) BV [마르센(Maarssen; 네덜란드)]에 의해 정량화하였다. 프라이머를 수 중에서 100 pmol/μL의 농도로 재구성하고, 사용할 때까지 -20℃ 하에 저장하였다. PCR 및 서열 분석 프라이머의 요약이 표 11에 제시된다.

[0833] 핵산의 광학 밀도 결정: 광학 밀도는 제조업자의 지시에 따라서 울트로스펙(Ultrospec) 2100 프로 클래식 [아머샴 바이오사이언스 (Amersham Biosciences; 스웨덴 웁살라)]을 이용하여 결정되었다. OD260 nm를 분석함으로써 DNA 농도를 측정하였는데, 여기서 1 OD260 nm 단위는 50 μg/mL이다. 참조 용액은 핵산을 용해시키기 위해 사용된 용액과 동일하였다.

[0834] 이. 콜라이 배양물로부터 플라스미드 DNA 단리: 플라스미드 DNA는 제조업자의 지시에 따라서 퀴아젠 (Qiagen) [웨스트부르크 BV (Westburg BV; 네덜란드 로이스덴)]으로부터의 키트를 이용하여 이. 콜라이 배양물로부터 단리하였다. '벌크' 플라스미드 제조를 위하여, 하이-스피드 플라스미드 맥시 키트 또는 하이-스피드 플라스미드

미디 키트 중 하나를 사용하였다 (퀴아젠). 소규모 플라스미드 제조 (즉, 2 mL의 이. 콜라이 배양물)를 위하여, 퀴아프렙 스핀 미니프렙(Qiaprep Spin Miniprep) 키트 (퀴아젠)를 사용하고 DNA를 50 μL TE (트리스-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM)에 용출시켰다.

[0835] PCR 증폭: PCR 반응은 Pfu-터보(Turbo©) 핫스타트(Hotstart) DNA 폴리머라제 (스트라타젠; 네덜란드 암스테르담)에 대한 제조업자의 지시에 따라서 수행하였다. 각각의 20 mL-반응물은 1 x PCR 반응 완충제, 200 mM 혼합된 dNTP, 6.7 pmol의 각각의 정방향 및 역방향 프라이머, 대략 1 ng 주형 DNA 및 1 단위의 Pfu-터보© 핫스타트 DNA 폴리머라제를 함유하였다. PCR 반응은 +95℃에서 2분 동안의 30주기 프로그램에 이어, +95℃에서 30초의 30주기; 어닐링: 30초 동안 45 내지 65℃의 구배 및 연장: +72℃에서 2분에 이어, 72℃에서 10분 동안의 최종 연장 단계 및 4℃에서의 후속 저장을 이용하여 T-구배 서모사이클러 96 [바이오메트라 게엠베하 (Biometra GmbH; 독일 괴팅겐)] 상에서 수행하였다. 이와 같이 완료된 반응을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다.

[0836] 아가로스 겔 전기영동: 아가로스 겔 전기영동은 1 x 트리스/아세트산/EDTA (TAE) 완충제 중에서 50 mL의 겔을 이용하여 문헌 [Sambrook, Molecular Cloning Laboratory Manual, 3rd edition]에 따라서 수행하였다. 에티듐 브로마이드를 겔에 봉입시키고 자외선하에 관찰함으로써 DNA를 가시화하였다. 겔 영상을 CCD 카메라 및 영상 분석 시스템 [진그놈(GeneGnome); 신젠 (Syngene; 영국 케임브리지)]에 의해 기록하였다.

[0837] 제한 효소 소화: 제한 효소는 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs; 미국 매사추세츠주 베벌리)에 의해 공급되었고, 이러한 공급업자의 권장 사항에 따라서 사용되었다. 일반적으로, 100 ng을 10 mL의 최종 용적으로 적절한 완충제 중의 5 단위의 효소(들)를 이용하여 소화시켰다. 반응 용적을 적절한 수준으로 확대시켰다. 소화물을 제조업자가 권장한 온도에서 최소 60분 동안 인큐베이션하였다.

[0838] 비화합성 완충제 또는 온도 요구 사항을 나타내는 제한 효소를 이용하여 이중 소화시킬 필요가 있는 단편에 대해서는, 궁극적으로 각각의 효소에 대해 바람직한 조건을 제공하도록 소화를 순차적으로 수행하였다.

[0839] 알칼리성 포스파타제 처리: 새우 알칼리성 포스파타제 (USB; 미국 오하이오주 클리블랜드)를 공급업체의 권장 사항에 따라서 사용하였다. 알칼리성 포스파타제는 DNA 단편의 말단으로부터 5'-포스페이트 기를 제거함으로써, 자가 라이게이션을 방지시킨다. 이는 DNA 단편의 자가 리라이게이션으로 인해 복제 적격한 벡터가 생성될 수 있는 경우에 특히 관련이 있다. 상기 효소는 대부분의 제한 효소 완충제에서 활성이 있고, 이를 적당히 부가하였다. 소화 후, 온도를 15분 동안 70℃로 상승시킴으로써 상기 효소를 불활성화시켰다.

[0840] PCR 및 제한 효소 반응 생성물의 정제: 정제는 제조업자의 지시에 따라서 미니-용출 PCR 정제 키트 (퀴아젠에 의해 공급됨)를 이용하여 수행하였다. 간략하게 언급하면, DNA 샘플을 5 용적의 결합 완충제 I (퀴아젠)에 희석시키고, 에펜도르프(Eppendorf) 원심분리용 튜브 내의 미니-용출 칼럼 상으로 부하하였다. 어셈블리를 벤치-탑 미소원심분리기에서 원심분리시켰다. 칼럼을 완충제 II (퀴아젠)로 2회 세척하였다: 완충제 적용 후, 어셈블리를 원심분리시키고, 관류물을 폐기하였다. 부가된 완충제의 부재하에 원심분리함으로써 칼럼을 건조시켰다. 용출 완충제를 상기 칼럼에 부가함으로써 DNA를 용출시키고, 이러한 용출액을 원심분리시킴으로써 수집하였다. 단리된 DNA를 UV 분광법에 의해 정량화하고, 그 질을 아가로스 겔 전기영동에 의해 평가하였다.

[0841] 아가로스 겔로부터 DNA 단편의 단리: 적절한 경우 (즉, 다수의 단편이 존재하는 경우), 소화된 DNA 샘플을 겔 전기영동에 의해 분리시키고, 목적하는 단편을 상기 겔로부터 절단한 다음, 제조업자의 지시에 따라서 QIAEX II 겔 추출 키트 (퀴아젠)를 이용하여 회수하였다. 간략하게 언급하면, DNA 밴드를 아가로스 겔로부터 절단시키고, 이를 +55℃에서 적절한 완충제에 용융시켰다. QIAEX II 수지를 부가하고, 5분 동안 인큐베이션하였다. QIAEX II 수지를 짧은 원심분리 단계 (1분, 14000 g, 실온)에 의해 펠릿화하고, 500 μL의 세척 완충제 PE (cat. no. 19065, 퀴아젠)로 2회 세척하였다. 최종 펠릿을 후드에서 건조시키고, DNA를 적절한 용적의 TE를 이용하여 적절한 온도에서 (DNA의 크기에 좌우된다) 용출시켰다.

[0842] DNA 단편의 라이게이션: 제조업자의 지시에 따라서 퀵 라이게이션 키트 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)를 이용하여 라이게이션을 수행하였다. 각각의 라이게이션에 대하여, 벡터 DNA를 대략 3배 몰 과량의 삽입물 DNA와 혼합하여, DNA의 전체 양이 10 μL에서 200 ng 미만이 되도록 하였는데, 용적은 물을 이용하여 적절하게 조정한다. 이에 10 μL 2 x 퀵 라이게이션 완충제 및 1 μL 퀵 T4 DNA 라이가제를 부가하고, 라이게이션 혼합물을 실온에서 5 내지 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0843] 박테리아 내로의 DNA의 형질전환: DNA의 샘플을 사용하여, 제조업자의 지시에 따라서 열 쇼크 방법을 이용하여 원 샷(One Shot) DH5α-T1R 적격한 이. 콜라이 세포 (인비트로젠; 네덜란드 브레다)를 형질전환시켰다. 간략하게 언급하면, 1 내지 5 μL의 DNA 용액 (전형적으로 2 μL의 DNA 라이게이션 혼합물)을 형질전환 적격한 박테리

아 세포의 분취액에 부가하고, 혼합물을 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 30초 동안 42℃ 하의 수욕으로 옮김으로써 열 쇼크시킨 다음, 얼음 위에서 5분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 37℃에서 1시간 동안 진탕시키면서 비-선택적 배양 배지 (SOC)에서 인큐베이션함으로써 세포를 회복하게 방치시키고, 연속해서 적절한 선택제 (50 μg/ml 하의 앰피실린)를 함유하는 아가 플레이트 상으로 확산시켰다. 플레이트를 +37℃에서 16 내지 18시간 동안 또는 박테리아 집락이 눈에 띌때까지 인큐베이션하였다.

[0844] PCR에 의한 박테리아 집락의 스크리닝: 박테리아 집락을 대상으로 하여 PCR 집락 스크리닝 기술을 이용하여 목적하는 서열을 함유하는 벡터의 존재에 관하여 스크리닝하였다. 0.5 용적의 핫스타Taq 마스터 혼합물 (퀴아젠), 4 pmol의 정방향 및 역방향 프라이머를 함유하고 물을 이용하여 완성시킨 20 μL의 PCR 반응 혼합물을 PCR 튜브에 부가하였다. 집락을 20 μL 피펫 팁으로 가볍게 접촉시키는데, 배양 튜브 내의 2 mL LB 중에서 1회 접촉시키고 (상응하는 플라스미드를 함유하는 박테리아의 성장을 위함), 이를 20 μL PCR 혼합물에 재현탁시켰다. PCR은 +95℃에서 15분 동안의 35주기 프로그램에 이어, +94℃에서 30초의 35주기; 어닐링: 30초 동안 55℃ 및 연장: +72℃에서 2분에 이어, 72℃에서 10분 동안의 최종 연장 단계 및 4℃에서의 후속 저장을 이용하여 T-구배 서모사이클러 96 (바이오메트라) 상에서 수행하였다. 이와 같이 완료된 반응을 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 집락 PCR에 사용된 프라이머 쌍에 관한 상세 내역은 표 11을 참조할 수 있다.

[0845] DNA 서열 분석: 서열 분석을 위하여 플라스미드 DNA 샘플을 AGOWA (독일 베를린)로 보냈다. 벡터NTI 소프트웨어 패키지 [인포맥스 (Informax; 미국 메릴랜드주 프레더릭)]를 이용하여 서열을 분석하였다.

[0846] <표 11>

명칭	길이	올리고 서열
CD20hs-GA-A170S-P172SR	42	GGGAGTTCTTCTCGCTGCTGTTGCTGGGCTCGCAGTTGTAGA
CD20hs-GA-A170S-P172SF	42	TCTACAACTGCGAGCCCAGCAACAGCAGCGAGAAGAACTCCC
CD20hs-GA-T159K-N163D-N166D R	43	CTCGCAGTCGTAGATGTCGATGTAGGGCTTGTGGGCCCGGATG
CD20hs-GA-T159K-N163D-N166D F	43	CATCCGGGCCCACAAGCCCTACATCGACATCTACGACTGCGAG

[0847]

[0848] 돌연변이유발: 제조업자의 지시에 따라서 퀵체인지(QuikChange®) XL 부위 지정 돌연변이유발 키트 (Cat 200517-5, 로트 1120630, 스트라타젠 유럽)를 이용하여 돌연변이유발을 수행하였다.

[0849] 에탄올 침전을 이용하여 돌연변이유발 반응물을 농축시키고, 원샷 DH5α-TIR 적격한 이. 콜라이 세포 내로 형질전환시키거나 또는 일렉트로텐-블루(ElectroTen-Blue®) 전기천공-적격한 세포 내로 전기천공시켰다. 형질감염 이전에 제한 소화 및 집락 PCR에 의해 집락을 검사하였다.

[0850] HEK293F 세포 형질감염: HEK293F 세포를 인비트로젠으로부터 수득하고, 293펙틴을 이용하여 제조업자의 지시에 따라서 형질감염시켰다.

[0851] 항-CD20 항체 결합성: HEK293F 세포를 염색 완충제 (0.1% BSA 및 0.02% NaN_3이 보충된 PBS)에 도입하고, 이를 환저 플레이트에 부가하였다 (100 μL 중 1 내지 3 x 10^5/웰). 이어서, 50 μL CD3xCD20 이중특이적 항체를 일련의 희석물 (0.0015 내지 10 μg/mL, 3배 희석물)에 부가하였다 (4℃, 30분).

[0852] 염색 완충제에서 2회 세척한 후, 세포를 4℃에서 30분 동안 50 μL 2차 항체에서 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')2를 상기 언급된 바와 같이 사용하였다. 그 다음, 세포를 염색 완충제에서 1회 세척하고, 150 μL 염색 완충제에 재현탁시키며, 유동 세포계수기 (FACSCanto-720, 벡톤 디킨슨; 미국 캘리포니아주 샌디에이고) 상에서 분석하고, 샘플당 10,000개 현상을 높은 유속으로 획득하

였다. 그래프패드 프리즘 V75.04 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)를 사용하여, 비-선형 회귀 (가변 기울기를 수반한 S자 모양의 용량 반응)를 이용하여 결합 곡선을 분석하였다.

[0853] 모든 CD3xCD20 이중특이적 항체는 WT CD20을 발현하는 HEK293F 세포와 효율적으로 결합하였다 (도 10A). 도 10B 및 표 12에 제시된 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR은 AxP 돌연변이체와 효율적으로 결합하였다. 유사하게, bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR 및 bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR은 CD20-AxP에 대한 효율적인 결합성을 나타냈다. 예상된 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR은 AxP 돌연변이체에 대한 결합성을 완전히 상실하였는데, 이는 모 항체 IgG1-RTX에 대하여 기존에 나타난 바와 같았다. BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR은 CD20-AxP에 대한 결합성이 크게 저하된 것으로 나타났다.

[0854] BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR 및 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR 뿐만 아니라 bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR 및 bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR은 KDD 돌연변이의 도입시 CD20에 대한 결합성을 상실하였는데 (표 12), 이는 CD20과 1가적으로 결합하는 이들 이중특이적 항체가 모 항체 IgG1-7D8, IgG1-2F2 및 IgG1-2C6 각각과 거의 동등한 수준의 결합성 특징을 나타냈다는 것을 확증시켜 준다. BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 및 bsIgG1-huCLB-3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR은 KDD 돌연변이가 존재하는 경우에, CD20에 대한 결합성을 부분적으로 상실하였다.

[0855] <표 12>

[0856] **CD20 돌연변이체에 대한 CD3xCD20 이중특이적 항체의 결합성.**

[0857] HEK293F 세포에서 발현된 CD20 돌연변이체에 대한 CD3xCD20 이중특이적 항체의 결합성은 유동 세포계수법에 의해 결정되었다. 수치는 10 μg/mL에서 야생형 CD20에 대한 결합성과 비교한, CD20 돌연변이체에 대한 결합성의 비율 (%)을 표시한다. 결합성의 비율 (%)은 다음 공식으로써 계산되었다: (CD20 돌연변이체에 대한 MFI 결합성)/(CD20 wt에 대한 MFI 결합성) x 100%

CD3xCD20 이중특이적 항체	**CD20 돌연변이체에 대한 결합성 (wt CD20 결합성의 %)**	
	KDD	**AxP**
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	4	103
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR	4	98
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR	67	95
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR	3	92
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR	87	11
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR	108	57
BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-7D8-FEAR	3	113
BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-2F2-FEAR	5	112
BsIgG1-huCLB-T3/4-FEALxCD20-11B8-FEAR	54	118

[0858]

[0859] **실시예 14 - 바이오-층 간섭계를 이용한 CD3 결합 친화도의 결정**

[0860] CD3에 대한 CD3xCD20 이중특이적 항체의 친화도를 결정하기 위하여, 바이오-층 간섭계를 포르테바이오 옥텟 HTX 상에서 수행하였다. 항-인간 Fc 포획 (AHC) 바이오센서 (포르테바이오; 영국 포츠머스; cat no. 18-5060)에, 1 nm의 부하 반응을 목표로 하여 CD3xCD20 이중특이적 항체 (1 μg/mL)를 600 s 동안 부하하였다. 기준선 (200 s) 후, 1 nM 내지 1000 nM 범위의 농도를 이용하여, 가용성 CD3ε27-GSKa의 회합 (1000 s) 및 해리 (2000 s)를 결정하였다. CD3ε27-GSKa 단백질은 카파 LC의 N-말단과 융합된 인간 CD3ε 펩티드 (aa1-27) (서열식별번호: 402)로 이루어진다. 계산을 위하여, 아미노산 서열에 근거한 CD3ε27-GSKa의 이론적 분자량, 즉 27.1 kDa를 사용하였다. 30℃에서 진탕 조건 (1,000 rpm) 하에 실험을 수행하였다.

[0861] 1000 s 회합 시간 및 200 s 해리 시간을 이용한 포괄적인 완전 피트 및 1:1 모델을 이용하여, 포르테바이오 데이터 분석 소프트웨어 v8.1로 데이터를 분석하였다. 참조 곡선 (CD3ε27-GSKa를 수반하지 않은 CD3xCD20 이중특이적 항체)을 공제함으로써 데이터 추적물을 보정하였고, Y-축을 기준선의 마지막 10 s에 대해 정렬시키며,

단계간 보정뿐만 아니라 사비츠키-골레이(Savitzky-Golay) 필터링을 적용하였다. 0.05 nm 미만의 반응을 나타내는 데이터 추적물은 분석으로부터 배제시켰다.

[0862] CD3xCD20 이중특이적 항체의 평형 해리 상수 (K_D)는 모두, 모 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL 분자의 K_D의 2배 이내였다.

[0863] <표 13>

[0864] **선택된 CD3xCD20 이중특이적 항체에 대한 평형 해리 상수 (K_D), 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{dis})**

[0865]

항체 ID	K_D (M)	k_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IgG1-huCD3-H1L1-FEAL	1.4E-08	3.2E+05	4.5E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2F2-FEAR	1.5E-08	2.7E+05	4.1E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-GA101-FEAR	1.5E-08	2.7E+05	4.0E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR	1.2E-08	4.1E+05	4.8E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-2C6-FEAR	0.81E-08	3.3E+05	2.7E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-RTX-FEAR	1.1E-08	3.9E+05	4.3E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR	1.1E-08	3.8E+05	4.3E-03
BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-b12-FEAR	2.1E-08	1.7E+05	3.7E-03

[0866] **실시예 15 - BsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR은 B 세포의 존재하여 T 세포 활성화를 유도시킨다**

[0867] B 세포의 존재하에 T 세포의 활성화를 유도시킬 수 있는 CD3xCD20 이중특이적 항체의 능력은, PBMC를 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR과 함께 인큐베이션함으로써 시험하였다. T 세포 활성화는 CD69 발현을 측정함으로써 평가하였다.

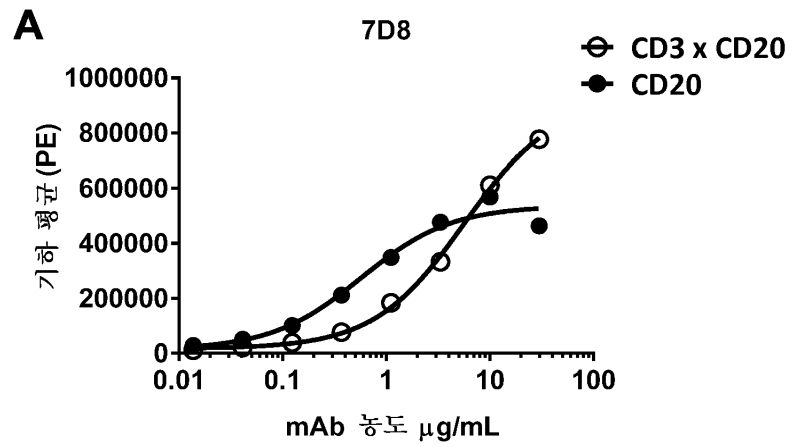
[0868] 상기 언급된 바와 같이 건강한 공여자로부터 단리된 PBMC를 96-웰 환저 배양 플레이트 (가이너 바이오-원, cat 650180; 100,000개 세포/웰)에 부가하고, $RPMI^{++}$ 에 희석된 (최종 항체 농도 0.1 내지 1,000 ng/mL) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR과 함께 인큐베이션하였다. 각각의 웰에서의 최종 용적은 100 μL였다. IgG1-huCD3-H1L1-FEAL 및 IgG1-huCLB-T3/4-FEAL (둘 다는 불활성 Fc 도메인을 수반한 2가의 CD3-특이적 IgG1 항체이다)뿐만 아니라 이소형 대조군 항체 IgG1-b12-FEAL이 음성 대조군 항체로서 포함되었다. IgE-huCLB-T3/4 (T 세포의 활성화를 유도시키는 것으로 공지되는 2가 CD3-특이적 IgE 항체), 및 IgG1-huCLB-T3/4-F405L (활성 Fc 도메인을 수반한 2가 CD3 특이적 IgG1 항체)이 양성 대조군 항체로서 포함되었다. PBMC를 항체와 함께 16 내지 24시간 동안 인큐베이션하였다 (37℃, 5% CO_2).

[0869] T 세포 활성화를 평가하기 위하여, PBMC를 염색 완충제에서 2회 세척하고, APC-표지된 마우스 항-인간 CD69 항체 [BD 파르민겐(Pharmingen), cat 340560; 최종 희석도 1:100] 및 PE-표지된 마우스 항-인간 CD28 항체 (밀테니 바이오테크, cat 130-092-921; 최종 희석도 1:40)를 함유하는 염색 완충제 (최종 용적 50 μL)에 재현탁시켰다. 4℃ 하에 30분 후, 세포를 2회 세척하였다. 세포를 150 μL 염색 완충제에 재현탁시키고, FACS Canto II (BD)를 이용하여 분석하였다. CD28-양성 세포의 집단 내에서 APC (CD69)의 중앙 형광 강도를 평가하였다. T 세포를 확인하기 위한 마커로서 CD28을 사용하였다.

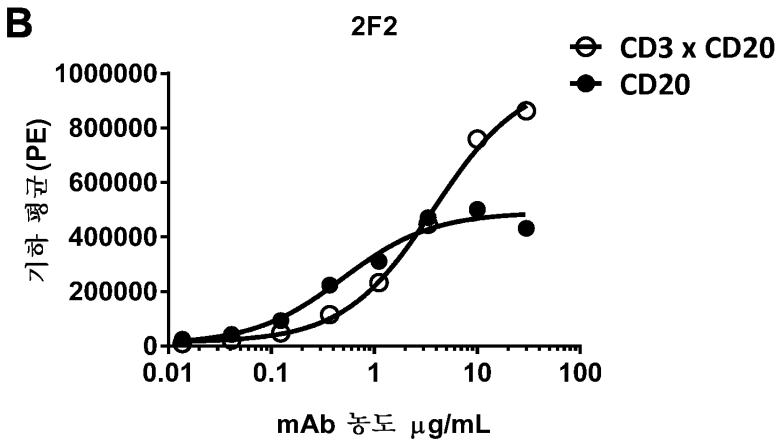
[0870] 도 11에 도시된 바와 같이, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR은 말초 혈액 T 세포에서 CD69 발현 상의 증가로써 표시된 바와 같이, T 세포의 용량-의존적 활성화를 유도시켰다. 양성 대조군 항체 IgE-huCLB-T3/4 및 IgG1-hu-CLB3/4-F405L과 함께 인큐베이션한 후에도 T 세포 활성화가 관찰되었다. 이와는 반대로, 음성 대조군 항체 IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, IgG1-huCLB-T3/4-FEAL 및 IgG1-b12-FEAL은 CD69 발현을 유도시키지 못하였다.

도면

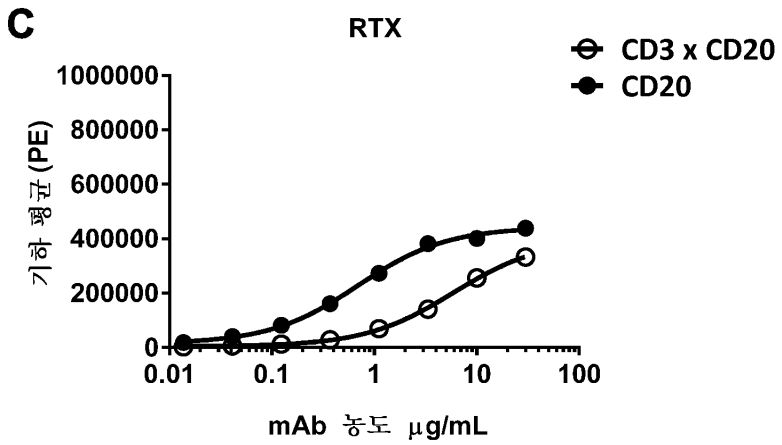
도면1a



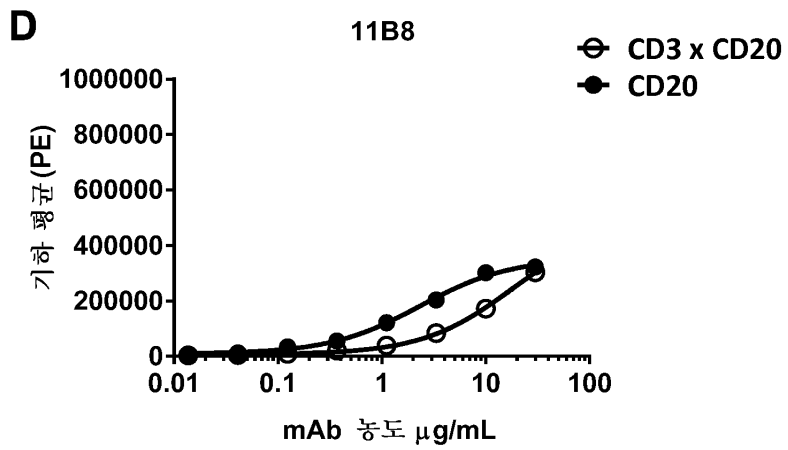
도면1b



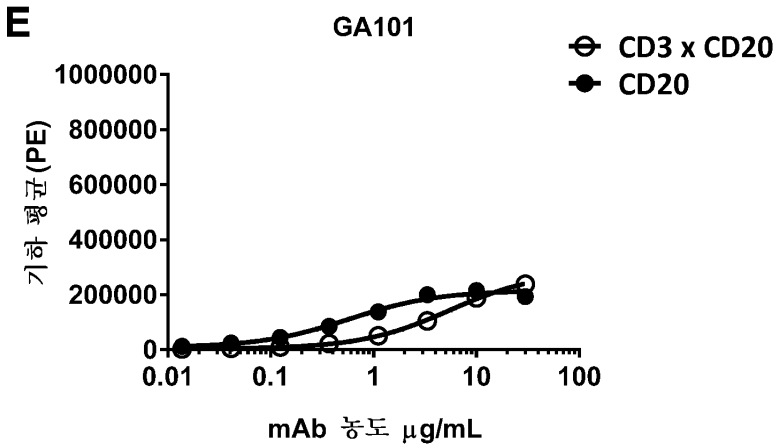
도면1c



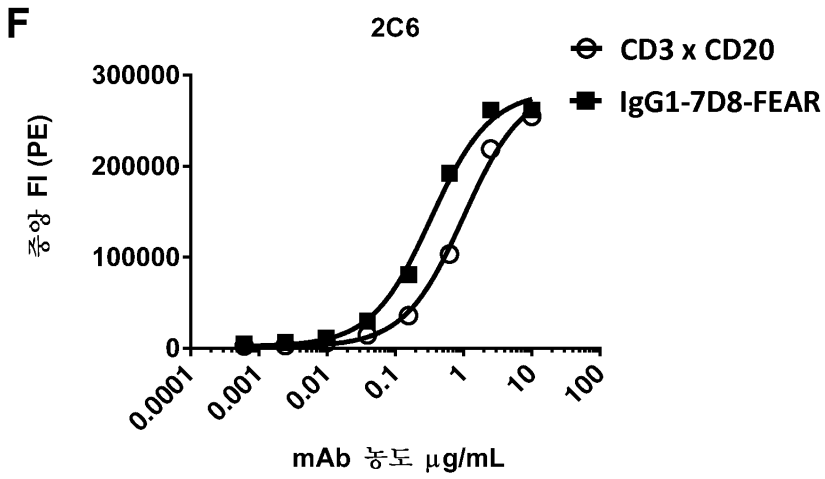
도면1d



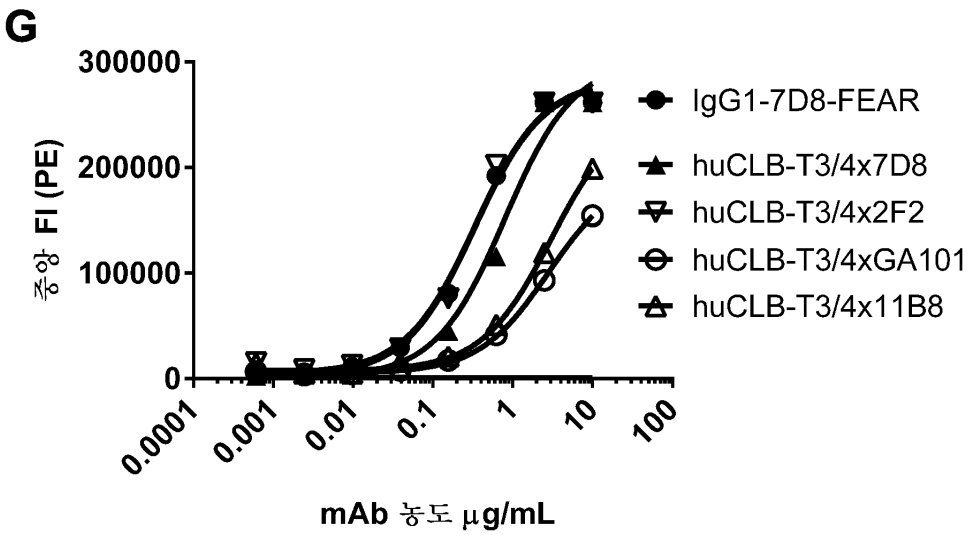
도면1e



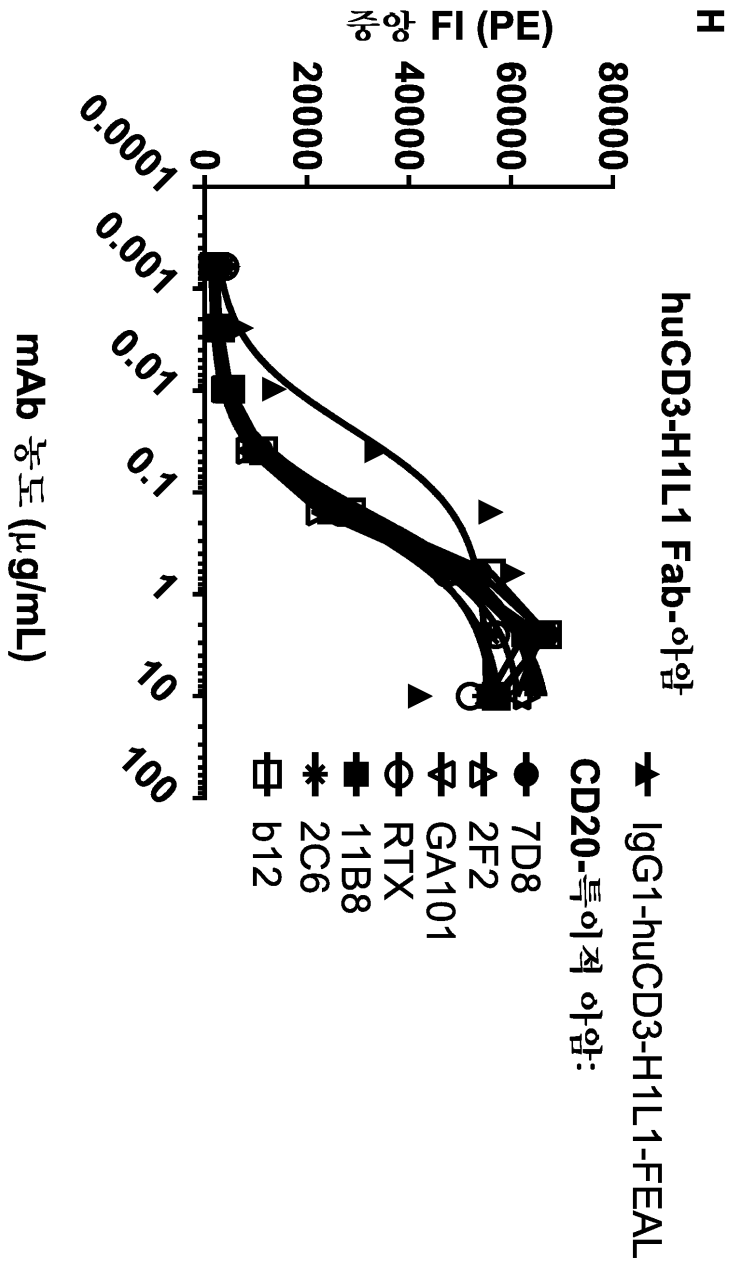
도면1f



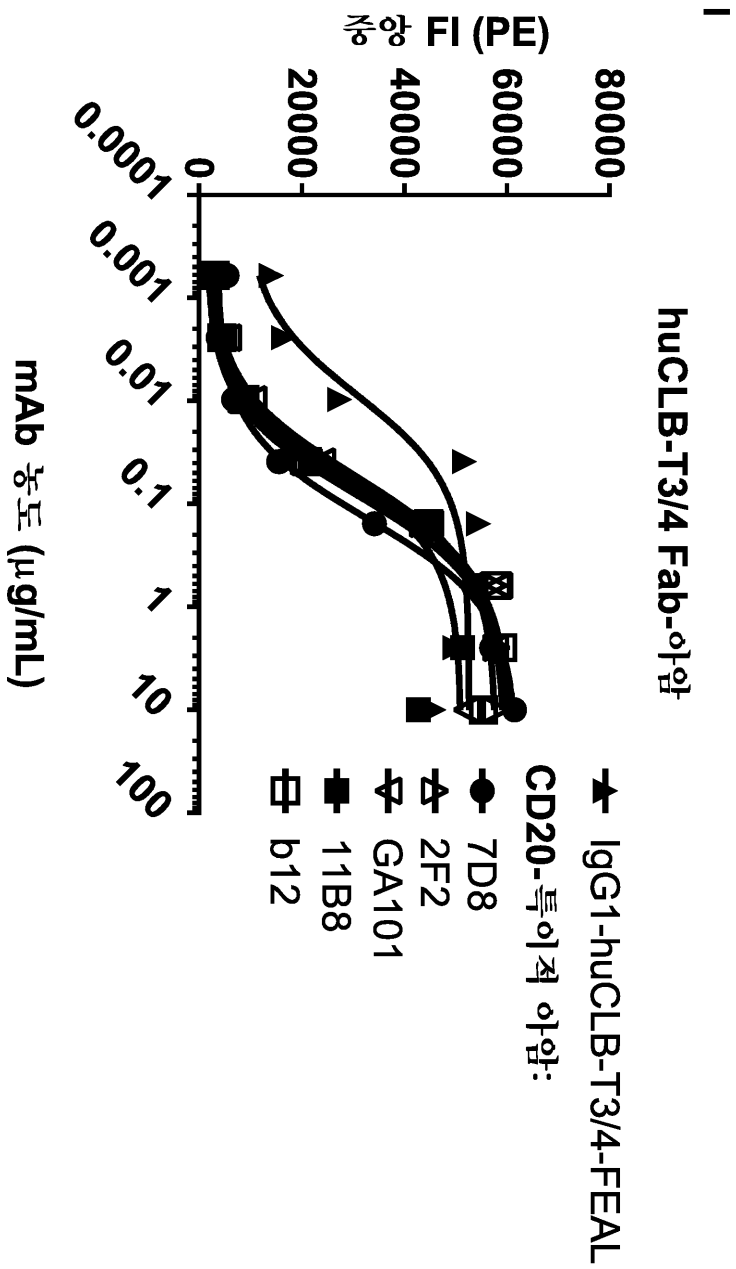
도면1g


G
300000
200000
100000
0
중앙 FI (PE)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 μg/mL
IgG1-7D8-FEAR
huCLB-T3/4x7D8
huCLB-T3/4x2F2
huCLB-T3/4xGA101
huCLB-T3/4x11B8

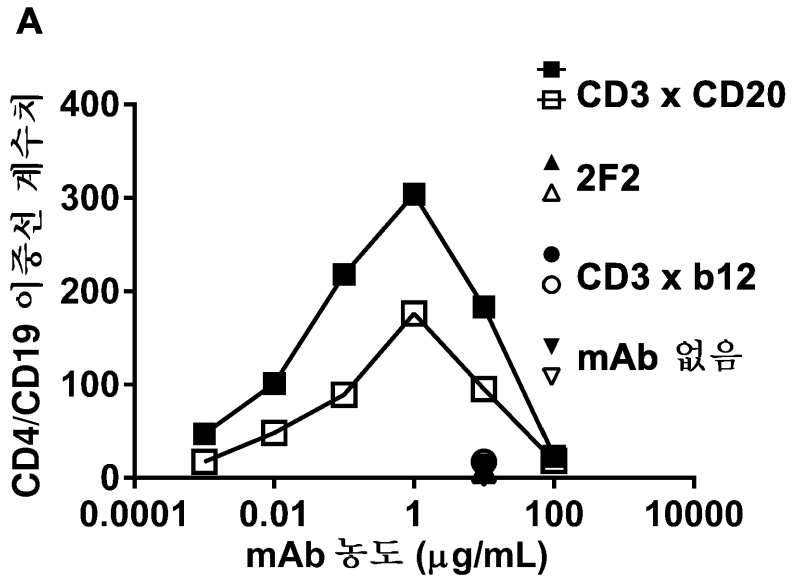
도면1h


H
중앙 FI (PE)
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)
huCD3-H1L1 Fab-아암
IgG1-huCD3-H1L1-FEAL
CD20-특이적 아암:
7D8
2F2
GA101
RTX
11B8
2C6
b12

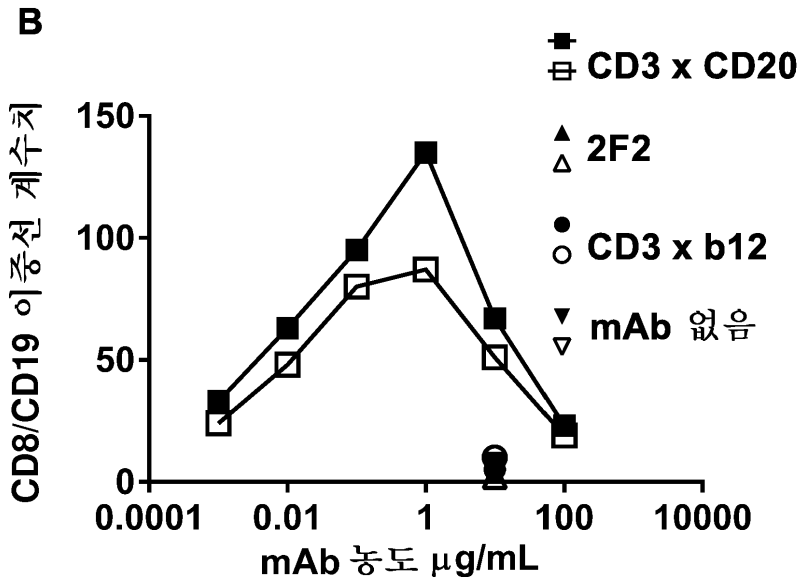
도면1i


I
huCLB-T3/4 Fab-아암
중앙 FI (PE)
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)
IgG1-huCLB-T3/4-FEAL
CD20-특이적 아암:
7D8
2F2
GA101
11B8
b12

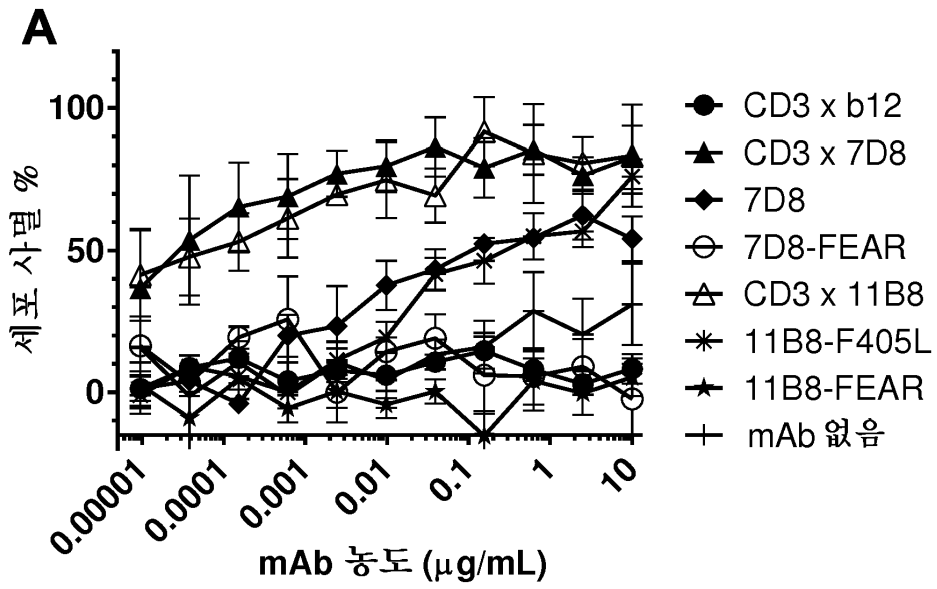
도면2a


A
CD4/CD19 이중선 계수치
400
300
200
100
0
0.0001
0.01
1
100
10000
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x CD20
2F2
CD3 x b12
mAb 없음

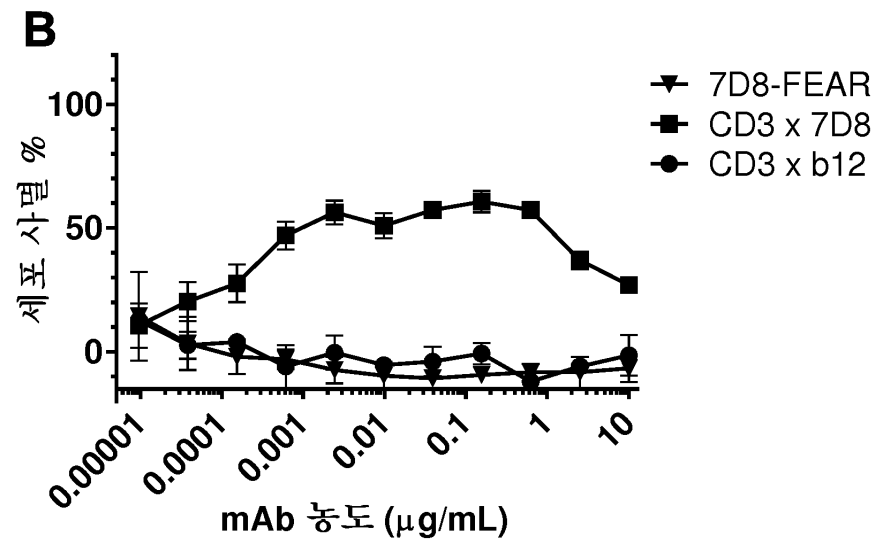
도면2b


B
CD8/CD19 이중선 계수치
150
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
10000
mAb 농도 μg/mL
CD3 x CD20
2F2
CD3 x b12
mAb 없음

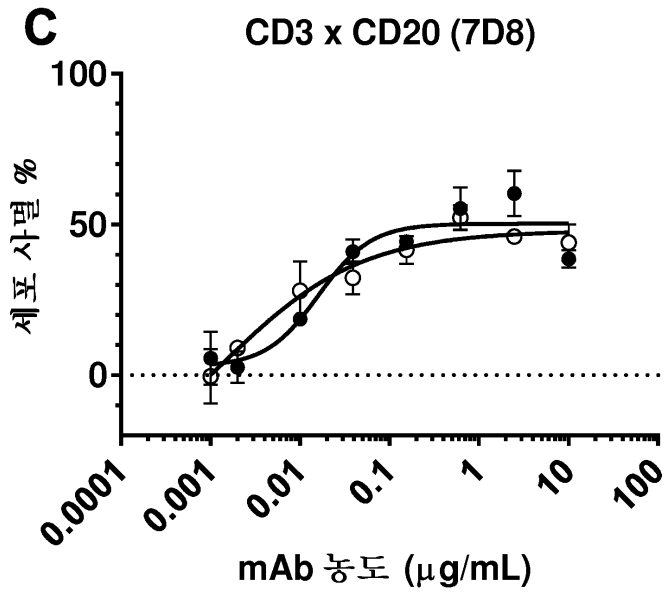
도면3a


A
100
50
0
세포 사멸 %
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x b12
CD3 x 7D8
7D8
7D8-FEAR
CD3 x 11B8
11B8-F405L
11B8-FEAR
mAb 없음

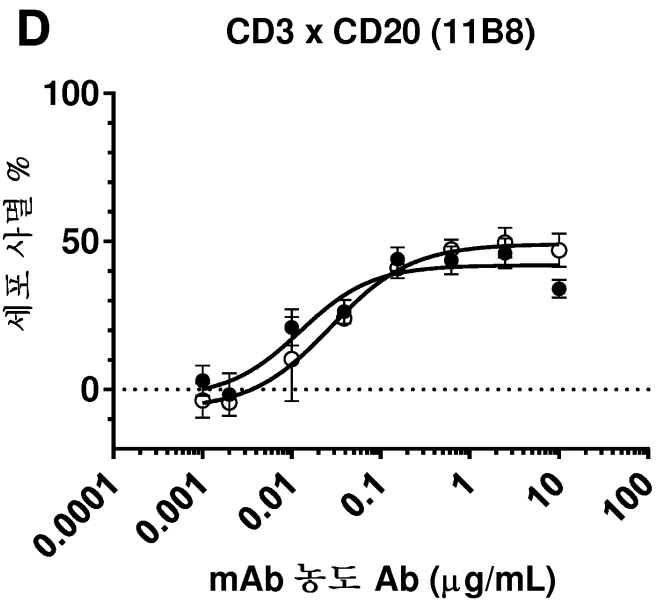
도면3b


B
100
50
0
세포 사멸 %
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
7D8-FEAR
CD3 x 7D8
CD3 x b12

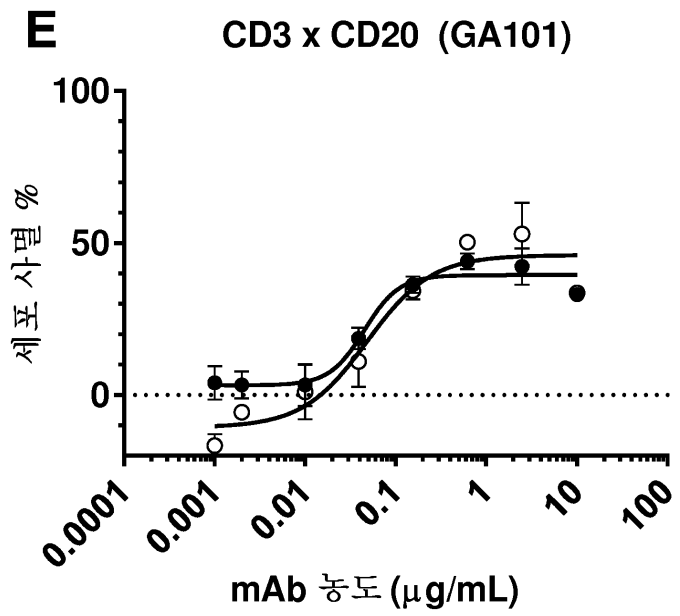
도면3c


C
CD3 x CD20 (7D8)
100
50
0
세포 사멸 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)

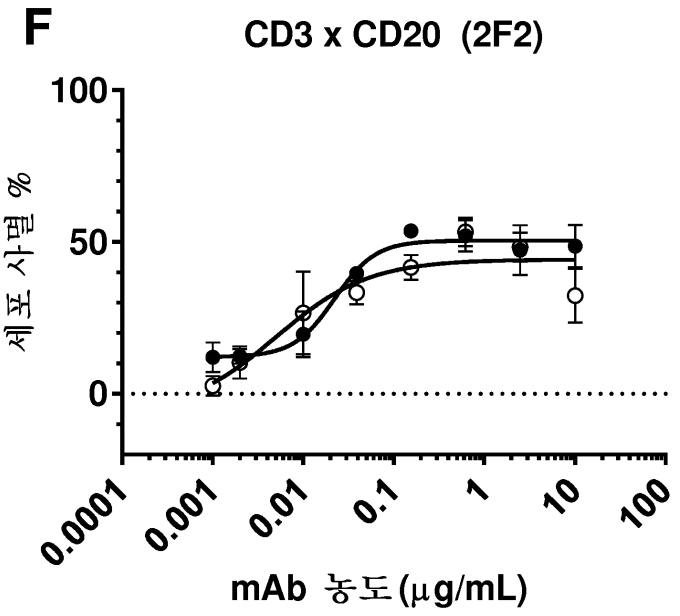
도면3d


D
CD3 x CD20 (11B8)
100
50
0
세포 사멸 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 Ab (μg/mL)

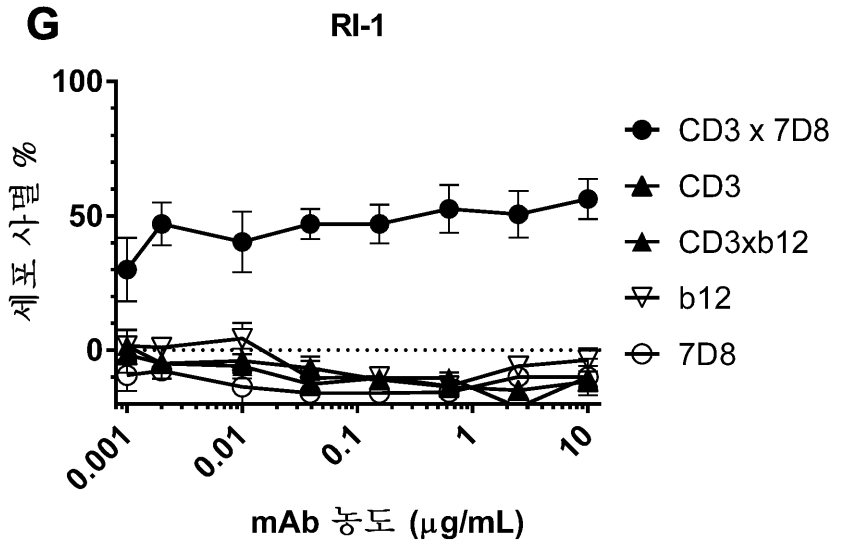
도면3e


E
CD3 x CD20 (GA101)
100
50
0
세포 사멸 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)

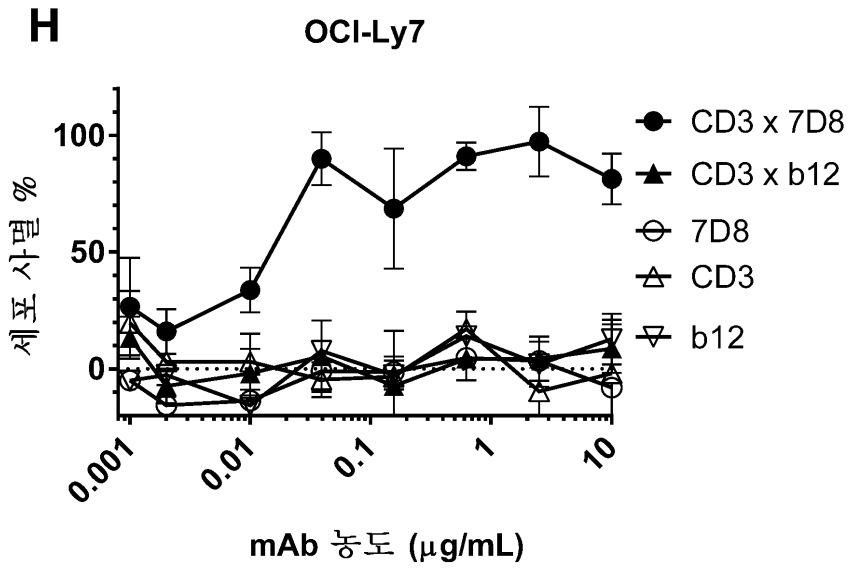
도면3f


F
CD3 x CD20 (2F2)
100
50
0
세포 사멸 %
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)

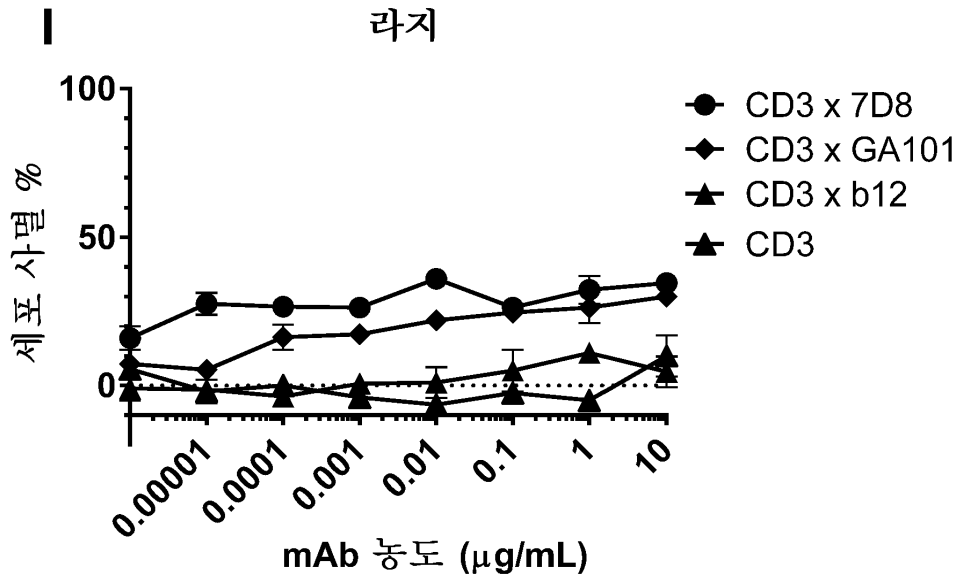
도면3g


G
RI-1
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 7D8
CD3
CD3xb12
b12
7D8

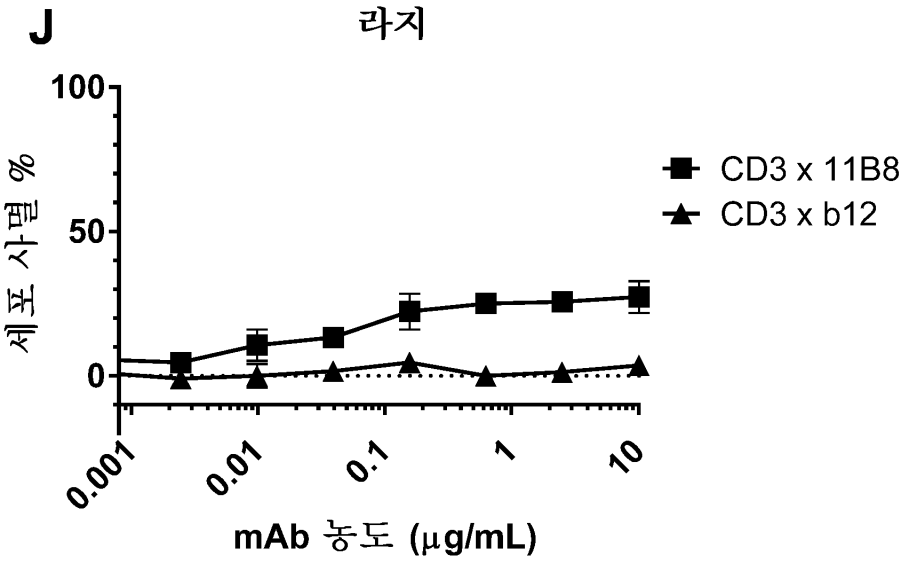
도면3h


H
OCI-Ly7
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 7D8
CD3 x b12
7D8
CD3
b12

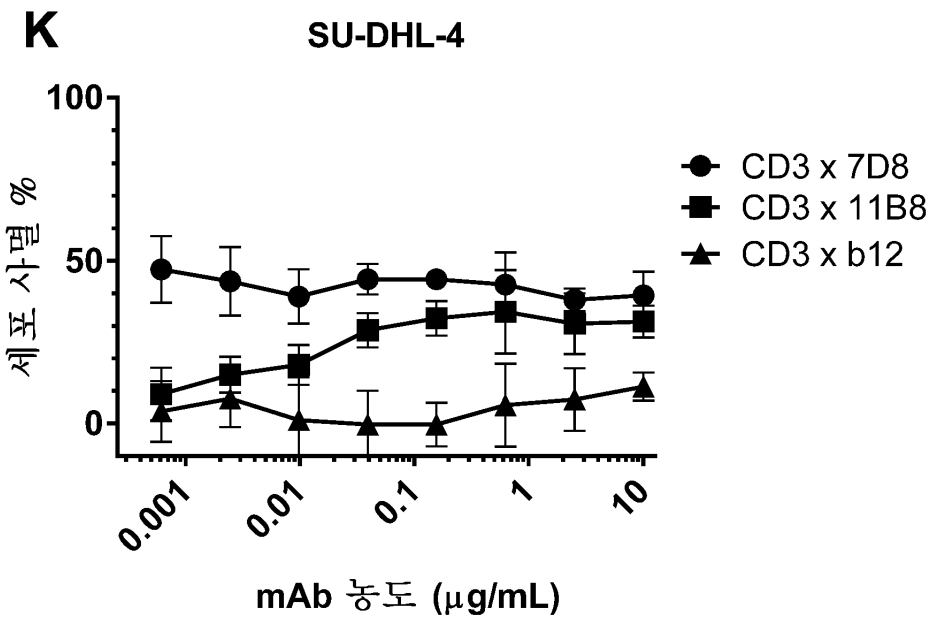
도면3i


I
라지
100
50
0
세포 사멸 %
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 7D8
CD3 x GA101
CD3 x b12
CD3

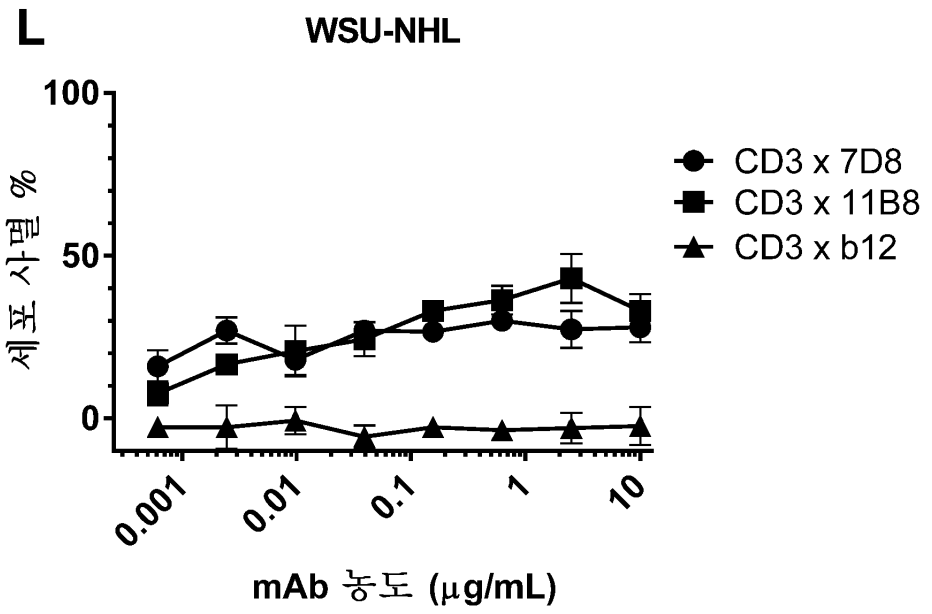
도면3j


J
라지
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 11B8
CD3 x b12

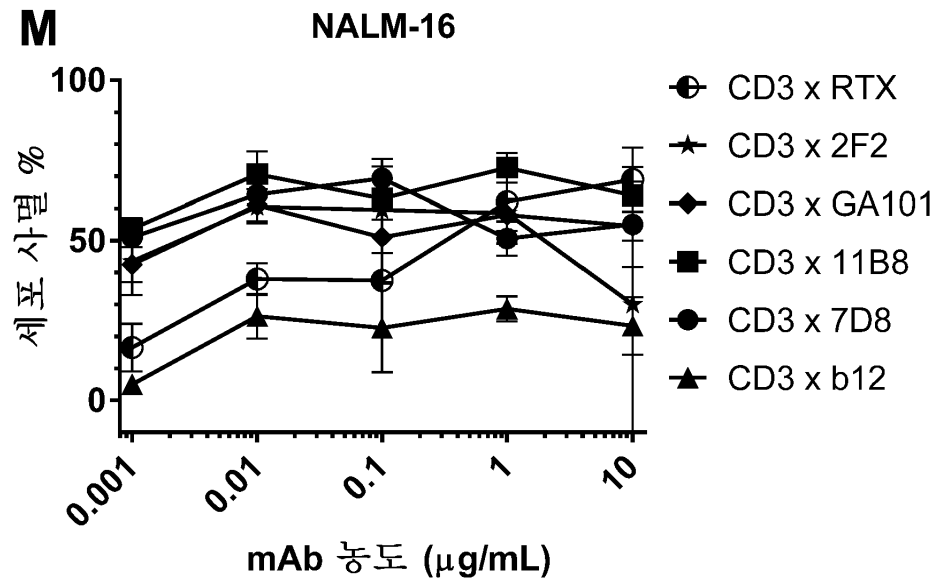
도면3k


K
SU-DHL-4
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 7D8
CD3 x 11B8
CD3 x b12

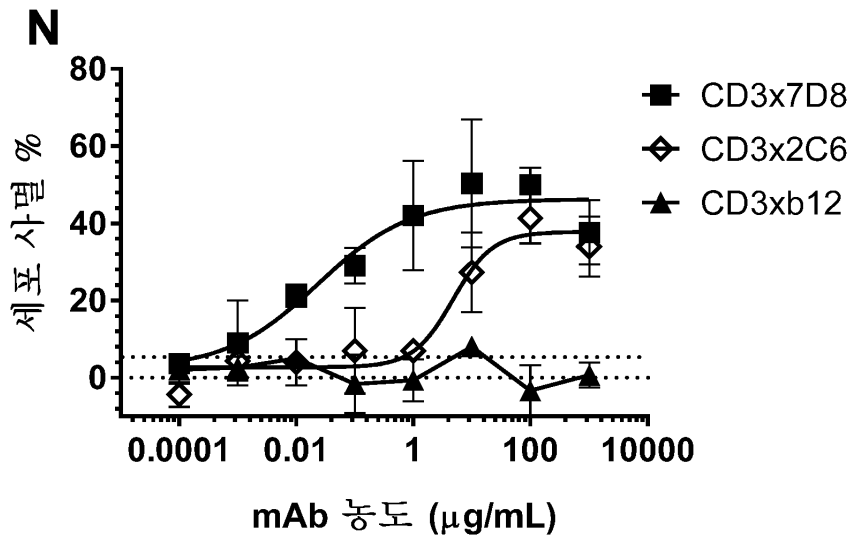
도면31


L
WSU-NHL
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x 7D8
CD3 x 11B8
CD3 x b12

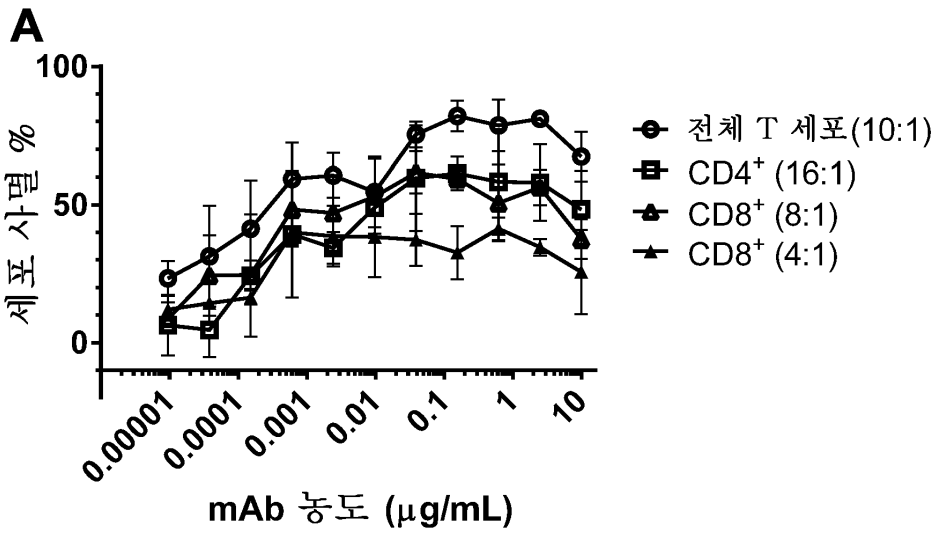
도면3m


M
NALM-16
100
50
0
세포 사멸 %
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD3 x RTX
CD3 x 2F2
CD3 x GA101
CD3 x 11B8
CD3 x 7D8
CD3 x b12

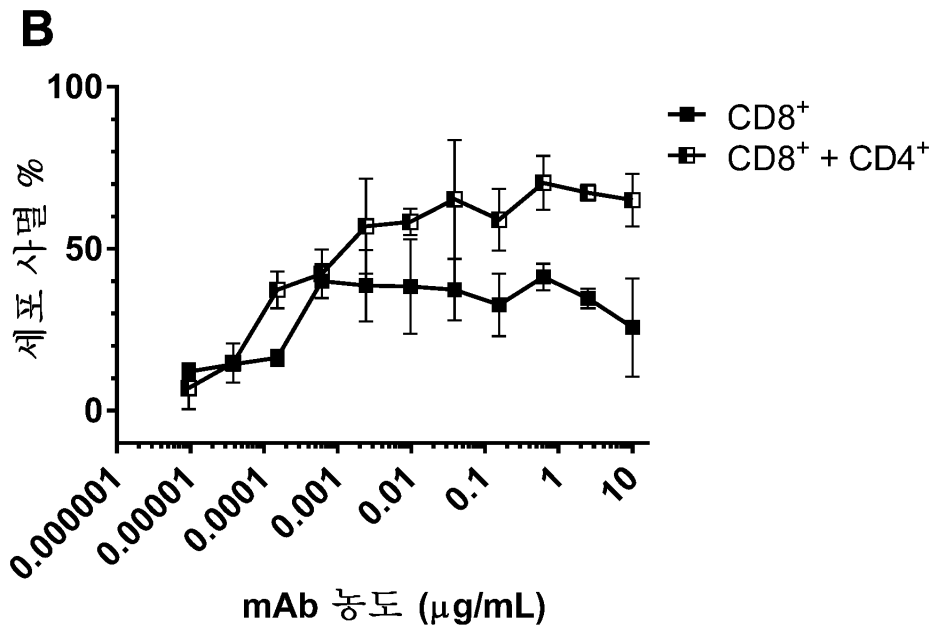
도면3n


N
80
60
40
20
0
세포 사멸 %
0.0001
0.01
1
100
10000
mAb 농도 (μg/mL)
CD3x7D8
CD3x2C6
CD3xb12

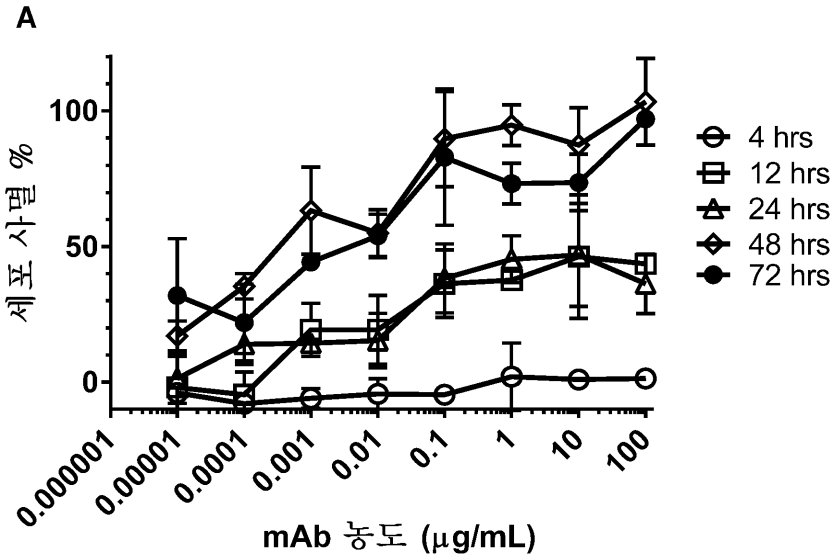
도면4a


A
100
50
0
세포 사멸 %
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
전체 T 세포(10:1)
CD4+ (16:1)
CD8+ (8:1)
CD8+ (4:1)

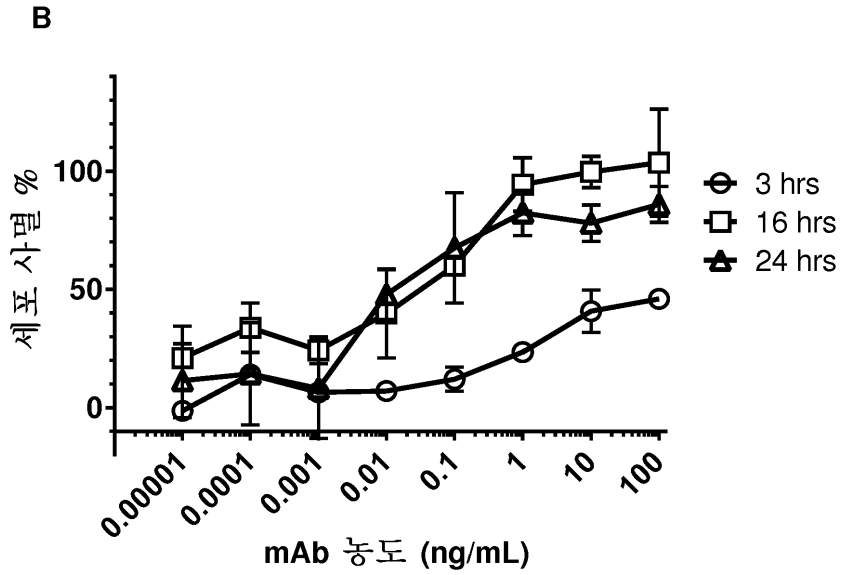
도면4b


B
100
50
0
세포 사멸 %
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
CD8+
CD8+ + CD4+

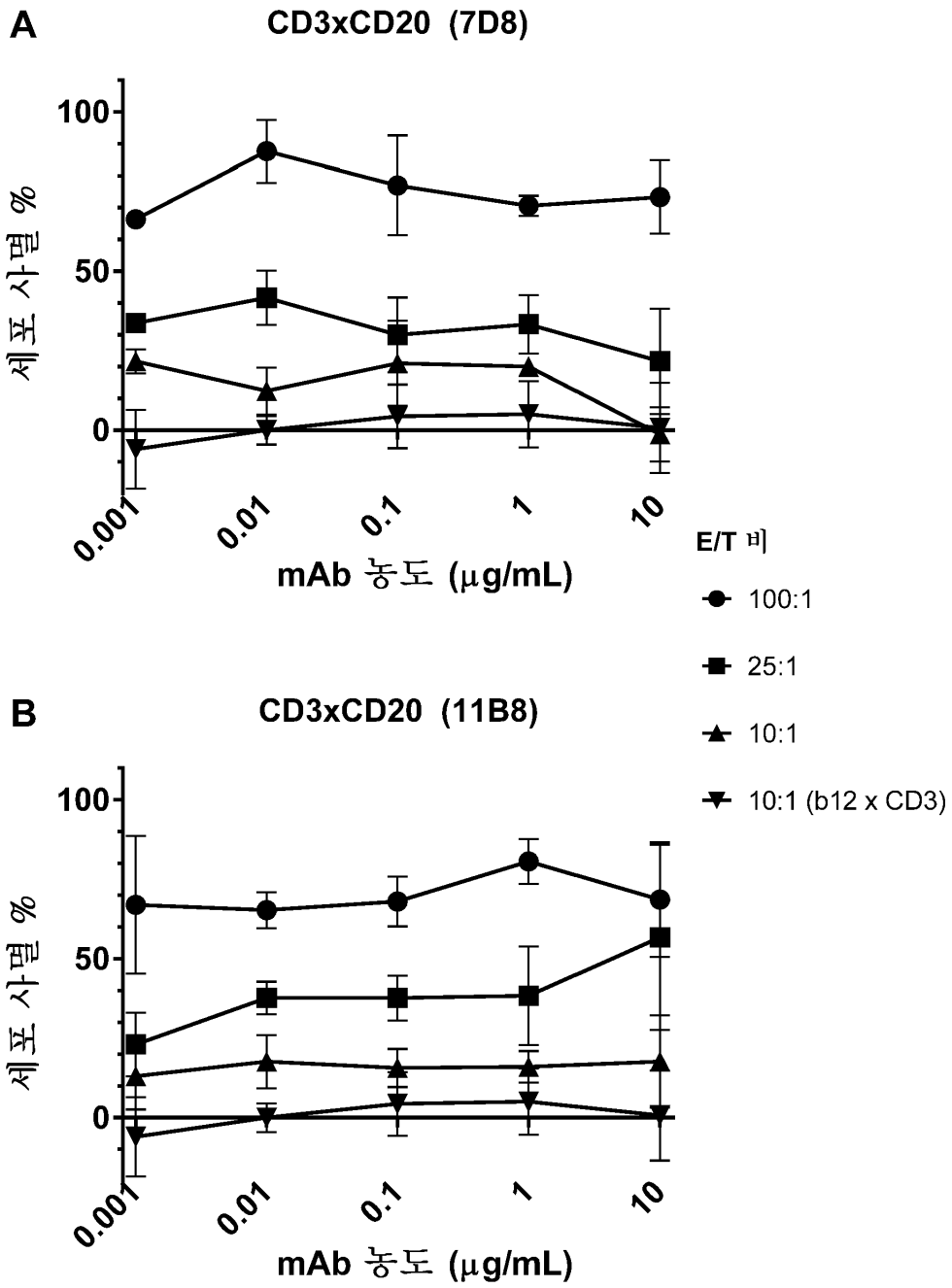
도면5a


A
100
50
0
세포 사멸 %
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (μg/mL)
4 hrs
12 hrs
24 hrs
48 hrs
72 hrs

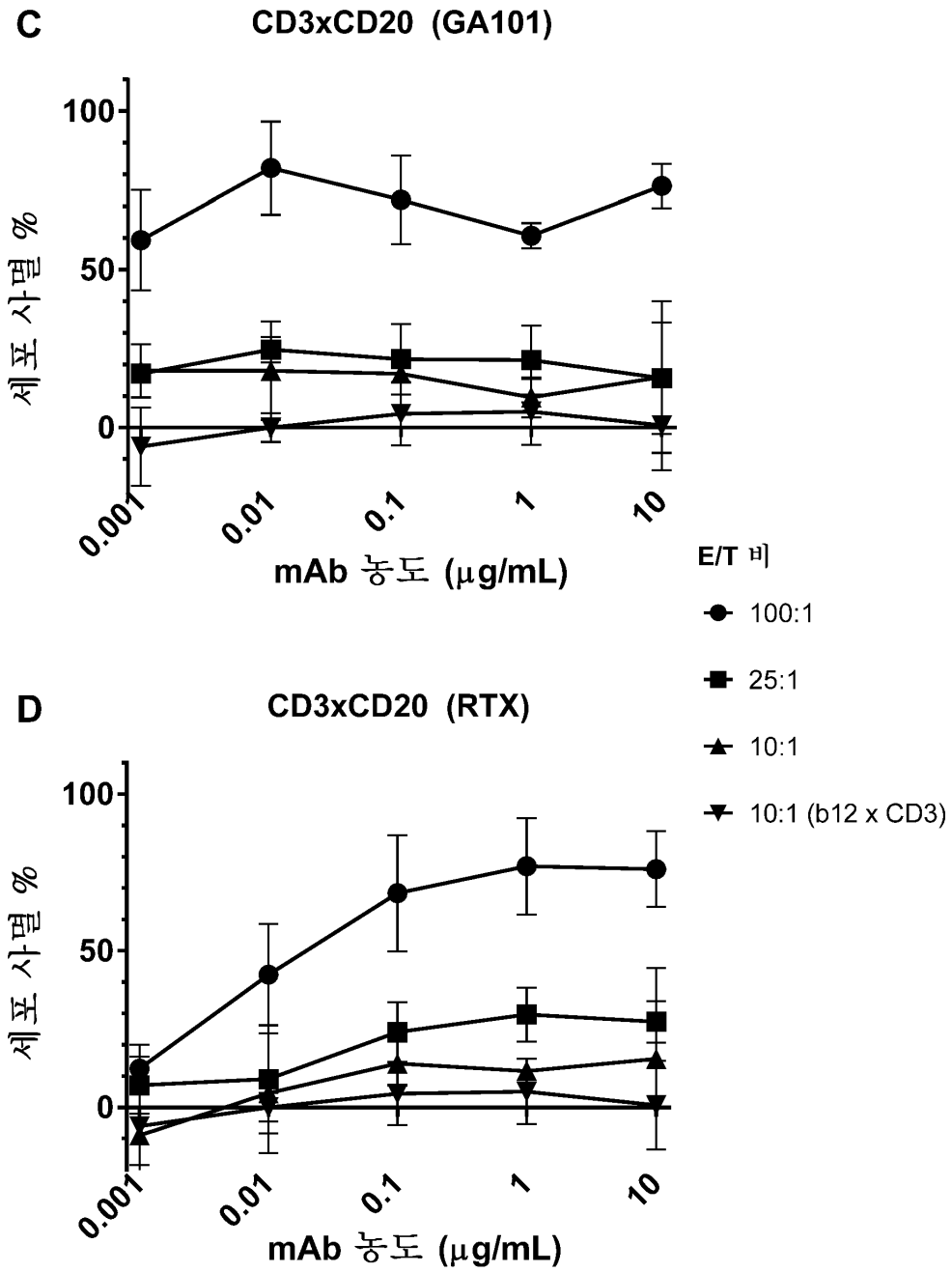
도면5b


B
100
50
0
세포 사멸 %
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb 농도 (ng/mL)
3 hrs
16 hrs
24 hrs

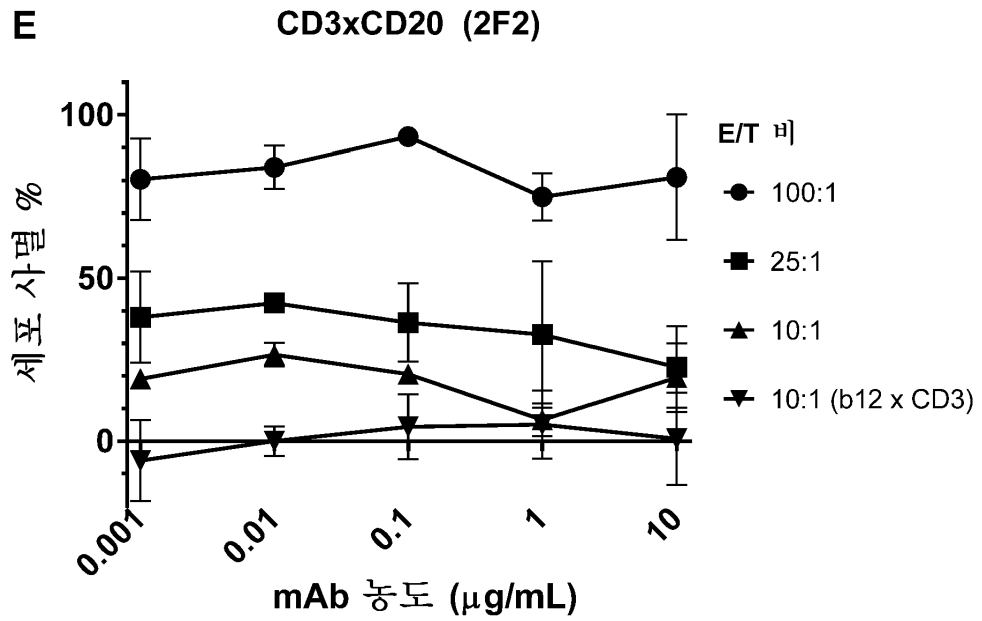
도면6ab


A
CD3xCD20 (7D8)
세포 사멸 %
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
B
CD3xCD20 (11B8)
세포 사멸 %
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
E/T 비
100:1
25:1
10:1
10:1 (b12 x CD3)

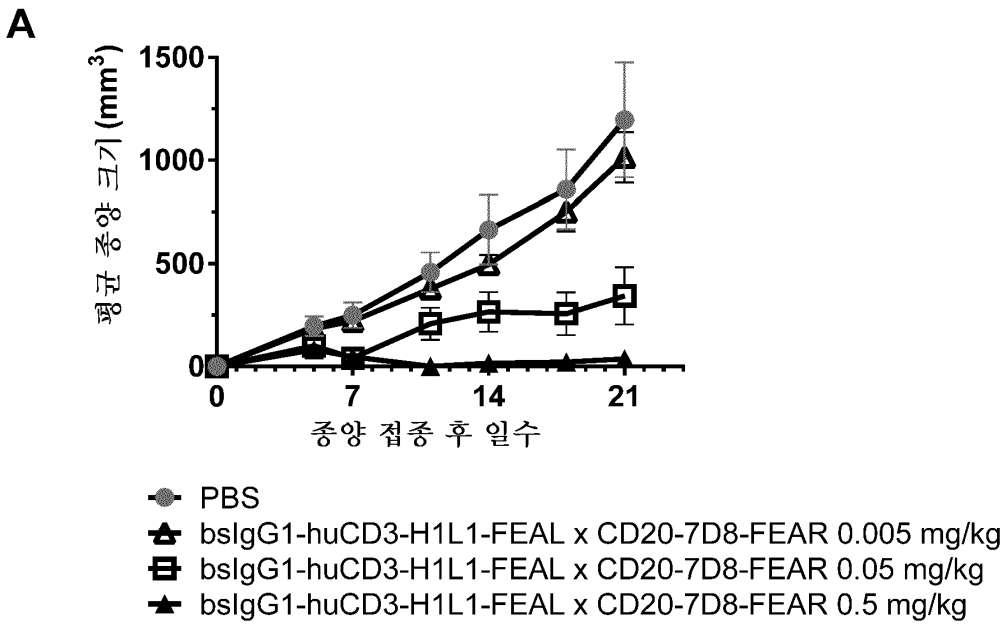
도면6cd


C
CD3xCD20 (GA101)
세포 사멸 %
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
D
CD3xCD20 (RTX)
세포 사멸 %
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
E/T 비
100:1
25:1
10:1
10:1 (b12 x CD3)

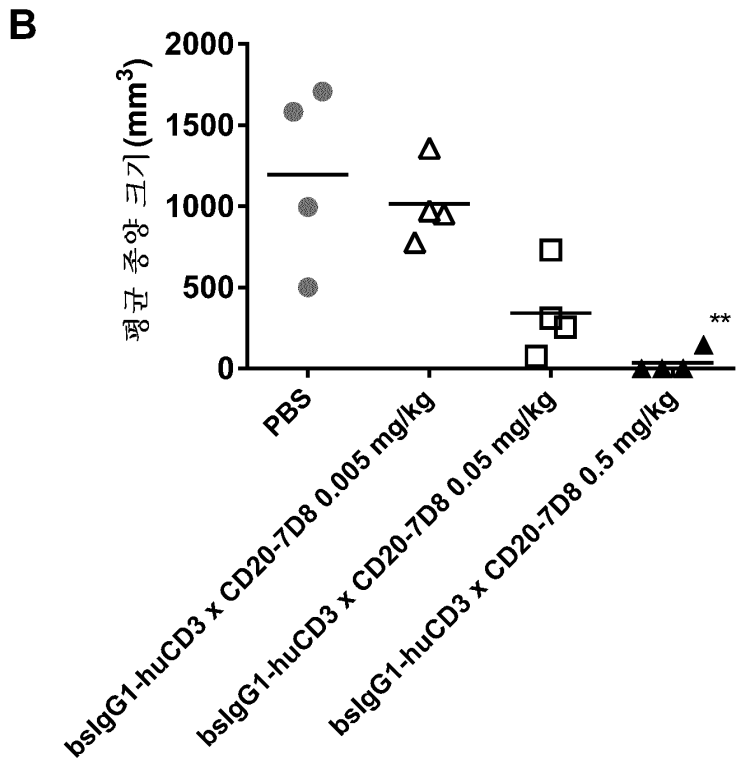
도면6e


E
CD3xCD20 (2F2)
세포 사멸 %
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
mAb 농도 (μg/mL)
E/T 비
100:1
25:1
10:1
10:1 (b12 x CD3)

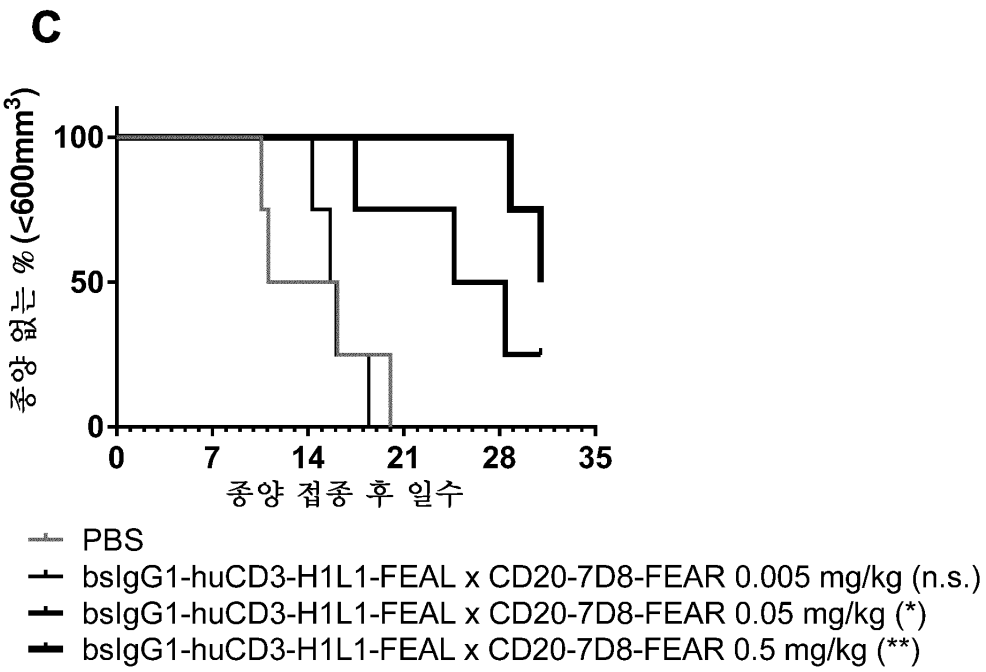
도면7a


A
평균 종양 크기 (mm3)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
종양 접종 후 일수
PBS
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.005 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg

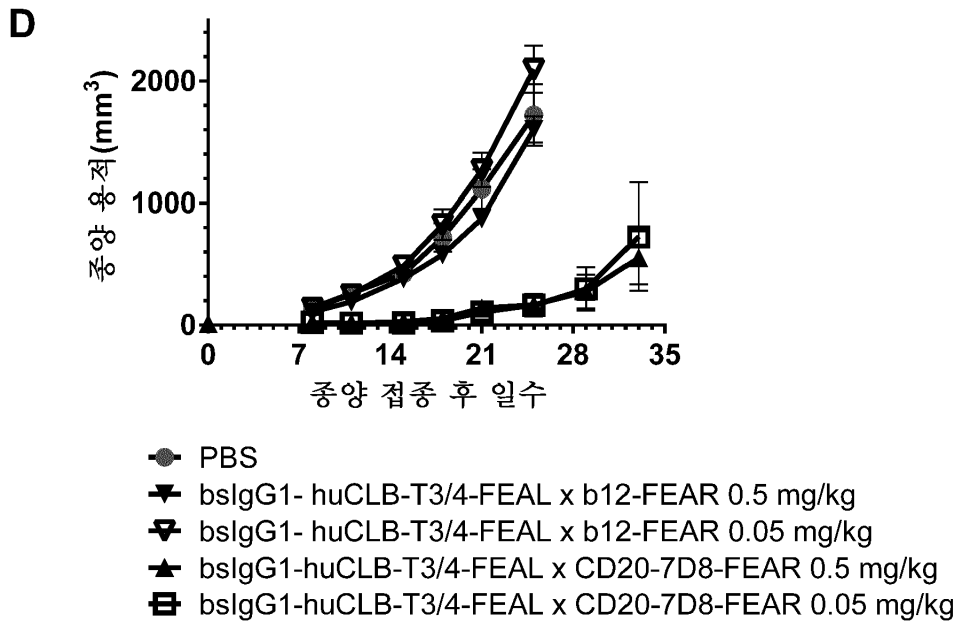
도면7b


B
2000
1500
1000
500
0
평균 종양 크기 (mm3)
**
PBS
bsIgG1-huCD3 x CD20-7D8 0.005 mg/kg
bsIgG1-huCD3 x CD20-7D8 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCD3 x CD20-7D8 0.5 mg/kg

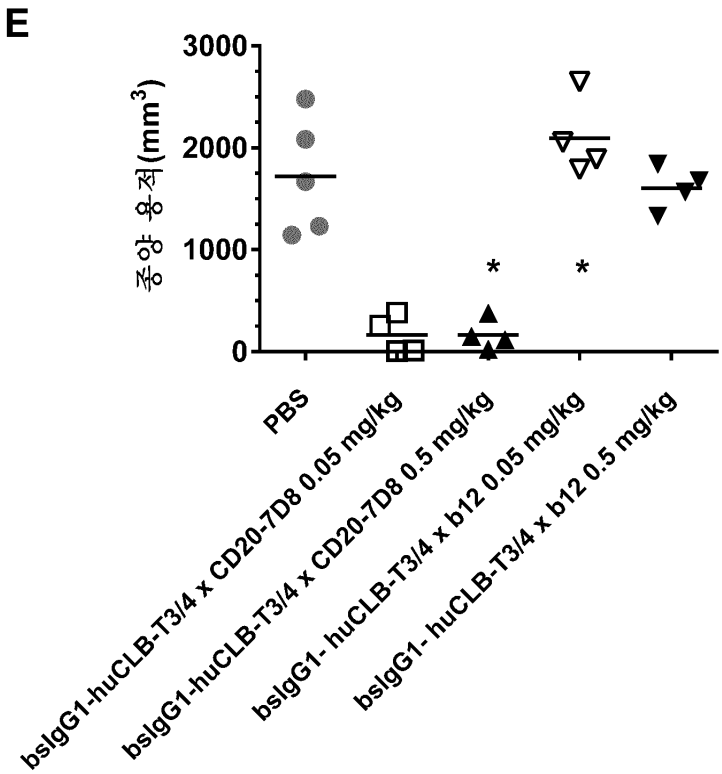
도면7c


C
100
50
0
종양 없는 % (<600mm3)
0
7
14
21
28
35
종양 접종 후 일수
PBS
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.005 mg/kg (n.s.)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg (*)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg (**)

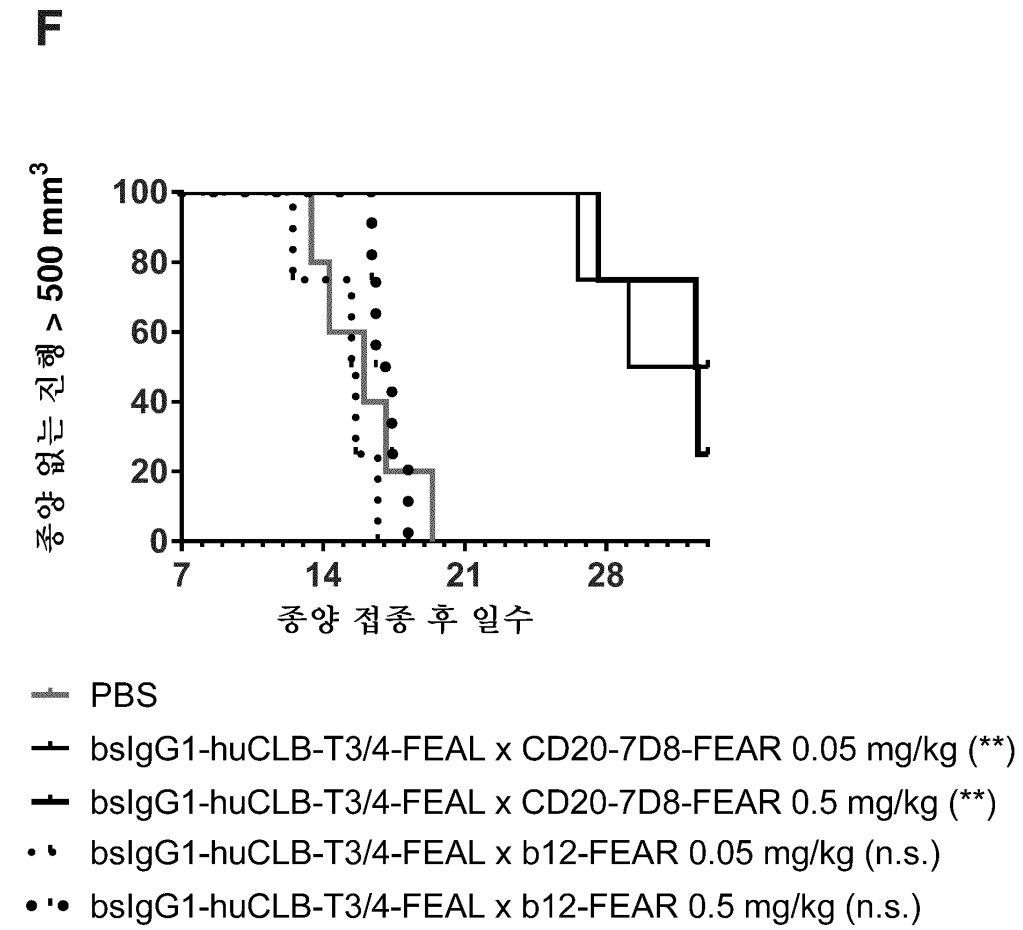
도면7d


D
종양 용적(mm3)
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
종양 접종 후 일수
PBS
bsIgG1- huCLB-T3/4-FEAL x b12-FEAR 0.5 mg/kg
bsIgG1- huCLB-T3/4-FEAL x b12-FEAR 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg

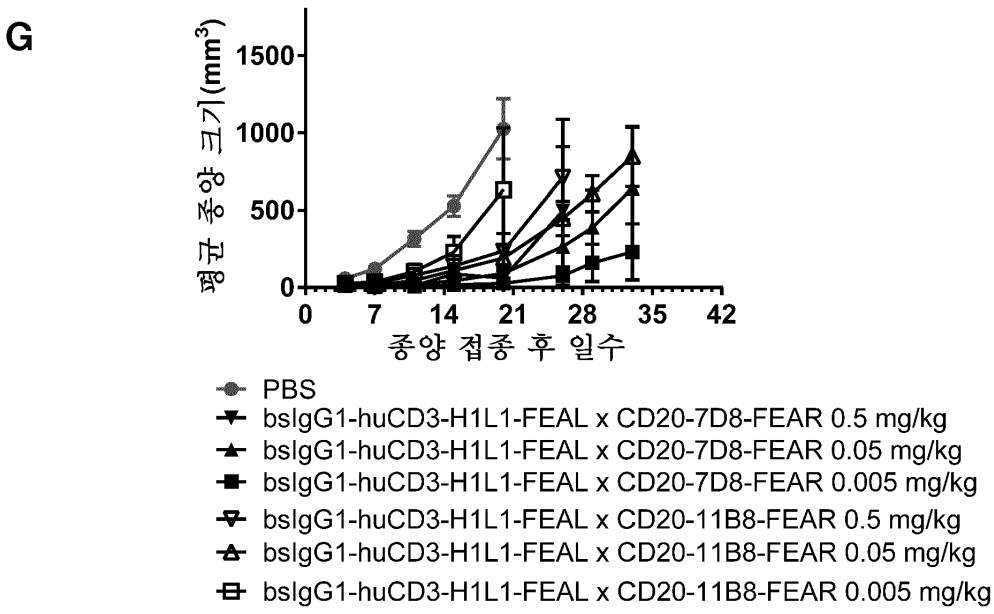
도면7e


E
종양 용적(mm3)
3000
2000
1000
0
*
*
PBS
bsIgG1-huCLB-T3/4 x CD20-7D8 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCLB-T3/4 x CD20-7D8 0.5 mg/kg
bsIgG1- huCLB-T3/4 x b12 0.05 mg/kg
bsIgG1- huCLB-T3/4 x b12 0.5 mg/kg

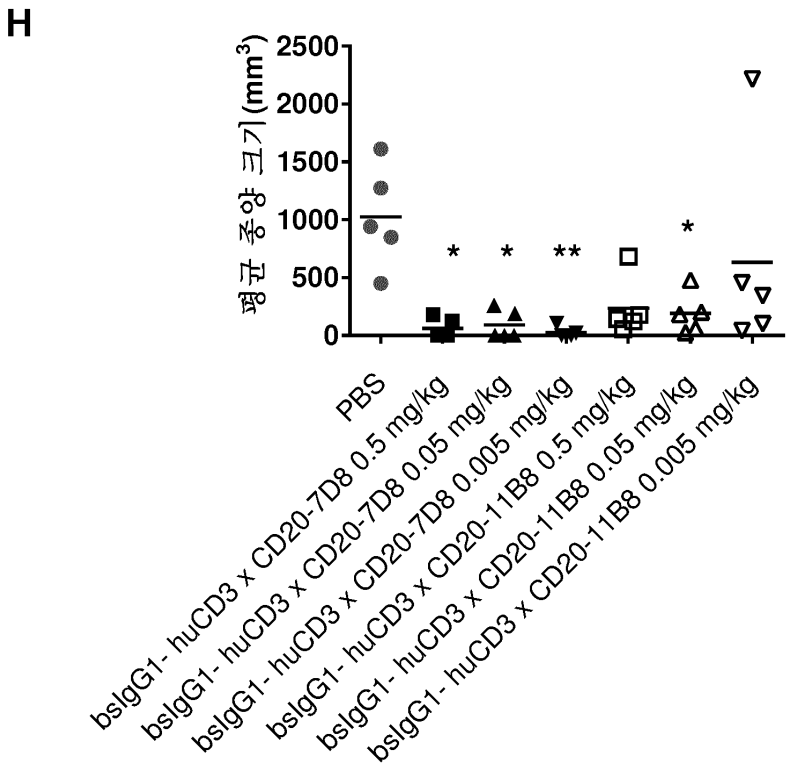
도면7f


F
종양 없는 진행 > 500 mm3
100
80
60
40
20
0
7
14
21
28
종양 접종 후 일수
PBS
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg (**)
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg (**)
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x b12-FEAR 0.05 mg/kg (n.s.)
bsIgG1-huCLB-T3/4-FEAL x b12-FEAR 0.5 mg/kg (n.s.)

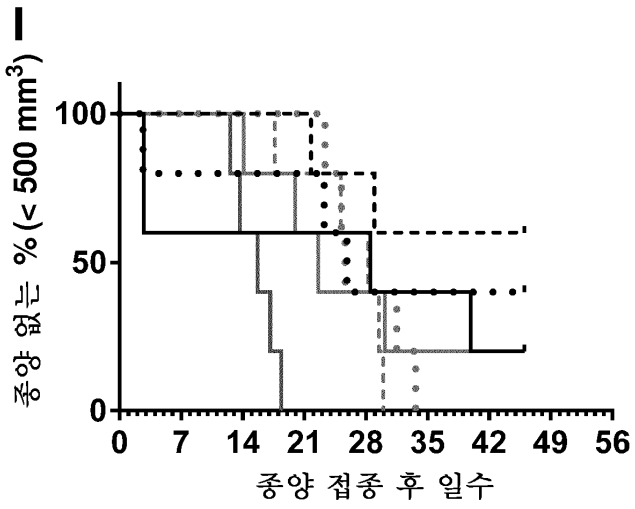
도면7g


G
평균 종양 크기 (mm3)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
종양 접종 후 일수
PBS
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR 0.005 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-11B8-FEAR 0.5 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-11B8-FEAR 0.05 mg/kg
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-11B8-FEAR 0.005 mg/kg

도면7h



도면7i

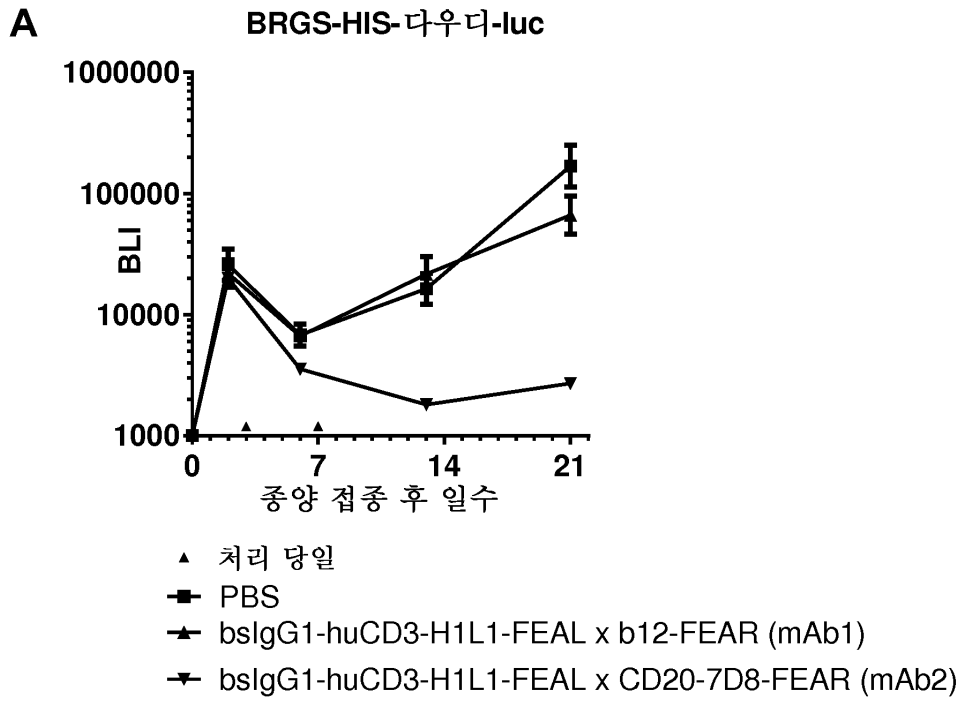


PBS

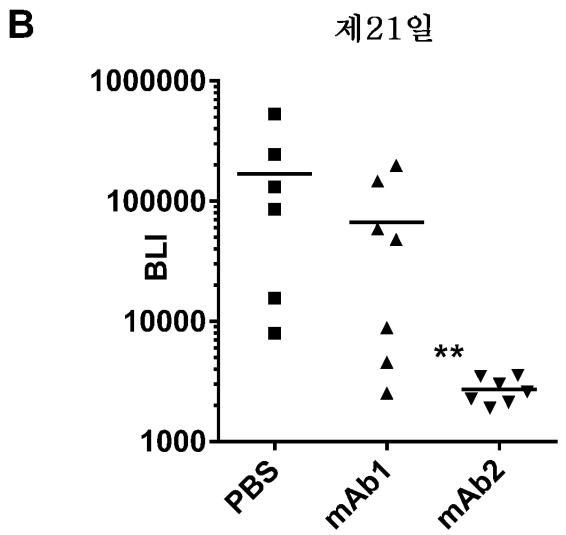
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 0.005 mg/kg (n.s.)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 0.05 mg/kg (*)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-7D8-FEAR 0.5 mg/kg (*)

bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 0.005 mg/kg (*)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 0.05 mg/kg (**)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALxCD20-11B8-FEAR 0.5 mg/kg (**)

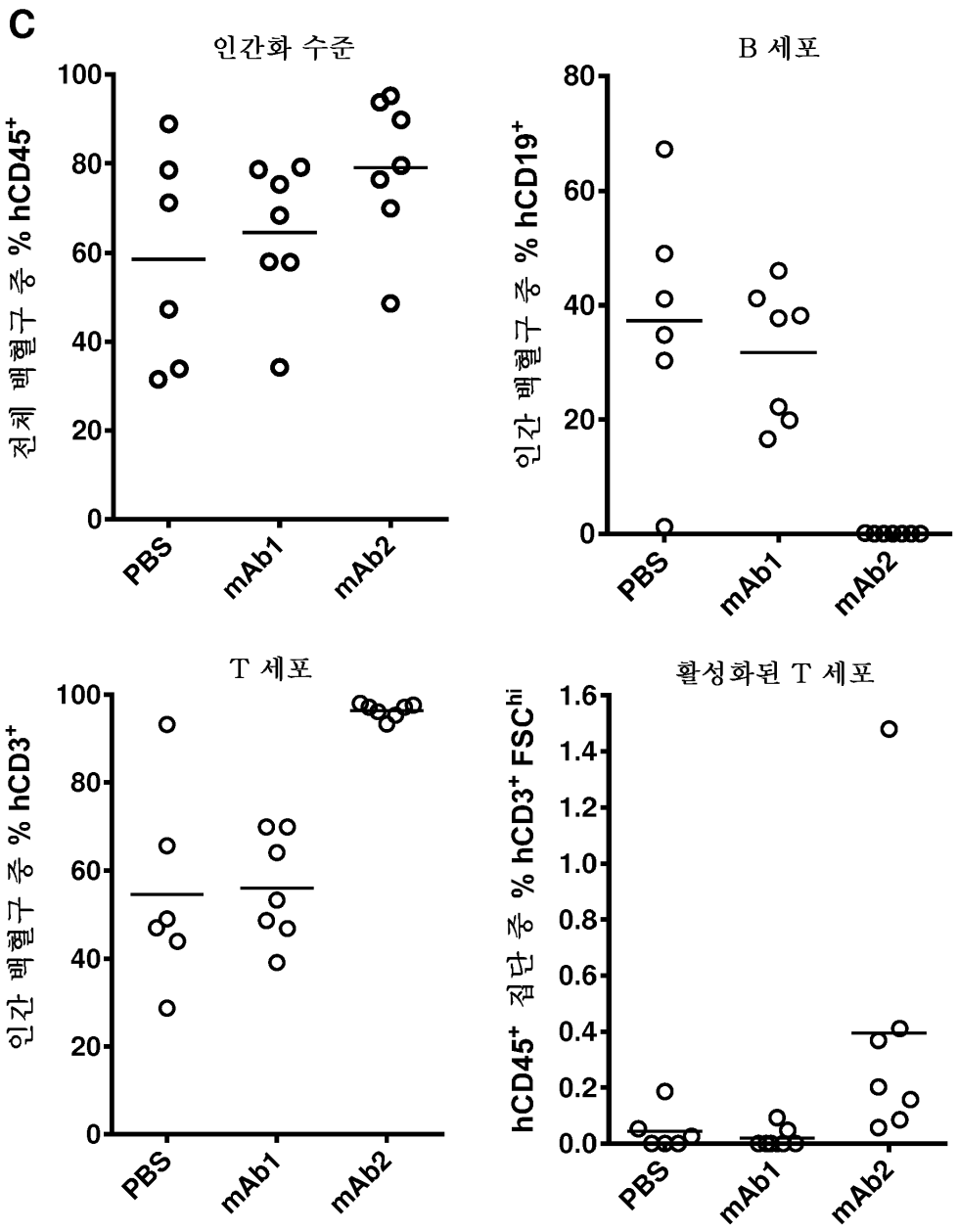
도면8a


A
BRGS-HIS-다우디-luc
1000000
100000
10000
1000
BLI
0
7
14
21
종양 접종 후 일수
처리 당일
PBS
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x b12-FEAR (mAb1)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL x CD20-7D8-FEAR (mAb2)

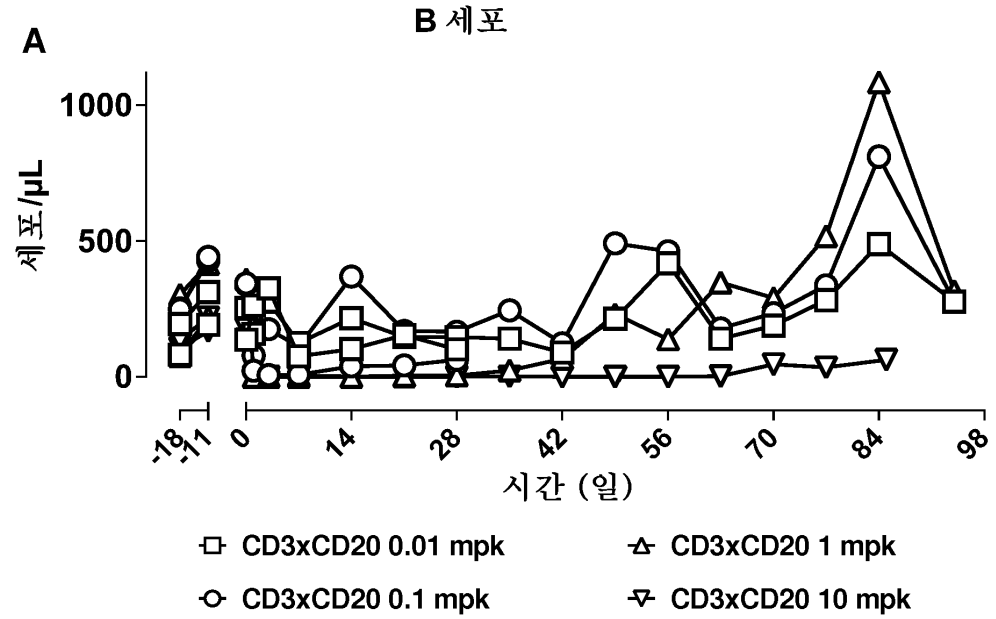
도면8b


B
제21일
1000000
100000
10000
1000
BLI
**
PBS
mAb1
mAb2

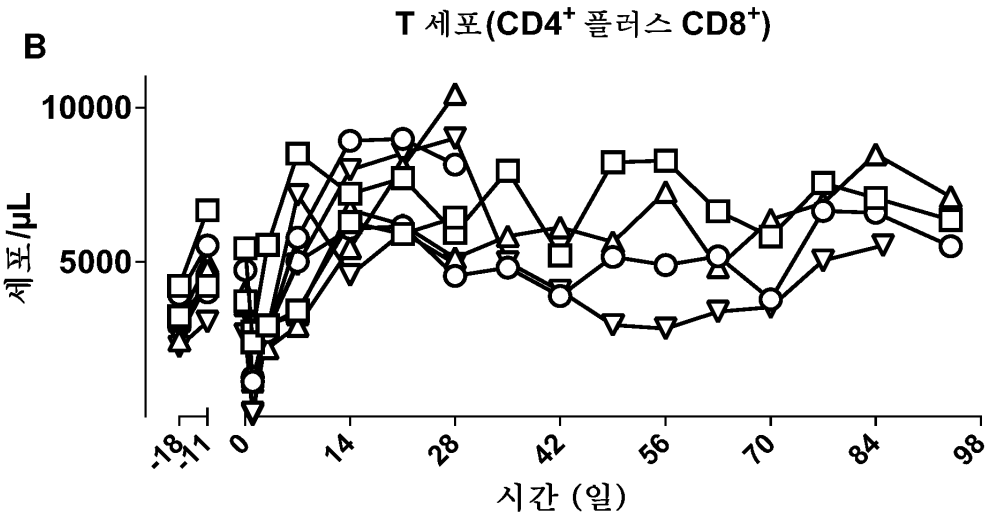
도면8c


C
인간화 수준
전체 백혈구 중 % hCD45+
100
80
60
40
20
0
PBS
mAb1
mAb2
B 세포
인간 백혈구 중 % hCD19+
80
60
40
20
0
PBS
mAb1
mAb2
T 세포
인간 백혈구 중 % hCD3+
100
80
60
40
20
0
PBS
mAb1
mAb2
활성화된 T 세포
hCD45+ 집단 중 % hCD3+ FSChi
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
mAb1
mAb2

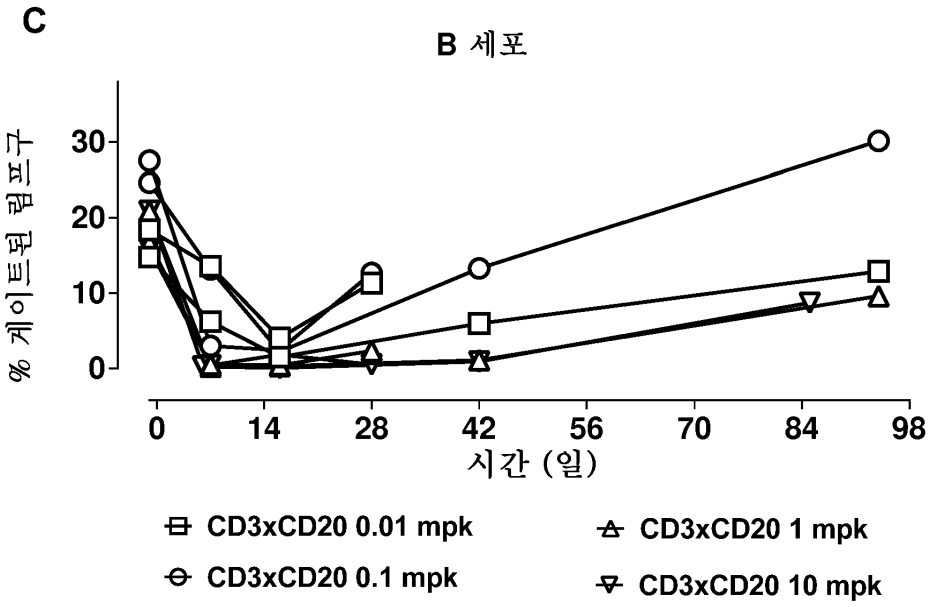
도면9a


A
B 세포
1000
500
0
세포/μL
-18
-11
0
14
28
42
56
70
84
98
시간 (일)
CD3xCD20 0.01 mpk
CD3xCD20 1 mpk
CD3xCD20 0.1 mpk
CD3xCD20 10 mpk

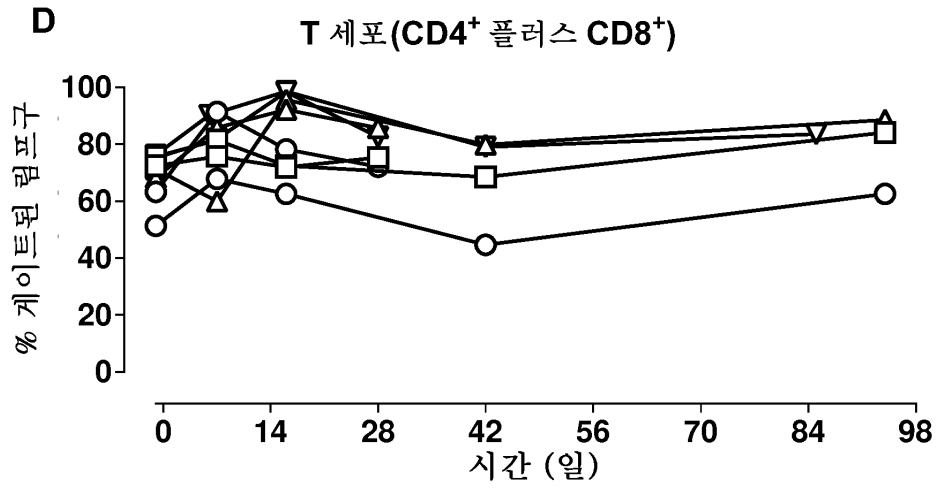
도면9b


B
T 세포(CD4+ 플러스 CD8+)
10000
5000
세포/μL
-18
-11
0
14
28
42
56
70
84
98
시간 (일)

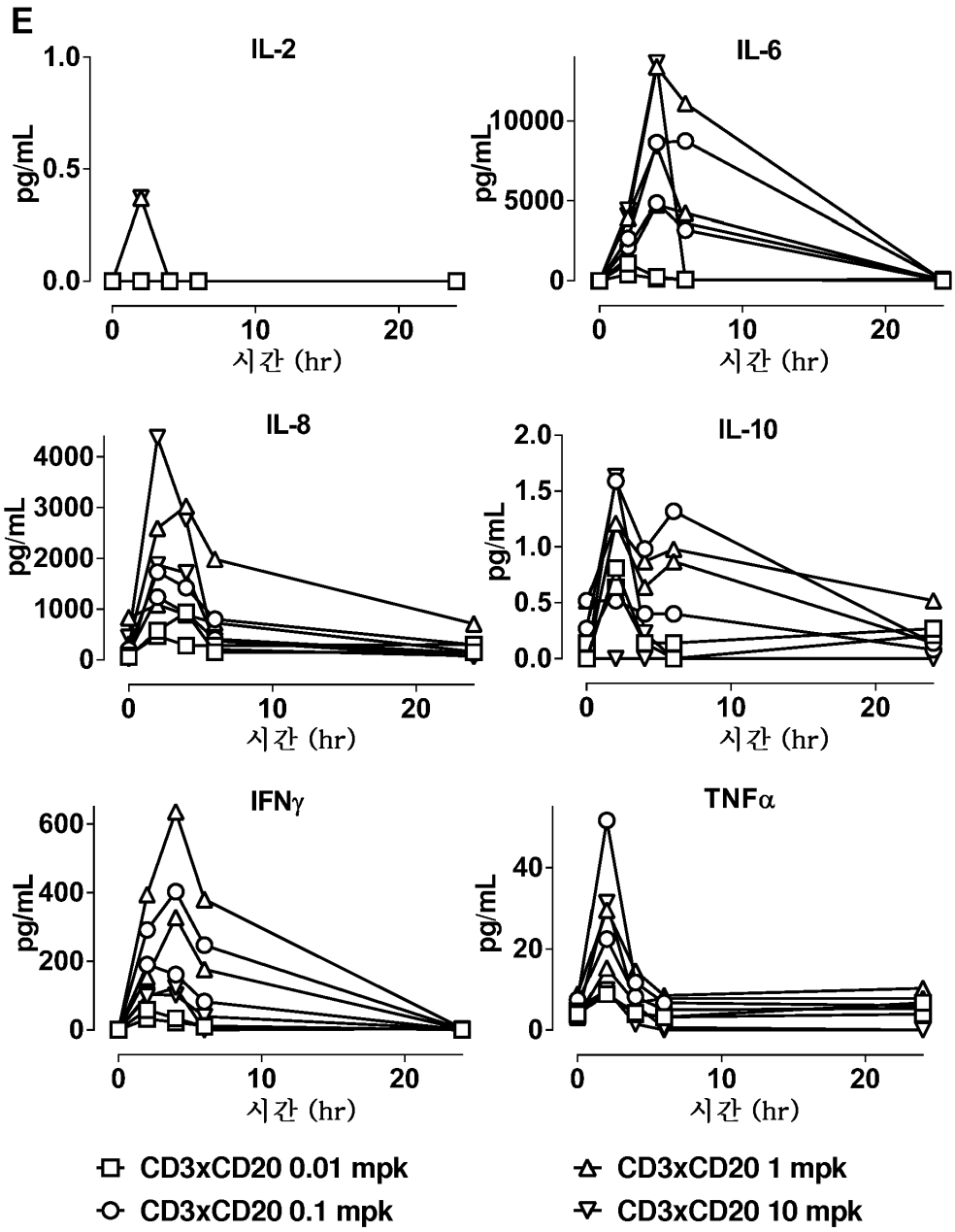
도면9c


C
B 세포
% 게이트된 림프구
30
20
10
0
0
14
28
42
56
70
84
98
시간 (일)
CD3xCD20 0.01 mpk
CD3xCD20 0.1 mpk
CD3xCD20 1 mpk
CD3xCD20 10 mpk

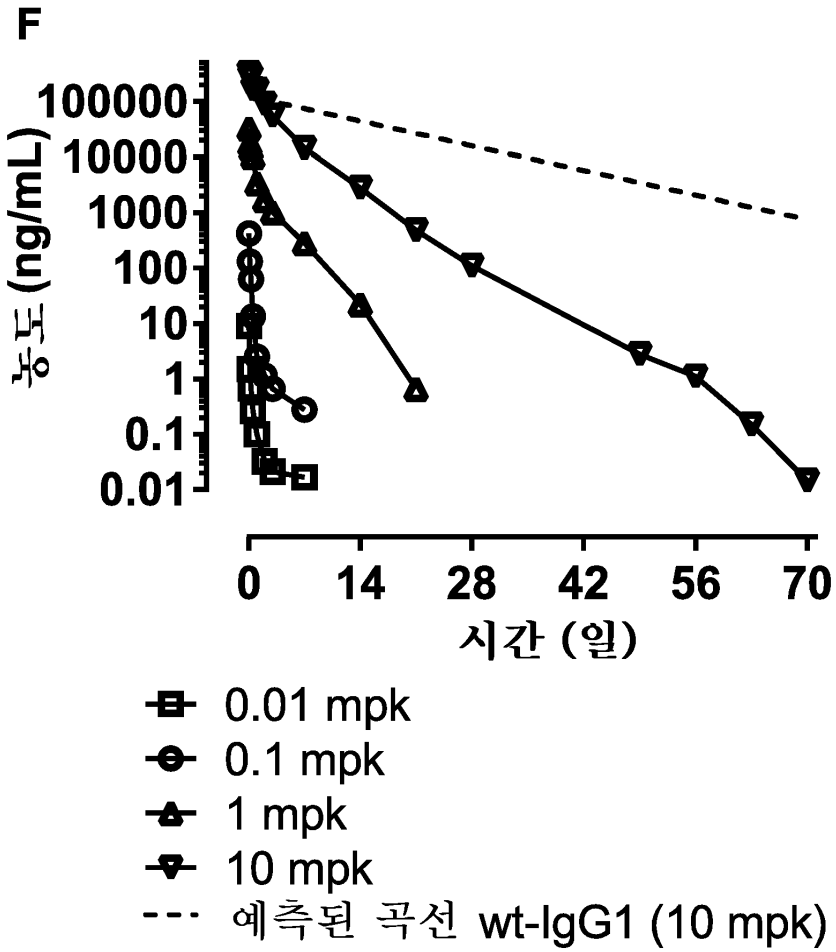
도면9d


D
T 세포(CD4+ 플러스 CD8+)
% 게이트된 림프구
100
80
60
40
20
0
0
14
28
42
56
70
84
98
시간 (일)

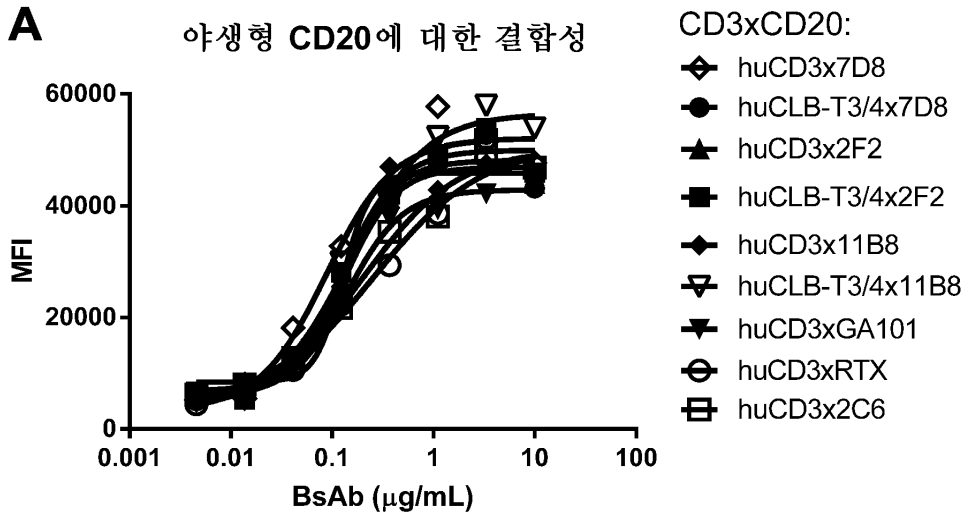
도면9e


E
IL-2
IL-6
IL-8
IL-10
IFNγ
TNFα
pg/mL
시간 (hr)
CD3xCD20 0.01 mpk
CD3xCD20 0.1 mpk
CD3xCD20 1 mpk
CD3xCD20 10 mpk

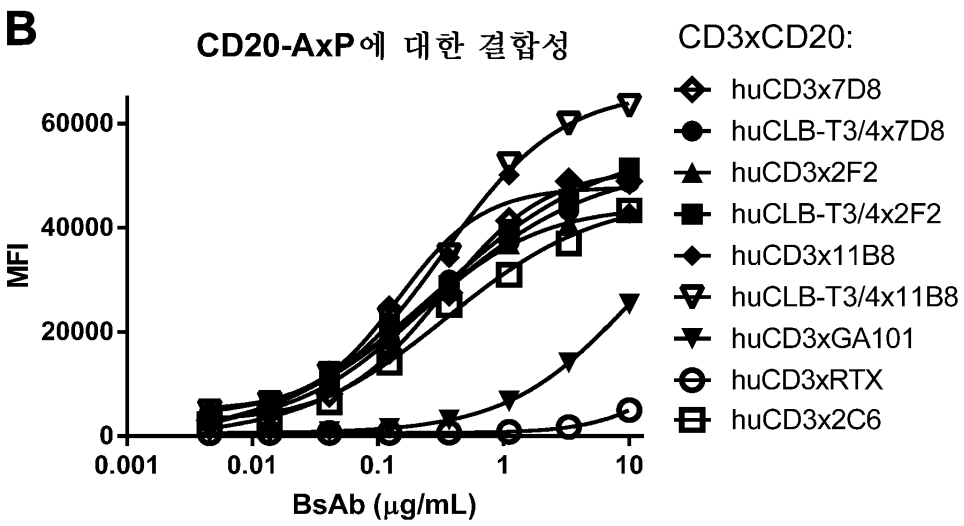
도면9f


F
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
농도 (ng/mL)
0
14
28
42
56
70
시간 (일)
0.01 mpk
0.1 mpk
1 mpk
10 mpk
예측된 곡선 wt-IgG1 (10 mpk)

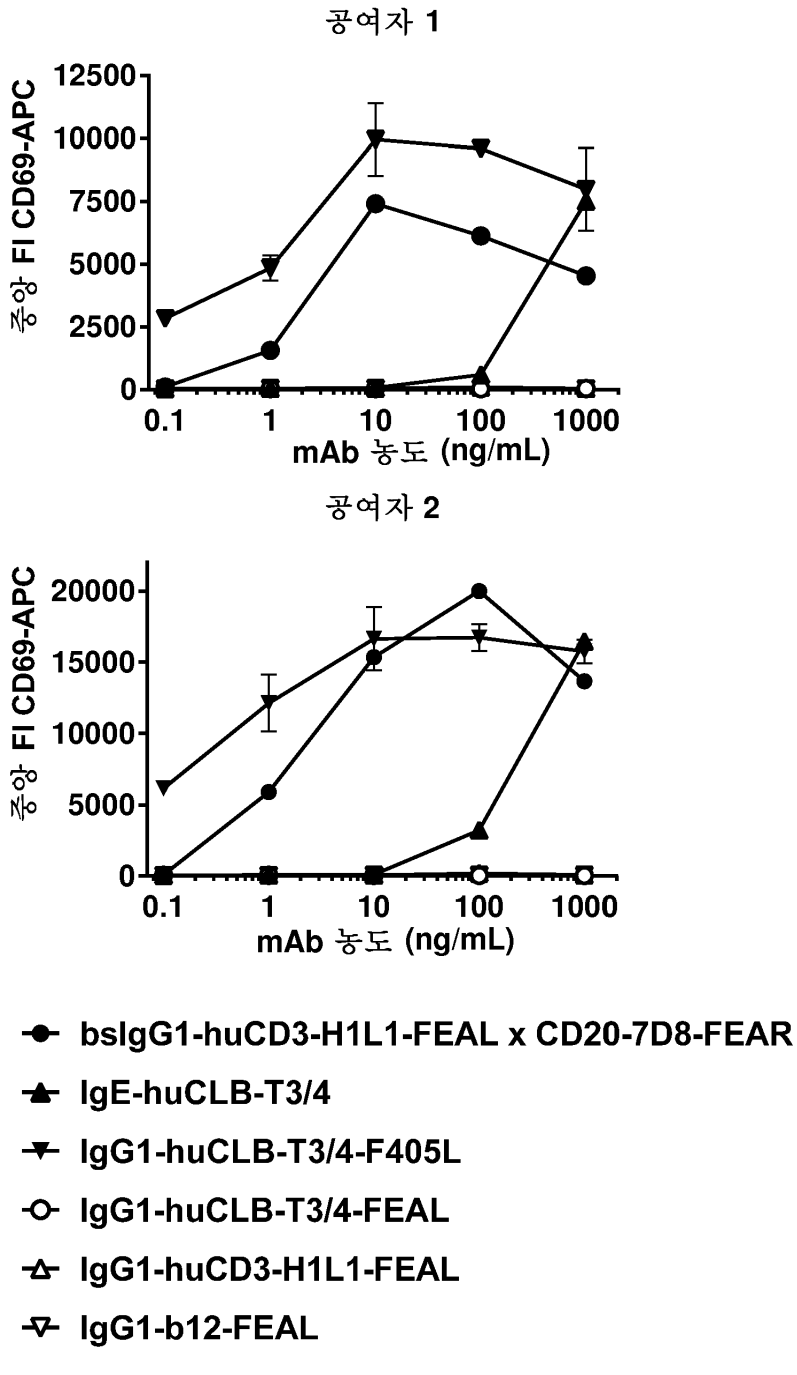
도면10a


A
야생형 CD20에 대한 결합성
60000
40000
20000
0
MFI
0.001
0.01
0.1
1
10
100
BsAb (μg/mL)
CD3xCD20:
huCD3x7D8
huCLB-T3/4x7D8
huCD3x2F2
huCLB-T3/4x2F2
huCD3x11B8
huCLB-T3/4x11B8
huCD3xGA101
huCD3xRTX
huCD3x2C6

도면10b


B
CD20-AxP에 대한 결합성
MFI
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
BsAb (μg/mL)
CD3xCD20:
huCD3x7D8
huCLB-T3/4x7D8
huCD3x2F2
huCLB-T3/4x2F2
huCD3x11B8
huCLB-T3/4x11B8
huCD3xGA101
huCD3xRTX
huCD3x2C6

도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> BISPECIFIC ANTIBODIES AGAINST CD3 AND CD20

<130> P/0090-WO

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 2

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400

> 3

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 4

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 5

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 7

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 8

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 9

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 10

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 11
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus Musculus
<400> 11
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus Musculus
<400> 12
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 13
<211> 186
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 13
Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15
Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro

20 25 30
Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45
Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60
Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80
Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg

85 90 95
Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile

100 105 110

Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr

115 120 125

Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly

130 135 140

Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro

145 150 155 160

Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp

165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

180 185

<210> 14

<211> 150

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys

1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser

20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly

35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr

50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro

65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu

85 90 95

Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu

100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr

115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly

130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys

145 150

<210> 15

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 16

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

100 105 110
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg

100 105

<210> 19

<211> 177

<212> PRT

<213> Macaca Fascicularis

<400> 19

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln

1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu

20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly

50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His

65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp

85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu

100 105 110

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
115 120 125
Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly
130 135 140
Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160
Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg

165 170 175
Ile

<210> 20
<211> 177
<212> PRT
<213> Macaca Mulatta
<400> 20
Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr His
1 5 10 15
Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu
20 25 30
Gly Ser Glu Val Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser
35 40 45

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

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
115 120 125
Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly

130 135 140

Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160

Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg
165 170 175

Ile

<210> 21
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

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

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 22
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 22
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 23

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120 125

<210> 26

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 26

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210>
27

<211> 122

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 29

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 31

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 32

Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr Ala
1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 33

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile
1 5

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 34

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 35

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1 5

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 39

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met

100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 41
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 8
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr His Ala

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 43

Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr

1 5

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 44

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly

1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 45

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 46

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 47

<211> 123

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 47

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Lys Asp Asn Gln Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Gly Leu Gly Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 49

Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Thr

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 50

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1 5

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 51

Thr Lys Asp Asn Gln Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Gly Leu Gly Val

1 5 10 15

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 52

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 54

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 56

Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile

1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 57

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 58

Ser Ser Val Thr Tyr

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 59

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 60

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 61
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 61
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

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

<210> 62
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 62
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 63

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 63

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 64

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 64

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 65

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

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

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 66

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 67

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 68

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 69

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

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

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 70
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 70
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 71
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 71
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> misc

<222> (5)..(5)

<223

> wherein X is selected from V, H, F, T, P, L, Q, D, K, W, S, G, A, C and R

<400> 72

Gly Phe Thr Phe Xaa Thr Tyr Ala
1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> wherein X is selected from S, N, G, A, K, V, R, H, Q, P, I, F, M, Y, L, W, D, E and C

<400> 73

Gly Phe Thr Phe Asn Xaa Tyr Ala
1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> wherein X is selected from F, H, N, M, W, G, Q, V, T, S, L, P, I, A, K, R and C

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Xaa Ala
1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> wherein X is selected from S, Y, Q, W, L, A, I, M, D, T, K, R, G,

F, E, V, C and P

<400> 75

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Xaa Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> wherein X is selected from N, L, Y, W, H, M, G, F, K, S, V, R, Q,

D, C, E, P and T

<400> 76

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Xaa Thr

1 5 10

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> wherein X is selected from A, S, V, N, K, L, T, I, P, Q, C, G, Y,

W, F, and R

<400> 77

Val Arg Xaa Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> wherein X is selected from P, Q, A, Y, H, I, N, V, E, L, F, W, M,

R, C, S and T

<400> 78

Val Arg His Gly Asn Phe Xaa Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> wherein X is selected from A, T, G, L, N, C, P, F, Q, H, R, K, E, W, and Y

<400> 79

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Xaa Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 80

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> wherein X is selected from H, S, F, N, W, T, C, A, I, L, Q, V, E, M, K, R, G and P

<400> 80

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Xaa

1 5 10 15

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> wherein X is selected from S, A, G, R, V, F, I, E, M, H, N, Y, P,

Q, D, K and L

<400> 81

Thr Gly Ala Val Thr Xaa Ser Asn Tyr

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> wherein X is selected from C, F, Y, I, T, V, M, A, S, N, G, W, E, K, P, R and D

<400> 82

Ala Xaa Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> wherein X is selected from D, K, Q, R, G, V, E, T, N, Y, S, P, W, F and M

<400> 83

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Xaa Trp Val

1 5

<210> 84

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 84

gggagttctt ctcgctgctg ttgctgggct cgcagttgta ga 42

<210> 85

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 85

tctacaactg cgagcccagc aacagcagcg agaagaactc cc 42

<210> 86

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 86

ctcgcagtcg tagatgtcga tgtagggctt gtgggcccgg atg 43

<210> 87

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 87

catccgggcc cacaagccct acatcgacat ctacgactgc gag 43