

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0156667  
(43) 공개일자 2022년11월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/00 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7039306(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년01월10일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2021-7023772  
원출원일자(국제) 2013년01월10일  
심사청구일자 2021년08월25일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/050429
- (87) 국제공개번호 WO 2014/108198  
국제공개일자 2014년07월17일
- (71) 출원인  
젠맵 비. 브이  
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 워살라란 15
- (72) 발명자  
파렌, 폴  
네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60  
젠맵 비.브이. 내  
비르스켄스, 프란크  
네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60  
젠맵 비.브이. 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이상영

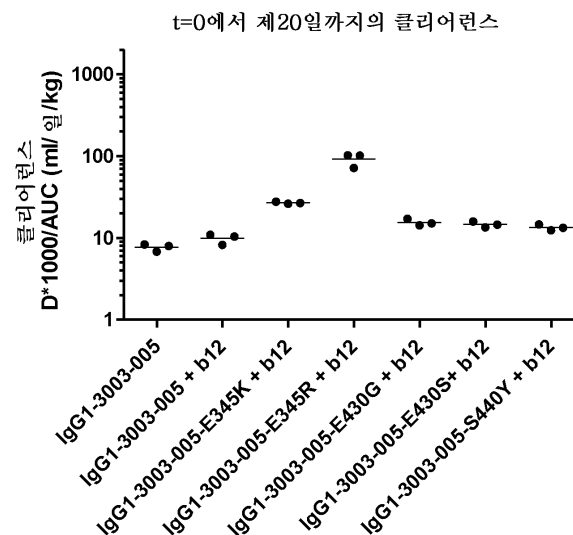
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 인간 IgG1 Fc 영역 변이체 및 그의 용도

## (57) 요약

변이체 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드 및 관련 항체가 본원에 기재된다. 변이체 Fc 도메인은 폴리펩티드(들), 항체 또는 항체들이 세포의 표면 상에서 그의 표적, 항원 또는 항원들에 결합하였을 때 안정화된 Fc:Fc 상호작용을 제공하며, 이에 따라 개선된 보체-의존성 세포독성(CDC)이 제공된다.

대표도 - 도32b



(52) CPC특허분류

**C07K 16/2863** (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/31* (2013.01)  
*C07K 2317/524* (2013.01)  
*C07K 2317/526* (2013.01)  
*C07K 2317/734* (2013.01)  
*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**데 중, 룽, 엔.**

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠  
맵 비.브이. 내

**페르플루젠, 산드라**

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠  
맵 비.브이. 내

**라브레인, 아란, 프란크**

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠  
맵 비.브이. 내

**쉬르만, 야닌**

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠  
맵 비.브이. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하고,

상기 돌연변이가 없는 모 폴리펩티드와 비교하여 상기 돌연변이가 도입된 상기 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체 (FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는,

모 폴리펩티드의 보체-의존성 세포독성(CDC)을 증가시키는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 모 폴리펩티드가 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체인 방법.

#### 청구항 3

모 항체의 보체-의존성 세포독성(CDC)을 증가시키는 방법이고,

상기 모 항체는 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며, 상기 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것이고,

상기 방법은 제1 및/또는 제2 CH2-CH3 영역에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하며,

여기서 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하며, 제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이한 것이고,

상기 방법은 상기 돌연변이가 없는 모 폴리펩티드와 비교하여 상기 돌연변이가 도입된 상기 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체 (FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는 것인,

모 항체의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키는 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 이중특이적 항체의 제1 및 제2 폴리펩티드 둘 다에 돌연변이를 도입하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에 있고; 제2 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에 있는 것인 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이가 K409R이고; 제2 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이가 F405L인 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이(단, S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님),
  - (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447 및 448에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이, 또는
  - (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447, 448 및 449에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이,
- 를 추가로 도입하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (i)에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이가 K439D/E 이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이가 S440K/R이고,

상기 (ii)에서, 돌연변이가 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K/R/H 및 448E/D로부터 선택된 것이고,

상기 (iii)에서, 돌연변이가 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E, 448K/R/H 및 449P로부터 선택된 것인,

방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (ii)에서의 돌연변이가 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K 및 448E이고, 상기 (iii)에서의 돌연변이가 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447E, 448K 및 449P인,

방법.

#### 청구항 10

적어도 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하며,

여기서 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 것이고,

상기 돌연변이가 없는 모 폴리펩티드와 비교하여 상기 돌연변이가 도입된 상기 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체 (FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는,

적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 제1 및 제2 모 폴리펩티드 둘 다에 동일하거나 상이할 수 있는 돌연변이를 도입하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제10항에 있어서,

(i) 제1 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 도입하고,

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 제2 모 폴리펩티드를 제공하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 제1 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 도입하는 단계, 및 (ii) 제2 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 아미노산

잔기에서의 제2 돌연변이를 도입하는 단계(단, 돌연변이는 S440Y 또는 S440W 이 아님); 또는

(iii) 제1 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 도입하는 단계(단, 돌연변이는 S440Y 또는 S440W 이 아님), 및 (iv) 제2 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 도입하는 단계

를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이가 K439D/E 이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이가 S440K/R인 방법.

#### 청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 각각 포함하는 제1 및 제2 모 항체인 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

제1 및/또는 제2 모 항체는 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하고,

제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것이며,

제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하며,

제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이한 것인 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역이 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고; 제2 CH2-CH3 영역이 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, K409에 해당하는 위치의 돌연변이가 K409R 이고/이거나 F405에 해당하는 위치의 돌연변이가 F405L인 방법.

#### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 변경시키지 않는 방법.

#### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 결합을 변경시키지 않고/않거나;

b) 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 OD405 nm에서의 흡광도 변화에 의해 측정시에 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 결합을 30% 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키지 않고/않거나;

- c) 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 마우스 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 겔보기 친화도를 배수(factor) 0.5 초과만큼 증가시키지 않거나 또는 마우스 FcRn에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 겔보기 친화도를 배수 2 초과만큼 감소시키지 않고/않거나;
- d) 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 클리어런스를 변경시키지 않고/않거나;
- e) 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 클리어런스를 배수 3.0 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키지 않고/않거나;
- f) 실시예 36에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화는 변경시키지 않고/않거나;
- g) 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 반감기는 변경시키지 않는 방법.

## 청구항 21

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 모 항체 또는 모 폴리펩티드는 단일특이적, 이중특이적, 및 다중특이적 항체로부터 선택된 것인 방법.

## 청구항 22

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체이며,

여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하고, 변이체는 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 가지며, Fc 도메인에서의 돌연변이는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키지 않고,

변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E345X/E430G, S, F, T, E430G, S, F, T/S440Y, 및 E430G, S, F, T/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2 개의 돌연변이의 조합을 포함하며, X는 K, Q, R 또는 Y인 변이체.

## 청구항 23

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체이며,

여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하고, 단 Fc 도메인에서의 돌연변이는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키지 않으며,

변이체는 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 가지고,

변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E345X/E430G, S, F, T, E430G, S, F, T/S440Y, 및 E430G, S, F, T/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2 개의 돌연변이의 조합을 포함하며, X는 K, Q, R 또는 Y인 변이체.

## 청구항 24

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체이며,

여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하고, 변이체는 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 가지며, Fc 도메인에서의 돌연변이는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키지 않고, 단 변이체는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는 것이며,

변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E345X/E430G, S, F, T, E430G, S, F, T/S440Y, 및 E430G, S, F, T/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2 개의 돌연변이의 조합을 포함하고, X는 K, Q, R 또는 Y인 변이체.

## 청구항 25

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체이며,

여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하고, 변이체는 증가된 보체-의존성 세포독성(CDC)을 가지며, Fc 도메인에서의 돌연변이는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키지 않고, 단 변이체는 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 OD405 nm에서의 흡광도 변화에 의해 측정시에 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 30% 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는 것이며,

변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E345X/E430G, S, F, T, E430G, S, F, T/S440Y, 및 E430G, S, F, T/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2 개의 돌연변이의 조합을 포함하고, X는 K, Q, R 또는 Y인 변이체.

#### 청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 변이체의 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- b) 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 혈장 클리어런스를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- c) 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 혈장 클리어런스를 배수 3.0 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- d) 변이체의 혈청 반감기를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- e) 실시예 36에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- f) 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 변이체의 결합을 10% 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- g) 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고/않거나;
- h) 오직 1 개의 돌연변이를 포함하는 변이체.

#### 청구항 27

이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체이며,

여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이; 및

(i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기(단, S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님),

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하거나 또는 K447K/R/H 및 448P에 해당하는 아미노산 잔기, 또는

(iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하거나 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 해당하는 아미노산 잔기

에 해당하는 군으로부터 선택된 제2 돌연변이를 포함하고,

Fc 도메인 내의 돌연변이는, 돌연변이가 도입된 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체(FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는 것인

변이체.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이, 및

인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 또는 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이(단, S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님)를 포함하는 변이체.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 K439D/E이고, S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 S440K/R인 변이체.

#### 청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 모 폴리펩티드가 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체인 변이체.

#### 청구항 31

이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체인 모 항체의 변이체이며,

여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 제1 및/또는 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며,

제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하고;

제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407 및 K409에 해당하는 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하며, 제1 폴리펩티드에서의 추가의 돌연변이는 제2 폴리펩티드에서의 추가의 돌연변이와 상이한 것이고,

Fc 도메인 내의 돌연변이는, 돌연변이가 도입된 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체(FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는 것인 변이체.

#### 청구항 32

제31항에 있어서,

(i) 제1 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하고;

(ii) 제2 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하거나; 또는 대안적으로

(iii) 제1 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하고;

(iv) 제2 폴리펩티드가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하는 것인 변이체.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, K409에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 K409R 이고/이거나 F405에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 F405L인 변이체.

#### 청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고/되거나 융합 단백질의 부분인 변이체.



### 청구항 35

각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제1 및 제2 변이체를 포함하며, 여기서 제1 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하고,

Fc 도메인 내의 돌연변이는, 돌연변이가 도입된 폴리펩티드의 신생아 Fc 수용체(FcRN)에 대한 결합을 변경시키지 않는 것인

조성물.

### 청구항 36

제35항에 있어서, 제1 및 제2 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 37

제36항에 있어서, 제1 및 제2 변이체가 둘 다 동일하거나 또는 상이할 수 있는 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 38

제35항에 있어서, 제1 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함하고,

제2 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F 및 E430T에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 것인 조성물.

### 청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 제1 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하고,
- (ii) 제2 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나; 또는
- (iii) 제1 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고;
- (iv) 제2 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있는 것인 조성물.

### 청구항 40

제39항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에서의 돌연변이가 K439D/E 이고/이거나 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 S440에서의 돌연변이가 S440K/R인 조성물.

### 청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 제1 변이체가 전구약물을 추가로 포함하고,
- (ii) 제2 변이체가 제1 변이체 상의 전구약물에 대한 활성화제를 포함하거나; 또는
- (iii) 제2 변이체가 전구약물을 포함하고,
- (iv) 제1 변이체가 제2 변이체 상의 전구약물에 대한 활성화제를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 42

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 모 폴리펩티드가 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 제1 및 제2 모 항체인 조성물.

#### 청구항 43

변이체 또는 제1 및 제2 모 항체가 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM, 또는 IgE 항체인,

제22항 내지 제34항의 변이체, 또는 제42항의 조성물.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, 변이체 또는 제1 및 제2 모 항체가 각각 인간 전장 항체인 변이체 또는 조성물.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 변이체 또는 제1 및 제2 모 항체가 각각 인간 전장 IgG1 항체인 변이체 또는 조성물.

#### 청구항 46

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항, 또는 제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 모 항체 및 변이체가 각각 단일특이적, 이중특이적 및 다중특이적 항체로부터 선택되는 것인 변이체 또는 조성물.

#### 청구항 47

제46항에 있어서,

제1 및/또는 제2 모 항체가 각각 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고,

여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이한 것인 조성물.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 제1 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에 있고; 제2 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에 있는 것인 조성물.

#### 청구항 49

제35항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 제1 및 제2 변이체가 동일한 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 조성물.

#### 청구항 50

제35항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다가 약물, 독소 또는 방사성 표지에 접합되고/되거나, 제1 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다가 융합 단백질의 부분인 조성물.

#### 청구항 51

제35항 내지 제46항 및 제49항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 제1 및/또는 제2 변이체가 오직 1개의 돌연변이를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 52

제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 변이체 또는 제35항 내지 제51항 중 어느 한 항에 따른 조성물 및 제약성 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

#### 청구항 53

요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한, 제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 제1 변이체 및 제2 변이체를 포함하는 부분들의 키트.

#### 청구항 54

제22항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 질환의 치료를 위한 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 암의 치료를 위한 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트.

#### 청구항 56

암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 청구항 22 내지 53 중 어느 한 항에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 용도.

#### 청구항 57

제22항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부를 영상화는데 사용하기 위한 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 Fc-도메인 내의 하나 이상의 아미노산 변형으로부터 생성되는 증가된 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 갖고, 또한 다른 변형된 이펙터 기능을 가질 수 있는 Fc 도메인-함유 폴리펩티드, 예컨대 항체에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 항체의 Fc 영역에 의해 매개되는 이펙터 기능은 외래 물질의 파괴, 예컨대 병원체의 사멸 및 항원의 클리어런스 및 분해를 허용한다. 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 항체-의존성 세포-매개 식세포작용 (ADCP)은 Fc 수용체 (FcR)-보유 세포에 대한 Fc 영역의 결합에 의해 개시되는 반면에, 보체-의존성 세포독성 (CDC)은 보체 활성화의 고전적 경로를 개시하는 C1q에 대한 Fc 영역의 결합에 의해 개시된다.

[0003] 각각의 IgG 항체는 C1q에 대한 2개의 결합 부위를 각각의 중쇄 불변 (Fc) 영역에 하나씩 함유한다. 그러나, 용액 내의 IgG의 단일 분자는 C1q에 대한 단량체 IgG의 친화도가 매우 약하기 때문에 ( $K_d \sim 10^{-4}$  M) 보체를 활성화시키지 못한다 (Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem. 248,2818-13; Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol. 16,697-701). IgG의 항원-유도 회합은 다가 C1q 분자의 훨씬 더 단단한 결합 ( $K_d \sim 10^{-8}$  M) 및 보체 활성화를 일으킬 수 있다 (Burton et al., 1990 Mol. Immunol. 22, 161-206). 이와 대조적으로, IgM은 자연적으로 공유 결합된 오량체 또는 육량체로 존재하고, 세포 발현된 또는 고정된 항원의 결합시에 IgM 오량체 및 육량체는 효율적으로 CDC를 도출할 수 있다. 항원-결합은 C1q 결합 부위를 노출시키기 위해 IgM 내의 입체형태 변화를 유도하기 위한 요건이다 (Feinstein et al., 1986, Immunology Today, 169-174).

[0004] 또한, IgG는 Fc 영역의 CH2/CH3 도메인의 상호작용을 통한 육량체 고리 구조의 형성에 의해 보체 활성화를 달성할 수 있다고 제안되었다 (Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69). 이러한 육량체 IgG 구조의 존재를 뒷받침하는 증거가 2차원 (Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4<sup>th</sup> edit. (Weir, D. M. ed.), pp17.1-17.5. Blackwell, Edinburgh; Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5) 및 3차원 결정에서 뿐만 아니라 용액 중의 IgG1, IgG2a 및 IgG4 및 인간 Fc (Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115)에서 관찰되었다. 육량체 고리 형성은 또한 HIV-1 gp120에 대해 지시된 b12 인간 IgG1 $\kappa$  항체의 결정 구조 (PDB 내의 1HZH)에서 관찰되었다 (Saphire et al., Science 2001 Aug

10;293(5532),1155-9). b12 육량체 고리에서, 각각의 6개의 항체로부터 하나씩 6개의 접근가능한 C1q 결합 부위가 육량체 표면에 존재하고, 다른 6개의 결합 부위는 아래로 향한다.

[0005] C1q는 6개의 콜라겐성 줄기에 테더링된, 항체 조합 영역을 함유하는 6개의 구상 헤드를 갖는 튜립 다발과 유사하다 (Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26; Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77; Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12; Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81). C1q는 1H2H 결정 구조의 b12 육량체 어셈블리에 잘 맞아서, 각각의 6개의 구상 헤드가 6개의 C1q 결합 부위 중 1개와 접촉하는 것으로 밝혀졌다 (Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5-10 July 2010; "Crystal Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Thesis by Erica Ollmann Saphire, for the Scripps Research Institute, La Jolla, California. November 2000). 결정 구조에서 대칭-관련 b12 항체들 사이에서 관찰된 Fc 인터페이스 내의 선택된 아미노산에서의 돌연변이는 C1q의 결합력을 감소시키는 것으로 관찰되었으며, 이는 이러한 아미노산이 분자간 Fc:Fc 상호작용에 기여한다는 것을 나타낸다.

[0006] WO 2006/104989는 변경된 항체 Fc 영역 및 그의 용도를 기재하고 있다.

[0007] WO 2005/047327은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)-결합 폴리펩티드 변이체, 이량체 Fc 결합 단백질, 및 그와 관련된 방법을 기재하고 있다.

[0008] WO 2010/106180은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대해 증가된 결합을 갖는 Fc 변이체를 기재하고 있다.

[0009] WO 2005/070963은 폴리펩티드 Fc 영역 변이체 및 그의 용도를 기재하고 있다.

[0010] WO 2006/053301은 FcRn에 대해 변경된 결합을 갖는 Fc 변이체를 기재하고 있다.

[0011] US 2011/0123440은 변경된 항체 Fc-영역 및 그의 용도를 기재하고 있다. 변경된 Fc-영역은 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0012] US 2008/0089892는 폴리펩티드 Fc-영역 변이체 및 이러한 Fc-영역 변이체를 포함하는 조성물을 기재하고 있다.

[0013] US 2010/0184959는 변경된 Fc 리간드 인식 및/또는 이펙터 기능을 갖는 Fc 폴리펩티드 변이체를 제공하는 방법을 기재하고 있다.

[0014] US 2010/015133은 폴리펩티드 회합을 조절함으로써 폴리펩티드를 생산하는 방법을 기재하고 있다.

[0015] US 2010/105873은 다중도메인 단백질을 생성하기 위한 통합된 접근법을 기재하고 있다.

[0016] US 6,737,056은 변경된 이펙터 기능을 갖는 폴리펩티드 변이체를 기재하고 있다.

[0017] 증진된 이펙터 기능 또는 다른 변형된 특성을 갖는 항체 Fc-변이체를 확인하기 위해 노력이 이전에 시도되었다. 이러한 연구는 예를 들어 키메라 IgG 분자의 생성을 위한 IgG 이소형 사이의 절편 교환 (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72) 또는 힌지 영역 내의 (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138) 또는 잔기 D270, K322, P329, 및 P331 주위에 집중된, CH2 도메인 내의 C1q-결합 부위 내의 또는 근처의 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564 및 WO 99/51642) 아미노산 치환에 초점을 맞추었다. 예를 들어, 문헌 [Moore et al. (2010 mAbs 2(2), 181-189)]은 CDC 또는 ADCC를 통한 증진된 이펙터 기능을 위한 S267E, H268F, S324T, S239D, I332E, G236A 및 I332E의 다양한 조합을 시험하는 것을 기재하고 있다. Fc-수용체에 대한 결합 (WO 2006/105062, WO 00/42072, 미국 특허 6,737,056 및 미국 특허 7,083,784) 또는 항체의 물리적 특성 (WO 2007/005612 A1)에 영향을 주는 다른 Fc 돌연변이가 또한 제시되었다.

[0018] 그러나, 관련 기술분야에서의 이들 및 다른 진전에도 불구하고, 새롭고 개선된 항체-기재 치료제에 대한 필요성이 계속 존재한다.

## 발명의 내용

[0019] 본 발명은 그의 모 폴리펩티드/항체와 비교하여 증진된 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 갖고, 또한 다른 증진된 이펙터 기능을 가질 수 있는 폴리펩티드 및 항체 변이체를 제공한다. 이론에 제한되지 않고, 변이체는 2개의 폴리펩티드/항체 분자의 Fc 영역 사이의 보다 안정한 결합 상호작용이 가능하며, 이에 의해 증진된 이펙터 기능, 예컨대 증가된 또는 보다 특이적인 CDC 반응을 생성하는 보다 결합력이 높은 표면이 제공되는 것으로 여겨진다. 특정한 변이체는 또한 개선된 ADCC 반응, ADCP 반응, 및/또는 다른 증진된 이펙터 기능을 특징으로 한

다. 이러한 폴리펩티드/항체 조작용의 정교한 메카니즘은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 항체-기체 치료제의 효능 또는 특이성을 증가시키는데 적용될 수 있다.

- [0020] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하는, 상기 모 폴리펩티드의 보체-의존성 세포독성 (CDC)를 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 추가 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0022] 본 발명은 또한 예를 들어 항원-발현 세포, 세포 막 또는 비리온의 표면 상의 그의 항원에 결합되었을 때 폴리펩티드 또는 항체에 의해 매개되는 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키기 위한 하나 이상의 이러한 돌연변이(들)의 용도를 제공한다.
- [0023] 한 측면에서, 본원에서 "단일-돌연변이체"로 지칭되는 변이체는 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 증가된 CDC를 갖고, 또한 다른 증가된 이펙터 기능을 가질 수 있다.
- [0024] 한 측면에서, 본원에서 "이중-돌연변이체"로 지칭되는 변이체는 상기 절편에 적어도 2개의 돌연변이를 포함하고, 상기 적어도 2개의 돌연변이 중 오직 1개만을 포함하는 변이체와 비교하여 개선된 CDC를 갖고, 또한 다른 개선된 이펙터 기능을 가질 수 있다.
- [0025] 한 측면에서, 본원에서 "혼합-돌연변이체"로 지칭되는 변이체는, 상기 절편에 내의 상이한 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 동일한 또는 상이한 폴리펩티드 또는 항체의 제2 변이체와 조합되어 사용될 때, 변이체, 제2 변이체, 및 모 폴리펩티드 또는 모 항체 단독 중 하나 이상과 비교하여 증가된 CDC를 제공하고, 또한 다른 증가된 이펙터 기능을 가질 수 있다.
- [0026] 전형적으로, 돌연변이는 아미노산 치환, 예컨대 모 아미노산 잔기를, 새로운 분자간 Fc:Fc 결합의 형성을 촉진하거나 또는 기존의 쌍의 상호작용 강도를 증가시키는, 상이한 크기 및/또는 물리화학적 특성을 갖는 잔기로 교체하는 돌연변이이다. 본 발명에 따른 돌연변이에 대한 예시적인 아미노산 잔기는 예시적인 아미노산 치환과 함께 표 1 및 2A 및 B에 제시된다. 본 발명의 상이한 측면의 비-제한적 설명이 도 1에 제공된다.
- [0027] 본 발명의 이들 및 다른 측면, 특히 폴리펩티드 및 항체 변이체에 대한 다양한 용도 및 치료적 적용이 하기에 보다 상세히 기재된다.

## 도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1: (a) 육량체를 형성한 IgG 분자의 개략적 표현. 점선 원은 2개의 이웃하는 IgG 분자의 2개의 인접한 Fc:Fc 상호작용 쌍을 보여준다. 박스 내의 화살표는 b, c 및 d의 도면을 바라보는 방향을 보여주고: 2개의 이웃하는 Fc 분자는 (도면의 평면에서) 90° 회전하고, Fab-아암으로부터 CH3 도메인의 방향으로 바라본다. (b) CDC에 대한 올리고머화-증진 돌연변이의 관찰된 효과. 본 발명의 단일 돌연변이체 및 이중 돌연변이체 측면에 따라 증가된 효능을 갖는 Fc:Fc 상호작용 쌍을 보여주는 개략적 표현. (c) CDC에 대한 올리고머화-억제 돌연변이의 관찰된 효과. 본 발명의 이중 돌연변이체 및 혼합 돌연변이체 측면에 따라 Fc:Fc 상호작용을 회복하거나 또는 증가시키기 위해, 서로 보완적인 적어도 2개의 올리고머화-억제 돌연변이가 어떻게 하나의 분자로 조합되거나 (이중 돌연변이체 측면), 또는 2개의 분자로 분리될 수 있는지 (혼합 돌연변이체 측면) 보여주는 개략적 표현. 혼합 돌연변이체는 상이한 표적을 인식할 수 있는, 두 항체의 결합에 의존성인 특이적 이펙터 기능 활성화를 달성한다. (d) CDC에 대한 C1q 결합-억제 돌연변이의 이론적 효과. 돌연변이가 C1q-결합을 억제하면, C1q는 항체에 도입된 결합을 보완할 수 없기 때문에 이들 돌연변이가 CDC 활성을 회복하기 위해 조합되거나 혼합될 수 없다는 것을 보여주는, Fc:C1q 상호작용의 개략적 표현.

도 2: 클러스탈(Clustal) 2.1 소프트웨어를 이용하여, 카바트에 제시된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 넘버링된 IgG1 중쇄 내의 잔기 P247 내지 K447에 해당하는 인간 IgG1, IgG1f, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE 및 IgM Fc 절편의 서열 정렬. 제시된 서열은 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 (서열 1; 유니프룻(Uniprot) 수탁 번호 P01857) 및 동종이형 변이체 IgG1m(f)의 잔기 130 내지 330; IgG2 중쇄 불변 영역의 잔기 126 내지 326 (서열 2; 유니프룻 수탁 번호 P01859); 및 IgG3 중쇄 불변 영역의 잔기 177 내지 377 (서열 2; 유니프룻 수탁 번호

P01860); 및 IgG4 중쇄 불변 영역의 잔기 127 내지 327 (서열 4; 유니프롯 수탁 번호 P01861); 및 IgE 불변 영역의 잔기 225-428 (유니프롯 수탁 번호 P01854); 및 IgA1 불변 영역의 잔기 133-353 (유니프롯 수탁 번호 P01876); 및 IgA2 불변 영역의 잔기 120-340 (유니프롯 수탁 번호 P01877); 및 IgM 불변 영역의 잔기 230-452 (유니프롯 수탁 번호 P01871); 및 IgD 불변 영역의 잔기 176-384 (유니프롯 수탁 번호 P01880)를 나타낸다.

도 3a 및 b: IgG1 (서열 3), IgG4 (서열 5) 및 (부분적) IgG3 (서열 6) 백본에서의 항-EGFr 항체 2F8의 서열 정렬. 카바트 및 EU-인덱스에 따른 아미노산 넘버링이 도시된다 (둘 다 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재됨).

도 4: 야생형, 변형되지 않은 Fc 및 Fc' 분자 사이의 상호작용을 보여주는, 다량체 (예를 들어, 육량체) 배열에서의 인접한 분자의 Fc (각각, Fc 및 Fc') 사이의 K439/S440 상호작용의 상세도.

도 5: K439E 및 S440K 돌연변이를 포함하는 변이체 Fc 및 Fc' 분자 사이의 상호작용을 보여주는, 다량체 (예를 들어, 육량체) 배열에서의 인접한 분자의 Fc (각각, Fc 및 Fc') 사이의 K439/S440 상호작용의 상세도.

도 6: 7D8 Fc:Fc 돌연변이체를 사용하는 C1q 결합 ELISA. 일련의 농도의 지시된 항체를 마이크로타이터 플레이트의 웰에 코팅하고, 고정 농도의 C1q와 인큐베이션하였다. I253D를 제외한 모든 코팅된 돌연변이체에서 C1q에 결합하는 효율이 야생형 7D8과 대등하였다. 적어도 3회의 대표적 실험이 제시된다.

도 7: CD20-양성 Raji 세포에 대한, 7D8 변이체에 의해 매개되는 CDC. 세포 용해를 측정함으로써 CDC 효능을 시험하기 위해 Raji 세포를 7D8 돌연변이체 (K439E, S440K, K439E/S440K 이중 돌연변이체, K439E + S440K 혼합물) 및 일련의 농도의 C1q와 인큐베이션하였다. 반복 실험의 대표적 그래프가 제시된다.

도 8: CD20-양성 Daudi 세포에 대한, 7D8 돌연변이체 (7D8-WT, K439E, S440K, K439E/S440K 이중 돌연변이체, K439E + S440K 혼합물)에 의해 매개되는 CDC. 일련의 농도의 7D8 돌연변이체를 CDC를 유도하는 그의 효능에 대해 시험하였다.

도 9: CD38-양성 세포에 대한, CD38 항체 HuMAb 005의 돌연변이체에 의해 매개되는 CDC. (a) 일련의 농도의 005 돌연변이체에 의한 Daudi 세포에 대한 CDC 효능. (b) 일련의 농도의 HuMAb 005 돌연변이체에 의한 Raji 세포에 대한 CDC 효능. (c) Wien133 세포에 대한, 20% 또는 50% NHS 중 어느 하나를 사용한 HuMAb 005의 E345R 돌연변이체의 CDC 효능. (d) Raji 세포에 대한, 20% 또는 50% NHS 중 어느 하나를 사용한 HuMAb 005 및 7D8의 E345R 돌연변이체의 CDC 효능. 일시적 형질감염으로부터 단리된 정제되지 않은 항체 샘플을 시험하였다. 음성 대조군으로서, 모의-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

도 10: Fc-결합 펩티드를 사용하는 경쟁 실험에서 CD38 항체 HuMAb 005 (a) 및 CD20 항체 HuMAb 7D8 (b)의 야생형 및 E345R 돌연변이체에 의한 CDC. 세포 용해는 일련의 농도의 Fc-결합 DCAWHLGELVWCT 펩티드 (서열 7)와 인큐베이션된 항체-옵소닌화 Daudi-세포에 대한 CDC 이후에 측정하였다. 일시적 형질감염으로부터 단리된 정제되지 않은 항체 샘플을 사용하였다. 음성 대조군으로서, 모의-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

도 11: 야생형 CD38 항체 HuMAb 005 및 돌연변이체 IgG1-005-E345R에 의한 CD38 발현 Daudi 세포의 ADCC. 한 공여자의 PBMC의 ADCC가 제시된다 (용해%로 도시됨).

도 12: pH 6에서 ELISA에 의해 결정된 바와 같은, 인간, 시노폴구스 및 마우스 FcRn에 대한 야생형 IgG1-7D8 및 돌연변이체 IgG1-7D8-E345R의 결합.

도 13: SCID 마우스에서의 정맥내 주사 후의 야생형 IgG1-7D8 및 -E354R, -S440K 및 K322A 변이체의 혈장 농도.

도 14a, b, c, 및 d: CD20- 및 CD38-양성 Wien133 세포에 대한 CDC.

도 15a 및 b: Raji-luc #2D1 세포를 사용하는 피하 이종이식편 모델에서의 IgG1-7D8-E345R의 생체내 효능 평가.

도 16a 및 b: Raji-luc #2D1 세포를 사용하는 피하 이종이식편 모델에서의 IgG1-005-E345R의 생체내 효능 평가.

도 17: E345R 돌연변이를 갖는 CD38/EGFR 이중특이적 항체에 의한 CD38-양성, EGFR-음성 Wien133 세포에 대한 CDC.



도 18a 및 b: E345R 돌연변이를 갖는 및 갖지 않는 CD20/CD38 이중특이적 항체에 의한 CD20-양성, CD38-음성 Wien133 세포 또는 Raji 세포에 대한 CDC.

도 19: E345R 돌연변이를 갖는 EGFR 항체 2F8에 의한 EGFR-양성 A431 세포에 대한 CDC.

도 20a 및 b: E345R 돌연변이체 항체에 의해 매개되는 CDC.

도 21: 리소솜 마커 LAMP1 (APC)과 TF 항체 (FITC)의 공동국재화 분석.

도 22a-d: E345R의 도입은 상이한 B 세포주에 대해 시험된 야생형 리톡시맙과 비교하여 증진된 CDC-매개 사멸을 발생시킨다.

도 22e: E345R의 도입은 대등한 CD20 발현 수준을 갖는 상이한 B 세포주에서 보체 조절 단백질 CD46 (a), CD55 (b) 또는 CD59 (c)의 발현 수준과 무관하게, 야생형 리톡시맙과 비교하여 증가된 최대 CDC-매개 사멸을 발생시킨다.

도 23: CDC 동역학. E345R 항체는 야생형 항체와 비교하여 보다 빠르고 보다 실질적인 CDC에 의한 표적 세포 용해를 발생시킨다.

도 24: CDC 동역학. 이중특이적 CD38xCD20 항체에 E345R 돌연변이를 도입하는 것은 보다 빠르고 보다 실질적인 CDC-매개 표적 세포 용해를 발생시킨다.

도 25a-b: CDC 동역학. EGFR-음성 Raji 세포에 1가로 결합하는 이중특이적 항체 CD38xEGFR (a) 및 CD20xEGFR (b)에 E345R 돌연변이를 도입하는 것은 보다 빠르고 보다 실질적인 CDC-매개 표적 세포 용해를 발생시킨다.

도 26a-f: (a-c) E345R 및 Q386K 또는 (d-f) E345R, E430G 및 Q386K를 함유하는 돌연변이체 항체와 야생형 항체의 조합물에 의한, Wien133 세포에 대한 CDC. IgG1-b12 돌연변이체는 Wien133 세포에 결합하지 않고, 음성 대조군 항체로 사용되었다.

도 27: E345R 돌연변이를 함유하는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 이소형 항체의 CDC 효능.

도 28: 야생형 CD38 항체 005에 Fc-Fc 안정화 E345R 돌연변이를 도입하는 것은 생체의 CDC 검정 (평균  $\pm$  평균의 표준 오차)에서 일차 CLL 세포의 증진된 사멸을 발생시킨다.

도 29: ELISA에 의해 결정된 바와 같은, pH 6.0에서의 인간, 마우스, 및 시노몰구스 FcRn에 대한 야생형 IgG1-005 및 IgG1-005 돌연변이체의 FcRn 결합.

도 30: Ramos 및 SU-DHL-4 세포주에서의, 다양한 리톡시맙 돌연변이체, 야생형 리톡시맙 및 비관련 음성 대조군 항체 IgG1-b12의 20% 정상 인간 혈청 중에서의 CDC 효능.

도 31: 마이크로 뷰(Micro Vue) C4d-단편 ELISA에 의해 결정된 바와 같은, 야생형 IgG1-005, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, 및 IgG1-005-S440Y, 및 열 응집된 IgG (HAG) (양성 대조군)의 정상 인간 혈청 중에서의 C4d 생성.

도 32a/b: 전체 인간 IgG ELISA (도 32a) 및 인간 CD38 특이적 ELISA (도 32b)에 의해 결정된 바와 같은 SCID 마우스에서의 투여된 야생형 IgG1-005 및 항체 변이체 IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430F, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430T, 및 IgG1-005-S440Y의 혈장 클리어런스를.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029]

본원에 기재된 바와 같이, 놀랍게도, Fc:C1q 결합에 직접 관여하지 않는 아미노산에서의 돌연변이는 그럼에도 불구하고 항체의 CDC를 증가시킬 수 있고, 또한 항체의 다른 Fc-매개 이펙터 기능을 개선할 수 있다. 이는 항체 분자, 예컨대 IgG1 항체가 나중에 C1q에 의해 결합되는 올리고머 구조를 형성할 수 있다는 가설을 지지한다. 또한, 일부 돌연변이는 CDC-유도를 감소시키는 것으로 밝혀졌지만, 동일한 또는 상이한 항체 분자 내의 상기 돌연변이의 일부의 조합은 CDC-유도 회복을 유도하였고, 항체의 올리고머화에 대한 추가의 특이성을 보였고, 따라서 보다 특이적인 CDC-유도를 촉진하였다. 또한, CDC-반응을 증가시키는 특정한 돌연변이는 실시예에 제시된 바와 같이 마우스 종양 모델 시스템에서 개선된 ADCC 반응, 증가된 결합력, 증가된 내재화 및 생체내 효능을 특징으로 하였다. 이러한 발견은 증진된 CDC-유도 능력, 보다 선택적인 CDC-유도, 및/또는 다른 개선된 이펙터 기능을 갖는 신규 항체-기재 치료제의 개발을 허용한다.

- [0030] IgG1 내의 아미노산 잔기 E345 내지 S440에 해당하는 절편에 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 변이체 (항체 변이체 포함)는 모두 결합 영역 및 이뮤노글로불린의 전장 또는 부분 Fc 도메인을 포함한다. 이론에 제한되지 않고, 확인된 돌연변이는 도 1에 개략적으로 제시되고 본원에서 "단일 돌연변이체", "이중 돌연변이체" 및 "혼합 돌연변이체"로 지칭되는 3가지의 상이한 이론에 기초하여 보다 효과적인 및/또는 보다 특이적인 CDC-유도를 발생시키는 것으로 여겨진다.
- [0031] 본 발명의 변이체의 개선된 C1q 및/또는 CDC 효과는 오직 항체 올리고머 형성을 허용하는 김정, 예컨대 항원이 고정되지 않고 유체 막에 존재하는 세포-기반 김정에서만 주로 검출가능하다. 또한, 이러한 효과가 C1q의 직접적인 결합 부위의 변형으로부터가 아니라 보다 안정한 항체 올리고머로부터 발생한다는 것은 도 1c에 제시된 이론에 따라 확인될 수 있다.
- [0032] 정의
- [0033] 용어 "단일-돌연변이체"는 모 폴리펩티드 또는 항체와 비교하여 증가된 CDC를 갖고 또한 다른 증진된 이펙터 기능을 가질 수 있는 본 발명의 변이체로서 이해되어야 한다.
- [0034] 용어 "이중-돌연변이체"는 상기 절편에 적어도 2개의 돌연변이를 포함하는 변이체이며, 상기 적어도 2개의 돌연변이 중 오직 1개만을 포함하는 변이체와 비교하여 개선된 CDC를 갖고, 또한 다른 증진된 이펙터 기능을 가질 수 있는 변이체로서 이해되어야 한다.
- [0035] 용어 "혼합-돌연변이체"는, 상기 절편 내의 상이한 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 동일한 또는 상이한 폴리펩티드 또는 항체의 제2 변이체와 조합되어 사용될 때, 변이체, 제2 변이체, 및 모 폴리펩티드 또는 항체 단독 중 하나 이상과 비교하여 증가된 CDC, 또한 임의적으로 다른 증진된 이펙터 기능을 제공하는 변이체로서 이해되어야 한다.
- [0036] 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 본 발명의 문맥에서 이뮤노글로불린의 Fc-도메인, 및 예를 들어 세포, 박테리아, 또는 비리온 상에 존재하는 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드에 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 이뮤노글로불린의 Fc-도메인은 이뮤노글로불린의 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역을 포함하는, 일반적으로 파파인에 의한 항체의 소화 (통상의 기술자에게 공지됨) 후에 생성되는 항체의 단편으로 규정된다. 항체 중쇄의 불변 도메인은 항체 이소형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD 또는 IgE를 규정한다. Fc-도메인은 Fc 수용체로 불리는 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 단백질과 항체의 이펙터 기능을 매개한다. 결합 영역은 세포, 박테리아 또는 비리온에 결합할 수 있는 폴리펩티드 서열, 예컨대 단백질, 단백질 리간드, 수용체, 항원-결합 영역, 또는 리간드-결합 영역일 수 있다. 결합 영역이 예를 들어 수용체이면, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 이뮤노글로불린의 Fc-도메인과 상기 결합 영역의 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 결합 영역이 항원-결합 영역이면, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 항체, 예컨대 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 중쇄 단독 항체 또는 ScFv-Fc-융합체일 수 있다. 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드는 전형적으로 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역, 및 이뮤노글로불린의 중쇄의 2개의 CH2-CH3 영역을 포함할 수 있고, 따라서, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 "적어도 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"일 수 있다. 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인"은 본 발명의 문맥에서 연결 영역, 예를 들어 항체의 하위유형, 예를 들어 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgM 또는 IgE에 따른 힌지, 및 이뮤노글로불린의 CH2 및 CH3 영역이 존재함을 의미한다. 폴리펩티드는 인간 기원으로 제한되지 않지만, 임의의 기원, 예컨대 예를 들어 마우스 또는 시노물구스 기원의 것일 수 있다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH2 영역을 지칭하도록 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 228-340에 해당한다. 그러나, CH2 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH3 영역을 지칭하도록 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 341-447에 해당한다. 그러나, CH3 영역은 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 다른 하위유형일 수 있다.
- [0039] 용어 "이뮤노글로불린"은 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 잠재적으로 상호연결된 한 쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 한 쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 체로 이루어지는, 구조적으로 관련된 당단백질의 부류를 나타낸다. 이뮤노글로불린의 구조는 널리 특성화되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W.,



ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)]을 참조한다. 간략하게, 각각의 중쇄는 전형적으로 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설파이드 결합을 통해 상호-연결된다. 각각의 경쇄는 전형적으로 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 전형적으로 1개의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 불리는 초가변 영역 (또는 서열이 초가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성할 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있고, 이들 영역에는 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)] 참조). 달리 나타내지 않거나 문맥상 모순되지 않는 한, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 EU-인덱스에 따라 넘버링된다 (문헌 [Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)]에 기재됨).

[0040]

본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들 중 어느 하나의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 유의한 기간의 시간, 또는 기능적으로 정의된 임의의 다른 관련 시간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합과 연관된 생리학적 반응을 유도하고/하거나, 촉진하고/하거나, 증진시키고/시키거나 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는데 충분한 시간)의 반감기로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 본 발명의 항체는 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함한다. 항체는 일반적으로 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어 힌지 영역, 예를 들어 적어도 Fc-도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체는 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 또는 "Fc" 영역은 숙주 조직 또는 인자 (면역계의 다양한 세포 (예컨대, 이펙터 세포) 포함) 및 보체 시스템의 성분, 예컨대 C1q (보체 활성화의 고전적 경로의 제1 성분)에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 또한 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 또는 유사한 분자일 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 에피토프, 전형적으로 비-중첩 에피토프에 대해 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 에피토프는 동일한 또는 상이한 표적 상에 존재할 수 있다. 에피토프가 상이한 표적 상에 존재할 경우, 이러한 표적은 동일한 세포 또는 상이한 세포 또는 세포 유형 상에 존재할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 나타내거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 적어도 Fc-영역의 일부를 포함하고 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 임의의 공지된 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성 및 재조합 발현 기술에 의해 제공될 수 있다. 항체의 항원-결합 기능이 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "Ab" 또는 "항체" 내에 포괄되는 결합 단편의 예는 1가 항체 (WO2007059782 (젠맵(Genmab)에 기재됨); 오직 2개의 중쇄로 이루어지며, 예를 들어 낙타류에서 자연 발생한 중쇄 항체 (예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446]); 티오Mab (로슈(Roche), WO2011069104), 대칭적 및 이중특이적 항체-유사 분자인 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED 또는 시드-바디(Seed-body)) (머크(Merck), WO2007110205); 트리오맵(Triomab) (프레제니우스(Fresenius), 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)]); Fc $\Delta$ Adp (레게네론(Regeneron), WO2010151792), 아지메트릭 스캐폴드 (자임워크스(Zymeworks)/머크, WO2012/058768), mAb-Fv (젠코르(Xencor), WO2011/028952), 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (애보트(Abbott), DVD-Ig, 미국 특허 번호 7,612,181); 이중 도메인 이중 헤드 항체 (유니레버(Unilever); 사노피 아벤티스(Sanofi Aventis), WO20100226923), 디-디아바디(Di-diabody) (임클론(ImClone)/일라이 릴리(Eli Lilly)), 노브-인투-홀(Knobs-into-holes) 항체 포맷 (제넨테크(Genentech), WO9850431); 듀오바디(DuoBody) (젠맵, WO 2011/131746); 정전기적 스티어링 항체 포맷 (암젠(Amgen), EP1870459 및 WO 2009089004; चुगाई(Chugai), US201000155133; 온코메드(Oncomed), WO2010129304A2); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코포레이션(Rinat neurosciences Corporation), WO11143545), 크로스Mab (로슈, WO2011117329), LUZ-Y (제넨테크), 바이클로닉(Biclonic) (메루스(Merus)), 이중 표적화 도메인 항체 (GSK/도만티스(Domantis)), 2개의 표적을 인식하는 투-인-원(Two-in-one) 항체 (제넨테크, 노브이문(NovImmune)), 가교 Mab (카르마노스 캔서 센터(Karmanos Cancer Center)), CovX-바디 (CovX/화이자(Pfizer)), IgG-유사 이중특이적 (임클론/일라이 릴리, 문헌 [Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74]), 및 DIG-바디 및 PIG-바디 (파르마브신(Pharmabincine)), 및 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART, 마크로

제닉스(MacroGenics), WO/2008/157379, WO/2010/080538), 자이바디스(Zybodyes) (자인게니아(Zyngenia)), 통상의 경쇄 (크루셀(Crucell)/메루스, US7262028) 또는 통상의 중쇄 ( $\kappa$   $\lambda$  바디스, 노브이문)를 사용하는 접근법 뿐만 아니라 Fc-도메인 유사 scFv-융합체를 함유하는 항체 단편에 융합된 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질 (BsAb와 같음, 지모제네틱스(ZymoGenetics)/BMS), 허큘레스(HERCULES) (비오젠 아이텍(Biogen Idec)) (US007951918), 스콜피온스(SCORPIONS) (이머전트 바이오솔루션즈(Emergent BioSolutions)/트루비온(Trubion)), Ts2Ab (메드이문(MedImmune)/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), scFv 융합체 (노파르티스(Novartis)), scFv 융합체 (장저우 아담 비오텍 인크(Changzhou Adam Biotech Inc) (CN 102250246), TvAb (로슈) (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb<sup>2</sup> (f-스타(f-Star)) (WO2008/003116), 및 이중 scFv-융합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 달리 특정되지 않으면, 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (예컨대, 인간 모노클로날 항체), 예를 들어 심포겐(Symphogen) 및 메루스 (올리고클로닉스(Oligoclonics))에 의해 이용된 기술에 의해 생성된 항체 혼합물 (재조합 폴리클로날), 및 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체도 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생성된 항체는 잠재적으로 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0041] 용어 "전장 항체"는 본원에 사용될 때 이소형의 야생형 항체에서 통상적으로 발견되는 것에 해당하는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유하는 항체 (예를 들어, 모 또는 변이체 항체)를 의미한다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이, 삽입 또는 결실)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 그래프트된 항체를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체", "모노클로날 Ab", "모노클로날 항체 조성물", "mAb" 등은 단일 분자 조성의 Ab 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 Ab를 지칭한다. 인간 mAb는 기능적 인간 항체를 생산하도록 재배열되고 불멸화 세포에 융합된, 인간 중쇄 트랜스진 레퍼토리 및 경쇄 트랜스진 레퍼토리를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말 비인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE, 또는 IgM 또는 그의 임의의 동종이형, IgG1m(za) 및 IgG1m(f))를 지칭한다. 또한, 각각의 중쇄 이소형은 카파( $\kappa$ ) 또는 람다( $\lambda$ ) 경쇄와 조합될 수 있다.

[0045] 용어 "1가 항체"는 본 발명의 문맥에서 항체 분자가 항체의 결합 도메인 중 오직 하나에 의해서만 항원에 결합할 수 있고, 예를 들어 단일 항원-항체 상호작용을 갖고, 따라서 항원에 가교결합할 수 없다는 것을 의미한다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "표적"은 본 발명의 문맥에서 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드의 결합 영역이 결합하는 분자로서 이해되어야 하고, 항체의 결합의 측면에서, 사용될 때에는 생성된 항체가 제시되는 임의의 항원을 포함한다. 용어 "항원" 및 "표적"은 항체와 관련하여 교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서, 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 소정의 항원에 대한 항체의 결합이라는 맥락에서 "결합"이라는 용어는 전형적으로 예를 들어 항원을 리간드로 사용하고 항체를 분석물로 사용하여 비아코어(BIAcore) 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정하는 경우 약  $10^{-6}$  M 이하, 예를 들어  $10^{-7}$  M 이하, 예컨대 약  $10^{-8}$  M 이하, 예컨대 약  $10^{-9}$  M 이하, 약  $10^{-10}$  M 이하, 또는 약  $10^{-11}$  M 또는 심지어는 그 미만의  $K_D$ 에 상응하는 친화도를 갖는 결합이고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 그의 결합 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  $K_D$ 에 상응하는 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 보다 낮은 친화도를 나타내는 양은 항체의  $K_D$ 에 의존성이며, 이에 따라 항체의  $K_D$ 가 매우 낮은 경우 (즉, 항체가 고도로 특이적인 경우), 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 낮은 항원에 대한 친화도를 나타내는 양은 적어도 10,000배일

수 있다. 본원에 사용된 용어 " $K_D$ " (M)는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0048]

본 발명의 "변이체" 또는 "항체 변이체" 또는 "모 항체의 변이체"는 "모 항체"와 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 항체 분자이다. 상이한 용어가 교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서, 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다. 예시적인 모 항체 포맷은 비제한적으로, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 이중특이적 항체, 인간 항체, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 이와 유사하게, 본 발명의 "변이체" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드의 변이체" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체"는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드"와 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"이다. 상이한 용어가 교환가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에서, 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다. 예시적인 돌연변이는 모 아미노산 서열 내의 아미노산의 아미노산 결실, 삽입, 및 치환을 포함한다. 아미노산 치환은 천연 아미노산을 또 다른 자연 발생 아미노산으로, 또는 비-자연 발생 아미노산 유도체로 교환할 수 있다. 아미노산 치환은 보존적 또는 비-보존적 치환일 수 있다. 본 발명의 문맥에서, 보존적 치환은 하기 3개의 표 중 하나 이상에서 반영되는 아미노산의 클래스 내에서의 치환에 의해 정의될 수 있다:

보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 부류

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

[0049]

대안적인 보존적 아미노산 잔기 치환 부류

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
| 1 | A | S | T |
| 2 | D | E |   |
| 3 | N | Q |   |
| 4 | R | K |   |
| 5 | I | L | M |
| 6 | F | Y | W |

[0050]

아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 부류

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

[0051]

- [0052] 본 발명의 문맥에서, 변이체 내의 치환은 다음과 같이 표시된다:
- [0053] 원래의 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산;
- [0054] 아미노산 잔기를 나타내기 위해 코드 Xaa 및 X를 비롯한 3 문자 코드, 또는 1 문자 코드가 사용된다. 따라서, 표현 "E345R" 또는 "Glu345Arg"는 변이체가 모 항체 내의 위치 345의 아미노산에 해당하는 변이체 아미노산 위치에서의 글루탐산의 아르기닌으로의 치환을 포함한다는 것을 의미한다.
- [0055] 상기 위치가 항체 내에 존재하지 않는 경우에도, 변이체는 예를 들어 하기 아미노산의 삽입을 포함한다:
- [0056] 위치 - 치환된 아미노산; 표현, 예를 들어 "448E"가 사용된다.
- [0057] 이러한 표현은 일련의 상동성 폴리펩티드 또는 항체에서의 변형(들)과 특히 관련된다.
- [0058] 유사하게, 치환 아미노산 잔기(들)의 유형이 중요하지 않은 경우:
- [0059] 원래의 아미노산 - 위치; 또는 "E345".
- [0060] 원래의 아미노산(들) 및/또는 치환된 아미노산(들)이 모든 아미노산(들)은 아니지만 하나 초과와 아미노산을 포함할 수 있는 변형의 경우에, 위치 345에서 글루탐산의 아르기닌, 리신 또는 트립토판으로의 치환:
- [0061] "Glu345Arg,Lys,Trp" 또는 "E345R,K,W" 또는 "E345R/K/W" 또는 "E345 → R, K 또는 W"
- [0062] 가 본 발명의 문맥에서 교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0063] 또한, 용어 "치환"은 다른 19개의 천연 아미노산 중 어느 하나로, 또는 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산으로의 치환을 포함한다. 예를 들어, 위치 345에서의 아미노산 E의 치환은 각각의 하기 치환을 포함한다: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W, 및 345Y. 이것은 표현 345X와 동등한 것이고, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 이들 치환은 또한 E345A, E345C 등 또는 E345A,C, 등, 또는 E345A/C/등으로 표기될 수 있다. 동일한 방식이, 특히 이러한 치환 중 어느 하나가 본원에 포함되도록, 본원에서 언급된 각각의 및 모든 위치에 유사하게 적용된다.
- [0064] 또 다른 서열에서의 아미노산 또는 절편"에 해당하는" 하나의 서열에서의 아미노산 또는 절편은 (i) 전형적으로 디폴트 설정에서 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, 클러스탈W 또는 유사한 것을 사용하여 다른 아미노산 또는 절편과 정렬시키고, (ii) 서열 1에 대해 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 것이다. 예를 들어, 도 2 및 3에 제시된 서열 정렬이, IgG1 Fc 서열 내의 특정한 아미노산에 해당하는 IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 서열 내의 임의의 아미노산을 확인하기 위해 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명은 서열 1, 2, 3, 4, 및 5의 아미노산 P247 내지 K447에 대해 특정 정도의 동일성을 갖는 변이체, 즉 모 폴리펩티드 및 모 항체, 및/또는 변이체 폴리펩티드 및 변이체 항체에 관한 것이고, 이러한 모 및/또는 변이체 항체는 이하에서 "상동 항체"로 지칭된다.
- [0066] 본 발명의 목적에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성의 정도, 뿐만 아니라 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성의 정도는 니들만-분쉬(Needleman-Wunsch) 정렬 (즉, 전체적 정렬)인 프로그램 "align"에 의해 결정된다. 프로그램은 폴리펩티드뿐만 아니라 뉴클레오티드 서열의 정렬을 위해 사용된다. 디폴트 스코어링 매트릭스 BLOSUM50은 폴리펩티드 정렬을 위해 사용되고, 디폴트 동일성 매트릭스는 뉴클레오티드 정렬을 위해 사용되고, 갭의 제1 잔기의 페널티는 폴리펩티드의 경우 -12이고, 뉴클레오티드의 경우에는 -16이다. 갭의 추가의 잔기에 대한 페널티는 폴리펩티드의 경우 -2이고, 뉴클레오티드의 경우에는 -4이다.
- [0067] "Align"은 FASTA 패키지 버전 v20u6의 일부이다 (문헌 [W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, 및 W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98] 참조). FASTA 단백질 정렬은 갭 크기에 대한 제한을 두지 않는 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘을 이용한다 (문헌 ["Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197] 참조).
- [0068] 본원에 사용된 용어 "이펙터 세포"는 면역 반응의 인식 및 활성화 단계와 대조적으로, 면역 반응의 이펙터 단계에 관여하는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구 (예컨대, B 세포 및 T 세포 (세포용해 T 세포 (CTL) 포함)), 킬러 세포, 자연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예를 들어 호중구, 과립구, 비만 세포 및 호염기구를 포함한다. 일부 이펙터 세포는 Fc 수용체 (FcR) 또는 보체 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포, 예컨대



예를 들어 자연 킬러 세포는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포 및 쿠퍼(Kupffer) 세포는 표적 세포의 특이적 사멸 및 면역계의 다른 성분에 대한 항원의 제시, 또는 항원을 제시하는 세포에 대한 결합에 관여한다. 일부 실시양태에서, ADCC는 표적 세포 상에서 활성화된 C3 단편의 침착을 유발하는 항체 유도 고전적 보체 활성화에 의해 추가로 증진될 수 있다. C3 절단 생성물은 골수 세포 상에서 발현된 보체 수용체 (CR), 예컨대 CR3에 대한 리간드이다. 이펙터 세포 상의 CR에 의한 보체 단편의 인식은 증진된 Fc 수용체-매개 ADCC를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 유도 고전적 보체 활성화는 표적 세포 상으로 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 직접적인 보체-의존성 세포 세포독성 (CDC)을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원, 표적 입자 또는 표적 세포를 포식할 수 있다. 이펙터 세포 상의 특정한 FcR 또는 보체 수용체의 발현은 시토카인과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, Fc $\gamma$ RI의 발현은 인터페론  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 및/또는 G-CSF에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 증진된 발현은 표적에 대한 Fc $\gamma$ RI-보유 세포의 세포독성 활성을 증가시킨다. 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 서열을 포식하거나 용해시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 유도 고전적 보체 활성화는 표적 세포 상으로 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 식세포작용을 이펙터 세포에 의해 직접적으로 촉진하거나 또는 항체 매개 식세포작용을 증진시킴으로써 간접적으로 촉진할 수 있다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 벡터에 라이게이션된 핵산 절편의 전사를 유도할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 의도된다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이는 원형 이중 가닥 DNA 루프의 형태이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 이때 핵산 절편은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단하게 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 교환가능하게 사용될 수 있으며, 이는 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터의 형태이기 때문이다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예컨대, 복제 결핍 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하도록 의도된다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단하게 "숙주 세포")는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 상기 용어는 특정한 대상 세포뿐만 아니라 그 세포의 자손도 지칭하도록 의도되는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로는 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어 트랜스펙토마(transfectoma), 예컨대 CHO 세포, HEK-293 세포, PER.C6, NS0 세포, 및 림프구 세포, 및 원핵세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 및 다른 진핵세포 숙주, 예컨대 식물 세포 및 진균을 포함한다.

[0071] 본원에 사용된 용어 "트랜스펙토마"는 Ab 또는 표적 항원을 발현하는 재조합 진행 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포, PER.C6, NS0 세포, HEK-293 세포, 식물 세포, 또는 진균, 예를 들어 효모 세포를 포함한다.

[0072] 용어 "제제"는 세포, 세포 막, 비리온 또는 다른 구조물과 연관된 항원 (예를 들어, 세포의 표면 상에서 발현된 항원)과 상호작용할 때 올리고머를 형성하는 능력이 증가되며, 이에 의해 증가된 C1q 결합, 보체 활성화, CDC, ADCC, ADCP, 다른 Fc-매개 이펙터 기능, 내재화, 하향조절, 아포토시스, 항체-약물-접합체 (ADC) 흡수, 결합력 또는 그의 임의의 조합을 가능하게 하는 항체 변이체 및 상이한 항체 변이체의 혼합물을 의미한다. 예시적인 검정은 실시예에서, 예를 들어 C1q-결합력 (실시예 4), CDC (실시예 5, 6 및 10, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 및 35); ADCC (실시예 12), 생체내 효능 (실시예 20, 21), 혈장 클리어런스를 (실시예 37), FcRn 결합 (실시예 34), 및 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화 (실시예 36)에 대해 제시된다. "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", 및 "혼합-돌연변이체"로서 본원에서 언급되는 본원의 측면에 따른 변이체는 그의 예시적인 제조법 및 사용 방법과 함께 하기에 추가로 상세히 기재되어 있다.

[0073] 본원에 사용된 용어 "친화도"는 단일 부위에서 하나의 분자, 예를 들어 항체의 또 다른 분자, 예를 들어 표적 또는 항원에 대한 결합, 예컨대 항체의 개별 항원 결합 부위의 항원에 대한 1가 결합의 강도이다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "결합력"은 2개의 구조물 사이, 예컨대 표적과 동시에 상호작용하는 항체의 다중 항원 결합 부위 사이, 또는 예를 들어 항체 및 C1q 사이에서의 다중 결합 부위의 조합된 강도를 지칭한다. 하나 초과 결합 상호작용이 존재할 경우, 2개의 구조는 모든 결합 부위가 해리될 때에만 해리될 것이고, 따라서 해리율은

개별 결합 부위에서보다 더 느릴 것이고, 따라서 개별 결합 부위의 결합 강도 (친화도)와 비교하여 보다 더 큰 효과적인 총 결합 강도 (결합력)를 제공할 것이다.

- [0075] 본원에 사용된 용어 "올리고머"는 적어도 원칙적으로 비제한된 개수의 단량체로 이루어지는 중합체와 비교하여 하나를 초과하지만 제한된 개수의 단량체 단위로 이루어지는 분자 (예를 들어, 항체)를 의미한다. 예시적인 올리고머는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 및 육량체이다. 그리스어 접두어가 종종 올리고머 내의 단량체 단위의 수를 지정하기 위해 사용되며, 예를 들어 사량체는 4개 단위로 이루어지고, 육량체는 6개의 단위로 이루어진다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "올리고머화"는 단량체를 한정된 정도의 중합으로 전환하는 과정을 지칭하도록 의도된다. 본원에서, Fc-도메인의 올리고머화는 바람직하게는 세포 표면 (이로 제한되지 않음)에서의 Fc-도메인 함유 폴리펩티드, 예컨대 항체에 의한 표적 결합 이후에 발생하는 것으로 관찰된다. 항체의 올리고머화는 예를 들어 세포 표면 C1q-결합 검정 (실시에 4 및 9에 기재된 바와 같음), C1q 효능 검정 (실시에 5에 기재된 바와 같음) 및 보체 의존성 세포독성 (실시에 6, 10 및 19에 기재됨)을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "C1q 결합"은 그의 항원에 결합된 항체에 대한 C1q의 결합의 문맥에서 C1q의 결합을 지칭하도록 의도된다. 그의 항원에 결합된 항체는 본원에 기재된 바와 같은 문맥에서 생체내 및 시험관내 둘 다에서 발생하는 것으로 이해되어야 한다. C1q 결합은 예를 들어 인공 표면 (예를 들어, 실시에 3에 기재된 바와 같은 ELISA용 플레이트의 플라스틱) 상에 고정된 항체를 사용하여 또는 세포 또는 비리온 표면 상의 소정의 항원에 결합된 항체를 사용하여 (실시에 4 및 9에 기재된 바와 같이) 평가될 수 있다. 항체 올리고머에 대한 C1q의 결합은 본원에서 높은 결합력의 결합을 발생시키는 다가 상호작용으로 이해되어야 한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "보체 활성화"는 그의 항원에 결합된 항체에 대한 보체 성분 C1q의 결합에 의해 촉발되는 고전적 보체 경로의 활성화를 의미한다. C1q는 보체 성분 C3을 C3b 및 C3a로 절단하는 C3 컨버타제로 불리는 효소의 활성 형성으로 종결되는 일련의 절단 반응을 수반하는 고전적 보체 캐스케이드의 초기 사건의 제1 단백질이다. C3b는 막 상의 C5에 공유 결합하여 C5b를 형성하고, 이것은 다시 말단 보체 성분 C5b, C6, C7, C8 및 C9가 막 공격 복합체 (MAC)로 회합되는 보체 활성화의 후기 사건을 촉발한다. 보체 캐스케이드는 또한 보체-의존성 세포독성 (CDC)으로도 알려진 세포 용해를 발생시키는 세공을 생성시킨다. 보체 활성화는 C1q 효능 (실시에 5에 기재된 바와 같음), CDC 동역학 (실시에 28, 29, 및 30에 기재된 바와 같음), CDC 검정 (실시에 6, 10, 19, 25, 27, 33, 및 35에 기재된 바와 같음) 또는 문헌 [Beurskens et al. April 1, 2012 vol. 188 no. 7 3532-3541]에 기재된 C3b 및 C4b의 세포 침착 방법에 의해 평가할 수 있다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "보체-의존성 세포독성" ("CDC")은 MAC 어셈블리에 의해 생성되는 막 내의 세공의 결과로서 세포 또는 비리온 상의 그의 표적에 결합된 항체의 용해를 발생시키는 항체-매개 보체 활성화의 과정을 지칭하도록 의도된다. CDC는 실시에 6, 10, 19, 25, 27, 33, 및 35에 기재된 바와 같은 시험관내 검정, 예컨대 정상 인간 혈청이 보체 공급원으로 사용되는 CDC 검정, 또는 실시에 5에 기재된 바와 같은 C1q 효능 검정 (여기서, 정상 인간 혈청은 C1q에서 제한됨)에 의해 평가될 수 있다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "항체-의존성 세포-매개 세포독성" ("ADCC")은 결합된 항체의 불변 영역을 인식하는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온의 사멸 메카니즘을 지칭하도록 의도된다. ADCC는 예를 들어 실시에 12에 기재된 ADCC 검정과 같은 방법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0081] 본원에 사용된 용어 "항체-의존성 세포 식세포작용" ("ADCP")은 식세포에 의한 내재화에 의한 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온의 제거 메카니즘을 지칭하도록 의도된다. 내재화된 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온은 파고솜(phagosome)으로 불리는 소포 내에 함유되고, 이어서 하나 이상의 리소솜과 융합되어 파고리소솜(phagolysosome)을 형성한다. ADCP는 이펙터 세포로서 대식세포를 사용하는 시험관내 세포독성 검정 및 문헌 [van Bij et al. in Journal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685]에 기재된 바와 같은 비디오 현미경을 사용하여, 또는 예를 들어, 에스. 아우레우스(S. aureus) 식세포작용에 대해 실시에 14에 기재된 바와 같이 PMN에 의해 평가될 수 있다.
- [0082] 본원에 사용된 용어 "보체-의존성 세포 세포독성" ("CDCC")은 항체-매개 보체 활성화의 결과로서 표적 세포 또는 비리온에 공유 결합된 보체 3 (C3) 절단 생성물을 인식하는 보체 수용체를 발현하는 세포에 의한 표적 세포 또는 비리온의 사멸 메카니즘을 지칭하도록 의도된다. CDCC는 ADCC에 대해 기재된 바와 유사한 방식으로 평가될 수 있다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "혈장 반감기"는 혈액 혈장 중의 폴리펩티드의 농도를 제거 동안 (분포 단계 후에) 그의 초

기 농도의 1/2로 감소시키는데 소요되는 시간을 나타낸다. 항체의 경우에 분포 단계는 전형적으로 1-3일일 것이며, 이 단계 동안 혈장 및 조직 사이의 재분포로 인해 혈액 혈장 농도의 약 50% 감소가 존재한다. 혈장 반감기는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다.

- [0084] 본원에 사용된 용어 "혈장 클리어런스율"은 살아있는 유기체에 투여시에 혈액으로부터 폴리펩티드가 제거되는 비율의 정량적 측정치이다. 혈장 클리어런스율은 용량/AUC (mL/일/kg)로 계산될 수 있으며, 여기서 AUC 값 (곡선하 면적)은 실시예 37에 따른 농도-시간 곡선으로부터 결정된다.
- [0085] 본원에 사용된 용어 "하향조정"은 예를 들어 수용체에 대한 항체의 결합에 의해, 세포 표면 상의 분자, 예컨대 항체 또는 수용체의 개수를 감소시키는 과정을 지칭하도록 의도된다.
- [0086] 본원에 사용된 용어 "내재화"는 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드가 예를 들어 세포내이입을 통해 세포-표면으로부터 및/또는 주위 매질로부터 표적-발현 세포 내로 내재화되는 임의의 메카니즘을 지칭하도록 의도된다. 항체의 내재화는 내재화된 항체의 양을 측정하는 직접 검정 (예컨대, 예를 들어 실시예 26에 기재된 리소솜 공동국재화 검정)을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "항체-약물 접합체"는 적어도 하나의 유형의 악성 세포에 대한 특이성을 갖는 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드, 약물, 및 약물을 예를 들어 항체에 커플링하는 링커를 지칭한다. 링커는 악성 세포의 존재 하에 절단가능하거나 비-절단가능하고; 여기서 항체-약물 접합체는 악성 세포를 사멸시킨다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 "항체-약물 접합체 흡수"는 항체-약물 접합체가 세포 상의 표적에 결합한 후, 세포막에 의해 흡수/포식되어 세포 내로 유입되는 과정을 지칭한다. 항체-약물 접합체 흡수는 WO 2011/157741에 기재된 바와 같이 "시험관내 사멸 검정에서 항-TF ADC에 의한 항체-매개 내재화 및 세포 사멸"로서 평가될 수 있다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "아포토시스"는 세포에서 발생할 수 있는 프로그램화된 세포 사멸 (PCD)의 과정을 지칭한다. 생화학적 사건은 특징적인 세포 변화 (형태) 및 사멸을 유도한다. 이들 변화는 기포 형성, 세포 수축, 핵 단편화, 염색질 응축, 및 염색체 DNA 단편화를 포함한다. 특정 수용체에 대한 항체의 결합은 아포토시스를 유도할 수 있다.
- [0090] Fc-수용체 결합은 실시예 12에 기재된 바와 같이 간접적으로 측정할 수 있다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "FcRn"은 Fc 수용체인 신생아 Fc 수용체를 지칭하도록 의도된다. 이것은 모체의 유액으로부터 설치류 신생아의 장의 상피를 가로질러 신생아의 혈류로 IgG를 수송할 수 있는 특유한 수용체로서 설치류에서 처음 발견되었다. 추가의 연구는 인간에서 유사한 수용체를 밝혀내었다. 그러나, 인간의 태반에서, 이것은 모체 IgG의 성장하는 태아로의 수송을 용이하게 하는 것을 돕는 것으로 밝혀졌고, 또한 IgG 턴오버의 모니터링에서 소정의 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. FcRn은 6.0-6.5의 산성 pH에서 IgG에 결합하지만, 중성 또는 보다 높은 pH에서는 그렇지 않다. 따라서, FcRn은 약산성 pH에서 장강 (장의 내부)으로부터의 IgG에 결합할 수 있고, pH가 중성 내지 염기성 (pH 7.0-7.5)인 거저측 측면 (신체 내부의)으로의 효율적인 일방향 수송을 보장한다. 이 수용체는 또한 내피 세포에서 세포내이입의 경로에서의 그의 발생을 통해 IgG의 성체 쉼비지에서 소정의 역할을 수행한다. 산성 엔도솜 내의 FcRn 수용체는 음세포작용을 통해 내재화된 IgG에 결합하여 이를 세포 표면으로 재순환시키고 혈액의 염기성 pH에서 방출시켜, 그의 리소솜 분해를 방지한다. 상기 메카니즘은 다른 이소형과 비교하여 혈액 내의 IgG의 보다 큰 반감기에 대한 설명을 제공할 수 있다. 실시예 13 및 34는 ELISA에서 pH 6.0에서 FcRn에 결합하는 IgG를 보여주는 검정을 기재한다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "단백질 A"는 박테리아 스태필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus)의 세포벽에서 처음 발견된 56 kDa MSCRAMM 표면 단백질을 지칭하도록 의도된다. 이는 spa 유전자에 의해 코딩되고, 그의 조절은 DNA 토폴로지(topology), 세포 오스모농도, 및 Ar1S-Ar1R로 불리는 2-보체 시스템에 의해 제어된다. 이는 이뮤노글로불린에 결합하는 능력 때문에 생화학적 연구에서 유용하게 사용된다. 이는 3중-나선 다발로 폴딩되는 5개의 상동성 Ig-결합 도메인으로 이루어진다. 각각의 도메인은 많은 포유동물 종으로부터의 단백질, 가장 특히 IgG에 결합할 수 있다. 이는 대부분의 이뮤노글로불린의 중쇄 Fc 영역 (FcRn 수용체의 보존된 결합 부위와 중첩됨)에 결합하고, 또한 인간 VH3 패밀리의 Fab 영역과 상호작용한다. 혈청 내에서의 이러한 상호작용을 통해, IgG 분자는 박테리아가 옵소닌화, 보체 활성화 및 식세포작용을 파괴하는 그의 Fab 영역을 통하는 대신에 그의 Fc 영역을 통해 박테리아에 결합한다.
- [0093] 용어 "단백질 G"는 단백질 A와 유사하지만 상이한 특이성을 갖는, 그룹 C 및 G 스트렙토코쿠스 박테리아에서 발견되는 이뮤노글로불린-결합 단백질을 지칭하도록 의도된다. 이것은 Fc 영역에 대한 그의 결합을 통해 항체를

정제하는데 유용한 65-kDa (G148 단백질 G) 및 58 kDa (C40 단백질 G)의 세포 표면 단백질이다.

[0094] 폴리펩티드의 CDC에 영향을 미치는 방법

[0095] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태가 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0096] 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하는, 상기 모 폴리펩티드의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0097] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체일 수 있다.

[0098] 본 발명의 방법 또는 용도에 따라 모 폴리펩티드에 돌연변이를 도입하는 것은 변이체 폴리펩티드 (또한, 본원에서 "변이체"로 지칭될 수도 있음)를 생성시킨다. 따라서, 본 발명의 방법(들)은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 변이체 또는 변이체 폴리펩티드가 수득되도록 수행될 수 있다.

[0099] 본 발명의 방법 또는 용도로부터 수득된 변이체 폴리펩티드는 모 폴리펩티드와 비교하여 증가된 CDC를 갖는다. 전형적으로, 이펙터 기능에 대한 폴리펩티드의 효과는  $EC_{50}$  값에 의해 결정될 수 있고, 이는 최대 용해 값의 1/2를 얻기 위해 필요한 폴리펩티드의 농도이다.

[0100] 최대 용해는 포화량의 폴리펩티드가 사용될 때 얻어지는 용해이고, 여기서 포화는 폴리펩티드에 대한 모든 표적이 폴리펩티드에 의해 결합되는 폴리펩티드의 양을 지칭하도록 의도된다.

[0101] 용어 "CDC의 증가", "CDC의 개선", "이펙터 기능의 증가" 또는 "이펙터 기능의 개선"은 본 발명의 문맥에서 모 폴리펩티드와 비교하여 변이체 폴리펩티드의  $EC_{50}$  값의 감소가 존재함을 지칭한다.  $EC_{50}$  값의 감소는 예를 들어 적어도 또는 약 2배, 예컨대 적어도 또는 약 3배, 또는 적어도 또는 약 5배, 또는 적어도 또는 약 10배일 수 있다. 대안적으로, "CDC의 증가", "CDC의 개선", "이펙터 기능의 증가" 또는 "이펙터 기능의 개선"은, 모 폴리펩티드가 모든 세포의 100% 미만을 용해시키는 조건 하에, 용해되는 세포의 최대량 (세포의 총량이 100%로 설정되는 경우에)이 예를 들어 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%만큼 증가함을 의미한다.

[0102] 변이체는 IgG1-005 또는 IgG1-7D8 중쇄의 가변 도메인을 변이체로 클로닝하고 그의 효능을 예컨대 Daudi (실시예 6) 및 Wien (실시예 10)에 대해 기재된 바와 같은 CDC 검정에서 시험함으로써 증가된 또는 개선된 이펙터 기능에 대해 시험될 수 있다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 Daudi 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에 IgG1-7D8의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 Daudi 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에 IgG1-005의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 Wien133 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에 IgG1-7D8의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 Wien133 세포를 이용하여, 증가는 모든 세포의 10% 내지 100% 범위, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%만큼의 최대 용해의 증가로 규정될 것이다. 또한, CDC 효능의 증가는 연구된 조건 하에 IgG1-005의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (Wien133 세포의 용해가 검출가능한 조건 하에 최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 수 있다.

[0103] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 이러한 특정 위치에서의 돌연변이가 본 발명의 방법 (예를 들어, 실시예 19에 제시됨)에 따라 모 항체에 하나 이상의 돌연변이(들)를 도입시킴으로써 수득되는 변이체 항체의 CDC에 대해 개선된 효과를 나타낸다는 것을 밝혀내었다. 이론에 제한되지 않고, 상기 언급된 위치의 군으로부터의 하나 이상



의 아미노산(들)을 치환시킴으로써 올리고머화가 자극되는 것으로 여겨진다. 항체는 보다 큰 결합력 (실시에 2에 예시됨; IgG-7D8-E345R의 직접 표지는 IgG-7D8-WT와 비교하여 Daudi 세포에 대한 결합을 증가시킴)으로 결합하여, 항체가 보다 긴 시간 동안 세포에 결합하도록 하며, 이에 의해 상이한 이펙터 기능, 예를 들어 증가된 C1q 결합, C1q 효능 CDC, ADCC, 내재화, ADCP, 및/또는 생체내 효능이 가능하게 된다. 이러한 효과는 실시예 4 (세포 상의 C1q 결합), 실시예 5 (CDC 검정에서의 C1q 효능), 실시예 6, 7, 27, 28, 29, 및 35 (CDC 검정), 실시예 12 (ADCC), 실시예 26 (내재화), 실시예 21 및 22 (생체내 효능), 혈장 클리어런스율 (실시예 37), FcRn 결합 (실시예 34), 및 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화 (실시예 36)에 의해 예시되었다.

- [0104] 따라서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, 예컨대 E430G, E430S, E430F, 또는 E430T, E345X, 예컨대 E345K, E345Q, E345R, 또는 E345Y, S440Y 및 S440W에 해당하는 것으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 또한 본 발명의 문맥에서 "단일 돌연변이체" 측면 또는 "CDC-증진 돌연변이"로 지칭될 수 있다.
- [0105] 따라서, 한 실시양태에서, CDC를 증가시키는 방법에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0106] 바람직한 실시양태에서, CDC를 증가시키는 방법에서 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0107] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체이다.
- [0108] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, 및 S440W에 해당하는 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 도입하는 것을 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산인 것인, 상기 모 폴리펩티드의 CDC 및 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0109] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0110] 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 E345R, E430T, 및 E430F에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0111] 한 실시양태에서, 항체의 적어도 하나의 다른 이펙터 기능, 예컨대 C1q-결합, 보체 활성화, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), Fc-감마 수용체-결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, 보체-의존성 세포 세포독성 (CDC), 보체-증진 세포독성, 항체에 의해 매개되는 옵소닌화 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 항체 매개 식세포작용 (ADCP), 내재화, 아포토시스, 및/또는 옵소닌화 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 예컨대 ADCC가 또한 증가된다.
- [0112] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체이다.
- [0113] 한 실시양태에서, 모 항체의 CDC는 모 항체가 항원-발현 세포, 세포 막, 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합될 때 증가한다.
- [0114] 한 실시양태에서, 모 항체는 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적 항체이다.
- [0115] 추가 측면에서, 본 발명은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 제1 및/또는 제2 CH2-CH3 영역에 도입하는 것을 포함하며,
- [0116] 여기서 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고; 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이한 것인, 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체 (여기서, 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합함)인 모 항체의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0117] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G,

E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된다.

- [0118] 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0119] 한 실시양태에서, 방법은 이중특이적 항체의 제1 또는 제2 폴리펩티드 중 오직 하나에만 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다.
- [0120] 한 실시양태에서, 방법은 이중특이적 항체의 제1 및 제2 폴리펩티드 둘 다에 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다.
- [0121] 바람직한 실시양태에서, 제1 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에 있고 (예컨대, K409R); 제2 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에 있다 (예컨대, F405L).
- [0122] 본 발명자들은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 또는 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하면 모 항체의 이펙터 기능이 감소한다는 것을 밝혀내었다 (실시에 5, 6 및 10).
- [0123] 실시예 6에 제시된 바와 같이, "단일-돌연변이체"로서 위치 K439E 또는 S440K의 아미노산 치환은 본 발명의 방법에 따른 제1 돌연변이 중 어느 하나와 비교하여 CDC를 감소시켰다.
- [0124] 이펙터 기능을 감소시키는 상기 방법에 의해 얻은 변이체 항체는 모 항체와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 전형적으로, 이펙터 기능에 대한 항체의 효과는  $EC_{50}$  값에 의해 측정될 수 있으며, 이는 최대 용해 값의 1/2를 얻기 위해 필요한 항체의 농도이다.
- [0125] 최대 용해는 포화량의 항체가 사용될 때 얻어지는 용해이고, 여기서 포화는 항체에 대한 모든 항원이 항체에 의해 결합되는 항체의 양을 지칭하도록 의도된다.
- [0126] 용어 "이펙터 기능의 감소"는 본 발명의 문맥에서 모 항체와 비교하여 변이체 항체의  $EC_{50}$  값의 증가가 존재함을 지칭한다.  $EC_{50}$  값의 증가는 예를 들어 적어도 또는 약 2배, 예컨대 적어도 또는 약 3배, 또는 적어도 또는 약 5배, 또는 적어도 또는 약 10배일 수 있다. 대안적으로, "이펙터 기능의 감소"는, 모 항체가 모든 세포의 100% 미만을 용해시키는 조건 하에, 용해되는 세포의 최대량이 예를 들어 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%만큼 감소함을 의미한다.
- [0127] 변이체는 IgG1-005 또는 IgG1-7D8 중쇄의 가변 도메인을 변이체로 클로닝하고 그의 효능을 예컨대 Daudi 세포 (실시예 6) 및 Wien133 세포 (실시예 10)에 대해 기재된 바와 같은 CDC 검정에서 시험함으로써 감소된 이펙터 기능에 대해 시험될 수 있다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 Daudi 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에 IgG1-7D8의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 Daudi 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에 IgG1-005의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 Wien133 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에 IgG1-7D8의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 Wien133 세포를 이용하여, 감소는 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%의 최대 용해의 감소로 규정될 것이다. 또한, CDC 효능의 감소는 연구된 조건 하에 IgG1-005의  $EC_{50}$ 보다 2배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  (Wien133 세포의 용해가 검출가능한 조건 하에서 최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과만큼 더 낮은  $EC_{50}$  값에 의해 규정될 수 있다.
- [0128] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법 및 본원에 개시된 실시양태에 따른 방법에 관한 것이며, 이러한 방법은 S440Y 및 S440W 이외의 하나 이상의 위치에서의 돌연변이를 도입하는 것, 및
- [0129] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이 (단, S440에

서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님),

- [0130] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447 및 448에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K/R/H 및 448E/D, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K 및 448E, 또는,
- [0131] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447, 448 및 449에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E, 448K/R/H 및 449P, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447E, 448K 및 449P
- [0132] 를 추가로 도입하는 것을 포함한다.
- [0133] 추가의 돌연변이가 상기 단계 (ii) 또는 (iii)에 기재된 바와 같이 도입되는 실시양태와 관련하여, 보통의 상황에서 위치 K447에서의 리신이 세포에서 항체 생산 동안 제거된다는 것에 주목해야 한다. 이는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기 (예컨대, 448 또는 448/449)를 첨가하여 위치 K447을 보호함으로써 방지할 수 있다. 이는 또한 WO 2013/004841 (젠맵 A/S)에 기재되어 있다.
- [0134] 한 실시양태에서, 방법은 S440Y 및 S440W 이외의 하나 이상의 위치에서의 돌연변이를 도입하는 것, 및 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및/또는 S440에 해당하는 아미노산 잔기 각각에서의 돌연변이를 추가로 도입하는 것을 포함하며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0135] 바람직한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/R이다.
- [0136] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체이다.
- [0137] 한 실시양태에서, 모 항체는 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 본원에 기재된 실시양태 중 어느 하나일 수 있다.
- [0138] 표 1에 열거된 임의의 돌연변이가 이중특이적 항체에 도입될 수 있다. 실시예 24는 E345R 돌연변이를 이중특이적 CD20xEGFR 항체에 도입하면 CDC 효능이 증진된다는 것을 보여준다. 실시예 23, 29 및 30은 또한 본 발명에 따른 돌연변이를 포함하는 상이한 이중특이적 항체의 일부를 기재한다.
- [0139] 모 항체에서 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기 둘 다에서의 돌연변이의 도입 (단, S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님)은 또한 본원에서 "이중 돌연변이체" 측면으로 지칭된다. S440Y 및 S440W 돌연변이는 다른 부분에 기재된 바와 같이 모 폴리펩티드로 도입될 때 CDC를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0140] 또한 다른 부분에 기재된 바와 같이, 본 발명의 발명자들은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 또는 S440 중 어느 하나에 해당하는 아미노산 잔기에서의 확인된 돌연변이를 도입하는 것이 이펙터 기능을 감소시킨다는 것을 밝혀내었다 (실시예 5, 6, 10). 그러나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기 둘 다에서의 억제 돌연변이가 도입될 때, 이펙터 기능의 감소가 회복되고, 이에 의해 이펙터 기능은 K439 및 S440 돌연변이에서의 돌연변이가 없는 모 항체의 이펙터 기능과 유사하게 된다. 그러나, 임의의 이론에 제한되지 않고, K439 및 S440 돌연변이의 존재는 이펙터 기능의 유도를, K439 및 S440 돌연변이를 둘 다 포함하는 항체만으로 이루어진 올리고머 복합체로 제한하는 것으로 여겨진다. 따라서, K439 및 S440 돌연변이가 치료 항체에 포함되면, 임의의 이론에 제한되지 않고, 이러한 치료 항체가 환자에게 투여될 때, 이펙터 기능의 유도는 K439/S440 돌연변이를 포함하는 치료 항체를 함유하지만 K439 및 S440 돌연변이를 포함하지 않는 환자 자신의 항체는 함유하지 않는 올리고머 항체 복합체로 제한하고, 이에 의해 치료 항체와 환자 자신의 항체의 상호작용에 의해 유발되는 임의의 잠재적 부작용이 제한되는 것으로 여겨진다.
- [0141] 위치 K439 및/또는 S440의 돌연변이를 제1 돌연변이와 조합할 때, CDC의 증진이 얻어지고, CDC의 특이성이 증가된다. 유사한 방식으로, CDC의 증진 및 그의 증가된 특이성은 상기 실시양태 (ii) 및 (iii)에 개시된 돌연변이를 도입함으로써 얻을 수 있다.
- [0142] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 적어도 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함하며, 여기서 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 것인, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 증가시키는

방법에 관한 것이다.

- [0143] 한 실시양태에서, 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 적어도 제 1 및/또는 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함한다.
- [0144] 바람직한 실시양태에서, 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 적어도 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함한다.
- [0145] 한 실시양태에서, 방법은 동일하거나 또는 상이할 수 있는 돌연변이를 제1 및 제2 모 폴리펩티드 둘 다에 도입하는 것을 포함한다.
- [0146] 추가 실시양태에서, 방법은
- [0147] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하는 것,
- [0148] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 돌연변이 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 제 2 모 폴리펩티드를 제공하는 것을 포함한다.
- [0149] 한 실시양태에서, 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 또는 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함한다.
- [0150] 추가 실시양태에서, 하나 이상의 위치에서의 돌연변이는 S440Y 및 S440W 이외의 것이며, 여기서 방법은
- [0151] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하는 단계; 및
- [0152] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아닌 것인 단계를 추가로 포함하고, 단계 (i) 및 (ii)는 대안적으로
- [0153] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아닌 것인 단계;
- [0154] (iv) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 단계일 수 있다.
- [0155] 제2 모 폴리펩티드는 그 자체로서 표적 세포에 결합시에 충분한 CDC 반응을 제공하지 않는 임의의 모 폴리펩티드일 수 있다.
- [0156] 따라서, 이론에 제한되지 않고, 상기 목록에 따른 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 포함하는 제1 변이체 폴리펩티드를 제공 (이에 따라 변이체 폴리펩티드는 증가된 CDC 반응을 가짐)하고, 이러한 돌연변이(들)를 포함하지 않는 제2 변이체 폴리펩티드를 제공 (이에 따라 제2 모 폴리펩티드의 CDC 반응이 얻어짐)하는 방법이 고려된다.
- [0157] 실시예 31에 제시된 바와 같이 CDC를 증가시킬 수 있는 상기 돌연변이 중 하나를 포함하는 제1 항체를 본 발명에 따라 변형되지 않은 제2 항체와 조합하는 방법은 조합물의 CDC를 증가시킨다. 따라서, 이러한 방법은 한 실시양태에서, 안전한 것으로 증명되었지만 충분히 효율적이지 않은 (또는 증가된 효율이 바람직한) 제2 항체로서의 치료 항체를 돌연변이를 포함하는 제1 항체와 조합하여 효능있는 조합물을 생성하기 위해 이용될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0158] 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 것으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 적합한 제2 항체의 예는 하기 중 임의의 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다; (90Y) 클리마투주맙 테트라세탄; (90Y) 타카투주맙 테트라세탄; (99mTc) 파놀레소맙; (99mTc) 노페투모맙 메르펜탄; (99mTc) 핀투모맙; 3F8; 8H9; 아바고보맙; 아바타셉트; 압식시맙; 악톡수맙; 아달리무맙; 아데카투무맙; 아펠리모맙; 아플리베르셉트; 아푸투주맙; 알라치주맙 페골; 알



비글루티드; ALD518; 알레파셉트; 알렘투주맙; 알리로쿠맙; 알투모맙; 알투모맙 펜테테이트; 알비르셉트 수도톡스; 아마톡시맙; AMG714/HuMax-IL15; 아나투모맙 메페나톡스; 안루킨주맙 (= IMA-638); 아폴리주맙; 아크시투모맙; 아셀리주맙; 아탈시셉트; 아티누맙; 아틀리주맙 (= 토실리주맙); 아도폴리무맙; 바미네르셉트; 바피뉴주맙; 바실릭시맙; 바비톡시맙; 벡투모맙; 벨라타셉트; 벨리무맙; 벤탈리주맙; 베르틸리무맙; 베실레소맙; 베바시주맙; 베즐로톡수맙; 비치로맙; 비파르셉트; 비바투주맙; 비바투주맙 메르탄신; 블리나투모맙; 블로소주맙; 브렌톡시맙 베도틴; 브리아키누맙; 브리오바셉트; 브로달루맙; 카나키누맙; 칸투주맙 메르탄신; 칸투주맙 라브탄신; 카플라치주맙; 카프로맙; 카프로맙 펜테티드; 카를루맙; 카투막소맙; CC49; 세텔리주맙; 세르톨리주맙 페골; 세톡시맙; Ch.14.18; 시타투주맙 보가톡스; 식수투무맙; 클라자키주맙; 클레놀릭시맙; 클리바투주맙 테트라세탄; 코나투무맙; 콘베르셉트; CR6261; 크레네주맙; 다세투주맙; 다클리주맙; 달란테르셉트; 달로투주맙; 다라투무맙; 템시주맙; 데노수맙; 데투모맙; 도롤리모맙 아리톡스; 드로지투맙; 둘라글루티드; 에크로백시맙; 에쿨리주맙; 에도바코맙; 에드레콜로맙; 에팔리주맙; 에편구맙; 엘로투주맙; 엘실리모맙; 에나바투주맙; 엔리모맙; 엔리모맙 페골; 에노키주맙; 엔시톡시맙; 에피투모맙; 에피투모맙 시톡세탄; 에프라투주맙; 에를리주맙; 에르투막소맙; 에타네르셉트; 에타라시주맙; 에트클리주맙; 엑스비비루맙; 파놀레소맙; 파칼리모맙; 파클레투주맙; 파시누맙; FBTA05; 펠비주맙; 페자키누맙; 피클라투주맙; 피기투무맙; 플란볼루맙; 폰톨리주맙; 포탈루맙; 포라비루맙; 프레슬리무맙; 폴라누맙; 갈릭시맙; 가니투맙; 간테네루맙; 가빌리모맙; 겐투주맙; 겐투주맙 오조가미신; 게보키주맙; 기렌톡시맙; 글렘바투무맙; 글렘바투무맙 베도틴; 골리무맙; 고밀릭시맙; GS6624; 항-CD74 항체; WO 2011/110642에 개시된 바와 같은 항-cMet 항체; WO 2011/147986 또는 WO 2011/147982에 개시된 바와 같은 항-Her2 항체; WO 2004/058797에 개시된 바와 같은 항-IL8 항체; WO 2004/045512에 개시된 바와 같은 항-TAC 항체; WO 2010/066803 또는 WO 2011/157741에 개시된 바와 같은 항-조직 인자 (TF) 항체; 이발리주맙; 이브리투모맙 티옥세탄; 이크루쿠맙; 이고보맙; 임시로맙; 인클라쿠맙; 인다톡시맙 라브탄신; 인플릭시맙; 이놀리모맙; 이노투주맙 오조가미신; 인테투무맙; 아이오딘 (124I) 기렌톡시맙; 이필리무맙; 이라투무맙; 이톨리주맙; 익세키주맙; 켈릭시맙; 라베투주맙; 레브리키주맙; 레말레소맙; 레네르셉트; 레르텔리무맙; 렉사투무맙; 리비비루맙; 린투주맙; 로르보투주맙 메르탄신; 루카투무맙; 루밀릭시맙; 마파투무맙; 마슬리모맙; 마투주맙; 마브릴리무맙; 메폴리주맙; 메텔리무맙; 밀라투주맙; 민레투모맙; 미로코셉트; 미투모맙; 모가물리주맙; 모롤리무맙; 모타비주맙; 목세투모맙; 파수도톡스; 무로노맙-CD3; 나콜로맙 타페나톡스; 나밀루맙; 나프투모맙 에스타페나톡스; 나르나투맙; 나탈리주맙; 네바쿠맙; 네시투무맙; 네텔리모맙; 니모투주맙; 니볼루맙; 노페투모맙; 메르펜탄; 오비누투주맙; 오카라투주맙; 오크렐리주맙; 오둘리모맙; 오파투무맙; 올라라투맙; 올로키주맙; 오말리주맙; 오나르투주맙; 오네르셉트; 오포르투주맙 모나톡스; 오레고보맙; 오텔릭시주맙; 옥셀루맙; 오조랄리주맙; 파기박시맙; 팔리비주맙; 파니투무맙; 파노바쿠맙; 파스폴리주맙; 파테클리주맙; 파트리투맙; 페그수네르셉트; 펌투모맙; 페르투주맙; 펙셀리주맙; 핀투모맙; 파클라쿨루맙; 포네주맙; 프틸릭시맙; 프리투무맙; PRO 140; 켈리주맙; 라코투모맙; 라드레투맙; 라피비루맙; 라무치루맙; 라니비주맙; 락시바쿠맙; 레가비루맙; 레슬리주맙; RG1507/HuMax-IGF1R; RG1512/HuMax-p 셀렉틴; 릴로나셉트; 릴로투무맙; 리톡시맙; 로바투무맙; 룰레두맙; 로모소주맙; 론탈리주맙; 로벨리주맙; 루폴리주맙; 사말리주맙; 사틸루맙; 사투모맙; 사투모맙 펜테티드; 세쿠키누맙; 세비루맙; 시브로투주맙; 시팔리무맙; 실톡시맙; 시폴리주맙; 시루쿠맙; 솔라네주맙; 솔리토맙; 소넵치주맙; 손투주맙; 소타테르셉트; 스타물루맙; 술레소맙; 수비주맙; 타발루맙; 타카투주맙 테트라세탄; 타도치주맙; 탈리주맙; 타네주맙; 타폴리투모맙 팜톡스; 테피바주맙; 텔리모맙 아리톡스; 테나투모맙; 테넬릭시맙; 테폴리주맙; 테프로투무맙; TGN1412; 티실리무맙 (= 트레텔리무맙); 티가투주맙; TNX-650; 토실리주맙 (= 아틀리주맙); 토랄리주맙; 토랍셀; 토시투모맙; 트랄로키누맙; 트라스투주맙; 트라스투주맙 엠탄신; TRBS07; 트레마나닙; 트레갈리주맙; 트레멜리무맙; 투코투주맙 셀모류킨; 투비루맙; 우블리톡시맙; 우렐루맙; 우르톡사주맙; 우스테키누맙; 바팔릭시맙; 바텔리주맙; 베돌리주맙; 벨투주맙; 베팔리모맙; 베센쿠맙; 비실리주맙; 볼로식시맙; 보르세투주맙 마포도틴; 보투무맙; 잘루투무맙; 자놀리무맙; 지랄리무맙; 및 줄리모맙 아리톡스.

- [0159] 제1 및 제2 변이체 항체는 실시예 10에 제시된 바와 같이 임의의 야생형 또는 자연 발생 항체와 비교하여 서로와의 올리고머화를 선호할 것이다.
- [0160] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 상응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 상응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/R이다.
- [0161] 이와 같이, 특이성의 증가는 "CDC의 유도"와 관련된다. 따라서, 상기 방법은 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합에 의해 이펙터 기능의 유도의 특이성을 증가시키는 방법이다.
- [0162] 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합에 의한 이펙터 기능의 특이성 또는 유도의 특이성을 증가시키는 방법

을 수행함으로써, 제1 변이체 및 제2 변이체 폴리펩티드의 조합물이 수득된다.

- [0163] 모 폴리펩티드의 K439 또는 S440에 돌연변이를 도입함으로써, 이와 같이 수득된 변이체 폴리펩티드는 모 폴리펩티드와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 그러나, 본원의 다른 부분에서도 기재된 바와 같이, K439 및 S440에서의 돌연변이는 서로 보완하거나 또는 돌연변이를 둘 다 포함하는 폴리펩티드의 이펙터 기능을 회복시킬 수 있다. 서로 보완하는 K439 및 S440에서의 돌연변이의 이러한 능력은 2개의 폴리펩티드에서 유사하게 이용될 수 있다. 따라서, K439에서의 돌연변이가 제1 모 폴리펩티드로 도입되고 S440에서의 돌연변이가 제2 모 폴리펩티드로 도입되거나, 또는 그 반대의 경우, 이펙터 기능의 감소는 제1 및 제2 변이체 폴리펩티드가 조합되어 사용되는 경우처럼 더 이상 관찰되지 않는다. 용어 "특이성 증가" 또는 "특이성 개선"은 이러한 문맥에서 K439에서의 돌연변이를 포함하는 제1 변이체 폴리펩티드 및 S440에서의 돌연변이를 포함하는 제2 변이체 폴리펩티드의 조합에 의해 유도되는 이펙터 반응이 K439에서의 돌연변이를 포함하는 제1 변이체 폴리펩티드 또는 S440에서의 돌연변이를 포함하는 제2 변이체 폴리펩티드에 의해 유도된 이펙터 반응보다 더 높다는 사실을 나타낸다.
- [0164] K439 및 S440에서의 아미노산 치환 둘 다의 도입에 의해 올리고머화의 특이성이 증가된다.
- [0165] 위치 K439 및/또는 S440에서의 돌연변이를 제1 돌연변이와 조합할 때, CDC가 증진되고, CDC의 특이성이 증가된다.
- [0166] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 동일한 결합 부위, 또는 항체와 관련하여, 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0167] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 동일한 표적 상의 상이한 결합 부위에 결합하거나, 또는 항체와 관련하여, 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0168] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0169] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 동일한 또는 상이한 VL 및 VH 서열을 갖는 제1 및 제2 모 항체이다.
- [0170] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물은 하나의 제1 모 폴리펩티드 및 하나의 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0171] 한 실시양태에서, 특이성은 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물이 항원-발현 세포, 세포 막, 또는 비리온 상의 그의 결합 부위 또는 항원에 결합될 때 증가한다.
- [0172] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 항원-발현 세포, 세포 막, 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합될 때 폴리펩티드의 (예를 들어, 그에 의해 유도된 CDC의) 특이성을 증가시키기 위해 폴리펩티드의 2개 이상의 아미노산 잔기에 돌연변이를 사용하는 것에 관한 것이며, 여기서
- [0173] 제1 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 아미노산 잔기에 있고;
- [0174] 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 아미노산 잔기에 있다.
- [0175] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 제1 및 제2 모 항체이다.
- [0176] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다.
- [0177] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 항체는 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이며, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고; 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이하다.
- [0178] 바람직한 실시양태에서, 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이 (예컨대, K409R)를 포함하고; 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이 (예컨대, F405L)를 포함한다.

- [0179] 이러한 방법을 수행함으로써 적어도 제1 및 제2 변이체 항체의 조합물이 수득된다. 이 방법에 의해 수득된 적어도 제1 및 제2 변이체 항체는 조합될 때 제1 및 제2 모 항체의 조합과 비교하여 증가된 CDC를 갖는다.
- [0180] 용어 "증가된 CDC"는 본원에 기재된 바와 같이 이해되어야 한다.
- [0181] 제1 및/또는 제2 모 항체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 모 항체일 수 있다.
- [0182] 제1 및 제2 항체의 조합물의 CDC를 증가시키는 방법은 특히 본원에 기재된 바와 같은 변이체 항체의 임의의 특성을 갖는 제1 및/또는 제2 변이체 항체가 수득되도록 수행될 수 있다.
- [0183] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0184] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0185] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0186] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일한 또는 상이한 VL 및 VH 서열을 갖는다.
- [0187] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물은 하나의 제1 모 항체 및 하나의 제2 항체를 포함한다.
- [0188] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물은 추가의 모 항체, 예컨대 제3, 제4 또는 제5 모 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 이중특이적 또는 다중특이적 모 항체는 동일한 또는 상이한 항체이다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 이중특이적 또는 다중특이적 모 항체는 동일한 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다.
- [0189] 본 발명의 방법 및/또는 용도의 한 실시양태에서, 모 항체이든 제1 모 항체이든 또는 제2 모 항체이든 상관없이, 모 항체는 이펙터 기능에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 본 발명의 돌연변이가 이외의 다른 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 다른 돌연변이는 이펙터 기능에 영향을 미치는 본 발명의 돌연변이와 동시에 도입될 수 있거나 또는 순차적으로 도입될 수 있으나, 본 발명의 방법 또는 용도가 돌연변이의 동시 또는 순차적 도입으로 제한되지는 않는다. 이중특이적 항체는 임의의 이중특이적 항체일 수 있으나, 본 발명의 방법 및 용도는 상이한 포맷이 이용될 수 있을 것으로 예상되기 때문에 임의의 특정 이중특이적 포맷으로 제한되지는 않는다.
- [0190] 한 실시양태에서, 방법은 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 변경시키지 않는다.
- [0191] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 결합을 변경시키지 않는다.
- [0192] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 OD405 nm에서의 흡광도 변화에 의해 측정시에 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 결합을 30% 초과, 예컨대 20%, 10% 또는 5% 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키지 않는다.
- [0193] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 마우스 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 겔보기 친화도를 배수(factor) 0.5 초과만큼 증가시키지 않거나 또는 마우스 FcRn에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 겔보기 친화도를 배수 2 초과만큼 감소시키지 않는다.
- [0194] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 클리어런스율을 변경시키지 않는다.
- [0195] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 클리어런스율을 배수 3.0 초과, 예컨대 배수 2.5, 배수 2.0, 배수 1.5, 또는 배수 1.2 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키지 않는다.
- [0196] 한 실시양태에서, 방법은 실시예 36에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 표적 비의존성 유체 상보체 활성화를 변경시키지 않는다.
- [0197] 한 실시양태에서, 방법은 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 혈장 반감기를 변경시키지 않는다.
- [0198] 본원에 기재된 임의의 돌연변이가 또는 그의 조합이 본 발명의 방법에 따라 도입될 수 있다.
- [0199] 예시적인 또는 바람직한 아미노산 치환으로부터 선택된 돌연변이는 항원-결합된 항체의 올리고머 형성 및 증진

된 C1q-결합, 보체 활성화, CDC, ADCC 및/또는 내재화의 검출을 허용하는 적절한 검정, 예컨대 실시예에 기재된 검정에서 시험될 수 있다. 예를 들어, C1q-결합력은 항체 변이체에 대한 항원을 발현하는 세포를 사용하여 실시예 4에 기재된 것과 유사한 검정에 따라 결정될 수 있다. 예시적인 CDC 검정이 실시예 5, 6, 10, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 및 35에 제시된다. 예시적인 ADCC 검정이 실시예 12에 제시된다. 예시적인 내재화 검정이 실시예 26에 제시된다. 최종적으로, 올리고머 형성에 영향을 미치는 돌연변이로부터 C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이 사이를 구별하기 위해, 예를 들어 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합을 예를 들어 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교할 수 있고, 혈장 클리어런스를 실시예 37에 기재된 검정, 실시예 34에 따른 FcRn 결합 비교에 따라 비교할 수 있고, 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화를 실시예 36에서의 검정에 따라 평가할 수 있다.

- [0200] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 아미노산 치환, 아미노산 결실 또는 아미노산 삽입일 수 있다.
- [0201] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 아미노산 결실이다.
- [0202] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 아미노산 삽입이다.
- [0203] 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 아미노산 치환이다.
- [0204] 한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 표 1에 열거된 임의의 아미노산 치환, 아미노산 결실로부터 선택될 수 있다.
- [0205] 따라서, 한 실시양태에서, E345X는 E345R, Q, N, K, Y, A, C, D, F, G, H, I, L, M, P, S, T, V, W, 또는 Y; 특히 E345A, D, G, H, K, N, Q, R, S, T, Y 또는 W, 또는 보다 특히 E345D, K, N, Q, R, 또는 W; 또는 보다 더 특히 E345R, Q, N, K, 또는 Y일 수 있다. 추가의 바람직한 실시양태에서, E345X는 E345K 또는 E345Q이다.
- [0206] 또 다른 추가 실시양태에서, E430X는 E430T, S, G, F, H, A, C, D, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, 또는 Y; 특히 E430T, S, G, F, 또는 H일 수 있다. 추가의 바람직한 실시양태에서, E430X는 E430G 또는 E430S이다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 임의적으로 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합을 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교함으로써 결정된 바와 같이 C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에 있지 않다.
- [0207] 한 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이(들)는 하나의 돌연변이이고, 즉 1개 이하의 돌연변이가 모 항체에 도입된다.
- [0208] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 표 1의 아미노산 잔기 중 적어도 2개, 예컨대 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과에 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다.
- [0209] 본원에 기재된 돌연변이의 임의의 조합이 본 발명의 방법에 따라 도입될 수 있다.
- [0210] 한 실시양태에서, 방법은 모 폴리펩티드에 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E345X, E430X, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 1개 초과 돌연변이, 예컨대 2, 3, 4, 또는 5개, 특히 2 또는 3개의 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E345X, E430X, S440Y, 및 S440W에 해당하는 아미노산 잔기 중 적어도 1개 초과가 돌연변이될 수 있다 (예컨대, E345X, E430X, S440Y, 및 S440W 중 2개 또는 모두, 임의적으로 표 1에 열거된 하나 이상의 다른 아미노산에서의 돌연변이와 조합됨). 적어도 2개의 돌연변이는 위치 E430의 임의의 아미노산 잔기 치환 또는 S440Y 또는 S440W와 조합된 위치 E345의 임의의 아미노산 잔기 치환일 수 있거나, 또는 위치 S440Y 또는 S440W의 임의의 아미노산 잔기와 조합된 위치 E430의 임의의 아미노산 치환일 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2 또는 3개의 돌연변이가 모 항체에 도입된다.
- [0211] 아미노산 잔기에서의 2개의 돌연변이의 이러한 조합은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E345X/E430X, E345X/S440Y, E345X/S440W, E430X/S440Y, 및 E430X/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0212] 본 발명에 따른 방법 또는 용도에서, CDC는 항체가 그의 항원에 결합될 때 증가한다.
- [0213] 임의의 이론에 제한되지 않고, CDC는 항체가 그의 항원에 결합될 때 증가하며, 여기서 항원은 항원-발현 세포, 세포 막 또는 비리온 상에 있다. 한 실시양태에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330의 서열을 포함한다.



- [0214] 모 폴리펩티드 또는 모 항체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 모 폴리펩티드 또는 임의의 모 항체일 수 있다. 이러한 문맥에서 모 폴리펩티드 및 모 항체는 또한 제1 모 및 제2 모 폴리펩티드 및 제1 모 및 제2 모 항체인 것으로 의도된다.
- [0215] 한 실시양태에서, 모 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM 또는 IgE 항체이다.
- [0216] 한 실시양태에서, 모 항체는 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0217] 한 실시양태에서, 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 서열 1 또는 5를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1m(za) 또는 IgG1m(f) 동종이형이다.
- [0218] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 2를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG2 항체이다.
- [0219] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 3을 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG3 항체이다.
- [0220] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 4를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG4 항체이다.
- [0221] 한 실시양태에서, 모 항체는 이중특이적 항체이다.
- [0222] 한 실시양태에서, 모 항체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항체, 예를 들어 Fc-영역의 적어도 일부를 포함하는 항체 단편, 1가 항체 (WO2007059782 (젠맵에 기재됨); 오직 2개의 중쇄로 이루어지며, 예를 들어 낙타류에서 자연 발생한 중쇄 항체 (예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446]); 티오Mab (로슈, WO2011069104), 대칭적 및 이중특이적 항체-유사 분자인 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED 또는 시드-바디) (머크, WO2007110205); 트리오맵 (프레제니우스, 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)]); Fc $\Delta$  Adp (레게네론, WO2010151792), 아지메트릭 스캐폴드 (자임위크스/머크, WO2012/058768), mAb-Fv (젠코르, WO2011/028952), 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (애보트, DVD-Ig, 미국 특허 번호 7,612,181); 이중 도메인 이중 헤드 항체 (유니레버; 사노피 아벤티스, WO20100226923), 디-디아바디 (임클론/일라이 릴리), 노브-인투-홀 항체 포맷 (제넨테크, WO9850431); 듀오바디 (젠맵, WO 2011/131746); 정전기적 스티어링 항체 포맷 (암젠, EP1870459 및 WO 2009089004; 추가이, US201000155133; 온코메드, WO2010129304A2); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코포레이션, WO11143545), 크로스Mab (로슈, WO2011117329), LUZ-Y (제넨테크), 바이클로닉 (메루스), 이중 표적화 도메인 항체 (GSK/도만티스), 2개의 표적을 인식하는 투-인-원 항체 (제넨테크, 노브이문), 가교 Mab (카르마노스 캔서 센터), CovX-바디 (CovX/화이자), IgG-유사 이중특이적 (임클론/일라이 릴리, 문헌 [Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74]), 및 DIG-바디 및 PIG-바디 (파르마브신), 및 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART, 마크로제닉스, WO/2008/157379, WO/2010/080538), 자이바디스 (자인게니아), 통상의 경쇄 (크루셀/메루스, US7262028) 또는 통상의 중쇄 ( $\kappa$   $\lambda$  바디스, 노브이문)를 사용하는 접근법 뿐만 아니라 Fc-도메인 유사 scFv-융합체를 함유하는 항체 단편에 융합된 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질 (BsAb와 같음, 지모제네틱스/BMS), 허큘레스 (비오젠 아이텍) (US007951918), 스킵피온스 (이머전트 바이오솔루션즈/트루비온), Ts2Ab (메드이문/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), scFv 융합체 (노파르티스), scFv 융합체 (장저우 아담 비오텍 인크 (CN 102250246), TvAb (로슈) (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb<sup>2</sup> (f-스타) (WO2008/003116), 및 이중 scFv-융합체이다. 또한, 달리 특정되지 않는 한, 용어 항체는 또한 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (예컨대, 인간 모노클로날 항체), 예를 들어 심포젠 및 메루스 (올리고클로닉스)에 의해 이용된 기술에 의해 생성된 항체 혼합물 (재조합 폴리클로날 항체), 및 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생성된 항체는 잠재적으로 임의의 이소형을 가질 수 있다.
- [0223] 또 다른 실시양태에서, 항원은 세포의 표면 상에서 발현된다.
- [0224] 또 다른 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포이다.
- [0225] 추가 실시양태에서, 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFvIII, IGF $\alpha$ , L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0226] 또 다른 실시양태에서, 항원은 세포 막과 회합된다.
- [0227] 또 다른 실시양태에서, 항원은 비리온과 회합되고, 임의적으로 항원은 비리온의 단백질 코트 또는 지질 외피에 포함된다.

- [0228] 또 다른 실시양태에서, 항체는 CD20 및 CD38로부터 선택되는 적어도 하나의 항원에 임의적으로 결합하는 인간 항체이다.
- [0229] 또 다른 실시양태에서, 항체는 7D8 및 005 중 적어도 하나와 동일한 에피토프에 결합하고, 임의적으로 7D8 및 005 중 적어도 하나의 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함한다.
- [0230] 개시된 발명에 따른 임의의 용도에서, 본 발명의 임의의 돌연변이를 갖지 않는 항체는 임의의 모 항체일 수 있다. 따라서, 본원에서 용도는 이러한 모 항체의 임의의 변이체를 제공한다.
- [0231] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 예를 들어 Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합이다.
- [0232] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc-함유 폴리펩티드 내재화이다.
- [0233] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)의 조합이다.
- [0234] 본원에 사용된 용어 "C1q-결합"은 모 항체의 변이체 또는 항체와 관련하여 사용될 때 면역계의 다양한 세포 (예컨대, 이펙터 세포)를 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 변이체 또는 항체의 결합에 의해 매개되는 보체 활성화의 고전적 경로 상의 제1 성분의 임의의 메카니즘을 포함한다. 항체의 C1q-결합이 ELISA (예컨대, 예를 들어 실시예 3 및 4에서 이용된 C1q-결합 ELISA)를 이용하여 평가될 수 있거나, 또는 C1q 효능이 CDC 검정 (예컨대, 예를 들어 실시예 5에서 이용된 CDC 검정)에 의해 평가될 수 있다. 추가 실시양태에서, 항체의 C1q-결합력은 실시예 4에 기재된 검정에 따라 결정된다.
- [0235] 개시된 발명에 따른 모든 방법에서, 본 발명의 임의의 돌연변이를 갖지 않는 항체는 임의의 모 항체일 수 있다. 따라서, 본원의 방법은 이러한 모 항체의 임의의 변이체를 제공한다.
- [0236] 본 발명의 방법 및/또는 용도에 의해 수득되는 모 항체, 제1 모 항체, 제2 모 항체, 또는 그의 변이체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 표적에 결합할 수 있다.
- [0237] 본 발명이 작용할 수 있는 표적 또는 항원의 예는 다음과 같다; 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM17; AFP; AXL; ANGPT2 탄저병 항원; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; 암종 연관 항원 CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; Claudin4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; Cripto; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; 엔도텔린 B 수용체; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP 알파; Fc 감마 RI; FCER2; FGFR3; 피브린 II 베타쇄; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; GD3 강글리오시드; GDF2; GLP1R; 글리피칸-3; GPNMB; HBV (B형 간염 바이러스); HCMV (인간 시토메갈로바이러스); 열 쇼크 단백질 90 상동체 [칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)]; 단순 포진 바이러스 gD 당단백질; HGF; HIV-1; HIV-1 IIIB gp120 V3 루프; HLA-DRB (HLA-DR 베타); 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 이중특이적; IgE Fc; IGF1R; IGHE 연결 영역; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; 인터류킨-2 수용체 베타 서브유닛; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV\_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; 루이스-y; 지질 A, 리포폴리사카라이드 LPS의 도메인; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; NCA-90 과립구 세포 항원; 넥틴 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; 포스포티딜세린; PTK-7; 슈도모나스 아에루기노사 혈청형 IATS O11; RSV (인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; 시가 (Shiga)-유사 독소 II B 서브유닛 [에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; 스탕필로 코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 리포테이코산; T 세포 수용체 알파-베타; TF; TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; 및 비멘틴.
- [0238] 주요 측면에서, 본 발명은
- [0239] (i) 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따라 돌연변이된 모 폴리펩티드 또는 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물을 제공하는 단계; 및
- [0240] (ii) 단계 (i)의 돌연변이된 모 폴리펩티드 또는 단계 (i)의 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 돌연변이된 조합물의 제제를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 항원을 발현하는 세포, 세포 막, 또는 비

리온과 접촉시키는 단계

- [0241] 를 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드가 결합하는 표적을 발현하는 세포, 세포 막, 또는 비리온에 대한 CDC를 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0242] 한 실시양태에서, 임의의 또는 모든 모 폴리펩티드, 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드는 항체일 수 있다.
- [0243] 또 다른 실시양태에서, 방법은 ADCC, Fc-감마 수용체-결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, 보체-의존성 세포 세포독성 (CDCC), 보체-증진된 세포독성, 항체에 의해 매개되는 옵소닌화 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 및 그의 임의의 조합으로부터 선택된 추가의 이펙터 기능을 증가시킨다.
- [0244] 추가 실시양태에서, 방법은 또한 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도한다.
- [0245] 다른 추가 실시양태에서, 방법은 또한 Fc-함유 폴리펩티드 내재화를 유도한다.
- [0246] 한 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포 또는 박테리아 세포이다.
- [0247] 또 다른 실시양태에서, IgG1 모 항체는 인간 IgG1 항체이다.
- [0248] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항원은 개별적으로 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFRvIII, IGF $\alpha$ , L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0249] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 완전 인간 항체이고, 임의적으로 제1 및 제2 모 항체는 CD20 및 CD38로부터 개별적으로 선택된 항원에 결합한다.
- [0250] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 7D8 및 005로부터 개별적으로 선택된다.
- [0251] 추가 실시양태에서, 세포는 박테리아 세포이다.
- [0252] 또 다른 실시양태에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스(*S. aureus*), 에스. 에피더미디스(*S. Epidermidis*), 에스. 뉴모니아(*S. pneumonia*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 클라미디아(*Chlamydia*), 이. 콜라이, 살모넬라(*Salmonella*), 시겔라(*Shigella*), 예르시니아(*Yersinia*), 에스. 티피무리움(*S. typhimurium*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*) 및 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0253] 또 다른 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항원은 리포테이코산 (LTA)이고, 임의적으로 제1 및 제2 모 항체 중 적어도 하나는 파기박시맙이다.
- [0254] 또 다른 실시양태에서, 항원은 비리온 상에서 발현된다.
- [0255] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 동일한 항원에 결합한다.
- [0256] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 동일한 VH 서열, VL 서열, 또는 VH 및 VL 서열 둘 다를 포함한다.
- [0257] 본 발명의 목적을 위해, 항원을 발현하거나 항원과 다른 방식으로 회합된 표적 세포는 임의의 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 예시적인 항원-발현 세포는 포유동물 세포, 특히 인간 세포, 예컨대 인간 암 세포; 및 단세포 유기체, 예컨대 박테리아, 원충, 및 단세포 진균, 예컨대 효모 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항원을 포함하거나 항원과 다른 방식으로 회합된 세포 막은 항원-발현 세포로부터 유래된 부분적인 및/또는 파괴된 세포 막을 포함한다. 비리온 또는 바이러스 입자와 회합된 항원은 비리온의 단백질 코트 및/또는 지질 외피에 포함되거나 다른 방식으로 회합될 수 있다.
- [0258] 표적 세포는 예를 들어 인간 종양 세포일 수 있다. 적합한 종양 항원은 본원에 기재된 바와 같은 임의의 표적 또는 항원, erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFRvIII, IGF $\alpha$ , L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), EpCAM 및 MRP3를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 항원은 CD20, CD38, HER2, EGFR, IGF $\alpha$ , CD25, CD74 및 CD32를 포함한다. 예시적인 항체는 WO 2004/035607에 개시된 바와 같은 항-CD20 항체 7D8, WO 06/099875에 개시된 바와 같은 항-CD38 항체 005, WO 2004/035607에 개시된 바와 같은 항-CD20 항체 11B8, WO 06/099875에 개시된 바와 같은 항-CD38 항체 003, WO 02/100348에 개시된 바와 같은 항-

EGFr 항체 2F8을 포함한다. 다른 특정한 항체의 예가 본원에 제공된다.

- [0259] 대안적으로, 표적 세포는 박테리아 세포, 예컨대 예를 들어 에스. 아우레우스, 에스. 에피더미디스, 에스. 뉴모니아, 바실루스 안트라시스, 슈도모나스 아에루기노사, 클라미디아, 이. 콜라이, 살모넬라, 시겔라, 예르시니아, 에스. 티피리움, 네이세리아 메닝기티데스 및 미코박테리움 투베르쿨로시스일 수 있다. 예시적인 항원은 리포테이코산 (LTA)을 포함하고, 예시적인 항체는 파기박시랍을 포함한다.
- [0260] 대안적으로, 표적은 바이러스, 진균 세포 또는 다른 입자, 예컨대 예를 들어 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), 뎡기 바이러스(Dengue virus), C형 간염 바이러스 (HCV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 인간 유두종 바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, 헤르페스바이러스(Herpesvirus), 폭스바이러스(poxvirus), 조류 인플루엔자 바이러스, RVS, 아스페르길루스(Aspergillus), 칸디다 알비칸스, 크립토코쿠스(Cryptococcus) 및 히스토플라스마(Histoplasma)의 표면 상에 존재할 수 있다.
- [0261] 한 실시양태에서, 접촉 단계 (ii)는 시험관내에서 일어난다.
- [0262] 한 실시양태에서, 접촉 단계 (ii)는 생체내에서 일어난다.
- [0263] 또 다른 실시양태에서, 단계 (ii)는 대상체에게 변이체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0264] 추가 실시양태에서, 대상체는 암, 박테리아 감염, 또는 바이러스 감염을 앓고 있다. 상기-언급된 실시양태의 접촉 단계 (ii)는 시험관내에서 또는 생체내에서 일어날 수 있다. 후자의 경우에, 단계 (ii)는 제제 또는 제제들을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 임의적으로 대상체는 암 또는 박테리아 감염을 앓고 있다. 치료 용도에 대한 추가의 상세내용이 하기에 제공된다.
- [0265] 제1 및 제2 항체는 동일한 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함한다. 이러한 에피토프는 동일한 또는 상이한 표적 상에 있을 수 있다.
- [0266] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 이러한 표적은 동일한 세포 또는 세포 유형 상에서 발현될 수 있거나, 또는 상이한 세포 또는 세포 유형 상에서 발현될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 이펙터 기능의 증진은 오직 표적을 둘 다 발현하는 세포 또는 세포 유형에서만 유도되고, 이에 의해 치료할 질환의 원인이 아닌 세포 또는 세포 유형의 임의의 부수적 손상 위험이 감소한다.
- [0267] 임의의 이론에 제한되지 않고, 제1 및 제2 항체가 동일한 세포 상에서 발견되는 에피토프에 결합하는 한 CDC의 증진은 2개의 특이적 표적/항원을 동시에 발현하는 표적 세포로 제한되며, 이에 의해 표적의 조합된 발현을 이용하여 증진된 CDC 유도의 선택성을 개선할 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0268] 표적이 상이한 세포 또는 세포 유형 상에서 발현되는 경우에, 이론에 제한되지 않고, 제1 및 제2 항체의 임의의 순서의 투여가 CDC 증진 및 또한 아마도 제2 표적을 발현하는 제2 세포 또는 세포 유형의 "동원"에 의해 다른 이펙터 기능을 개선할 것으로 여겨진다.
- [0269] 제1 및 제2 항체의 조합이 사용되는 한 실시양태에서, 단계 (ii)는 세포를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 돌연변이된 제1 및 제2 항체와 동시에, 개별적으로, 또는 순차적으로 접촉시킴으로써 수행될 수 있다.
- [0270] 본 발명은 또한 (i) 항체의 Fc 영역 내의 K439E인 K439에서의 돌연변이 및 S440K 또는 S440R인 S440에서의 돌연변이를 포함하는 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 변이체의 제제를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, IgG1 또는 IgG3 항체가 결합하는 항원과 회합하는 표적 세포, 세포 막, 비리온 또는 다른 입자에 대한 CDC 또는 다른 이펙터 반응, 예컨대 ADCC를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0271] 본 발명은 또한 (i) K439E 돌연변이를 포함하는 제1 항체인 제1 변이체 및 S440K 또는 S440R 돌연변이를 포함하는 제2 항체인 제2 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 세포를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 제1 및 제2 변이체의 제제와 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 접촉시키는 단계를 포함하는, 제1 IgG1 항체가 결합하는 제1 항원 및 제2 항체가 결합하는 제2 항원을 발현하는 표적 세포, 세포막 또는 비리온에 대한 CDC 또는 다른 이펙터 반응, 예컨대 ADCC를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0272] 개별 및 구체적 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 (i) 상이한 항원; (ii) 동일한 항원 상의 상이한 에피토프, (iii) 항원 상의 동일한 에피토프, 및 (iv) 항원 상의 동일한 에피토프에 결합하고, 동일한 VH 및/또는 VL 서열을 포함한다.



- [0273] 다른 방법
- [0274] 또 다른 주요 측면에서, 본 발명은
- [0275] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산(들)에서의 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 항체를 제조하는 단계;
- [0276] (ii) 모 항체와 비교하여 항원-발현 세포의 표면에 결합될 때 항체의 C1q-활성을 평가하는 단계; 및
- [0277] (iii) 증가된 C1q-결합력을 갖는 임의의 변이체의 돌연변이를 선택하는 단계
- [0278] 를 포함하는, C1q에 결합하는 항체의 이펙터 기능을 증진시키는 항체 내의 돌연변이를 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0279] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 항체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0280] 또 다른 주요 측면에서, 본 발명은
- [0281] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 또는 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산(들)에서의 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 모 항체의 변이체를 제조하는 단계;
- [0282] ii) 모 항체와 비교하여 이펙터 세포 또는 보체의 존재 하에 항원-발현 세포의 표면에 결합할 때 변이체에 의해 유도된 CDC-반응을 평가하는 단계; 및
- [0283] (iii) 증가된 CDC-반응을 갖는 임의의 변이체의 돌연변이를 선택하는 단계
- [0284] 를 포함하는, CDC-반응을 유도하는 항체의 능력을 증가시키는 모 항체 내의 돌연변이를 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0285] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 항체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y 및 S440W, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.
- [0286] 본 발명의 폴리펩티드
- [0287] 모 폴리펩티드
- [0288] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 특히 이뮤노글로불린의 CH3 영역, 예를 들어 항체 중쇄에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이다. "모 폴리펩티드"은 "모 항체"일 수 있다. 변형 전의 본 발명의 출발 물질로 사용되는 야생형 항체일 수 있는 "모" 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624 628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 따라서, 예를 들어 모노클로날 항체는 예를 들어 표면에서 항원을 발현하는 세포 또는 관심 항원을 코딩하는 핵산 형태의 관심 항원으로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 뮤린 비장 B 세포로부터 제조한 하이브리도마로부터 수득할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 토끼, 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 수득할 수 있다.
- [0289] 모 항체는 예를 들어, 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말 마우스, 예를 들어 HuMAb 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. HuMAb 마우스는 재배열되지 않은 인간 중쇄 ( $\mu$  및  $\gamma$ ) 및  $\kappa$  경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니유전자좌(minilocus)를, 내인성  $\mu$  및  $\kappa$  쇄 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 함유한다 (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는  $\kappa$ 의 감소된 발현을 나타내며, 면역화에 대한 반응에서, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진은 부류 전환 및 체세포돌연변이를 거쳐 높은 친화도의 인간 IgG,  $\kappa$  모노클로날 항체를 생성한다 (Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌; 문헌 [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol.

13 65 93 (1995) 및 Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)]에서 검토됨). HuMAb 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)]에 상세히 기재되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187 을 참조한다. 널리 공지된 기술에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해서 이러한 트랜스제닉 마우스로부터의 비장 세포가 사용될 수 있다.

[0290] 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 본 발명의 항체는 비제한적으로, 파지 디스플레이, 레트로 바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 포유동물 디스플레이, 효모 디스플레이 및 관련 기술분야에 공지된 다른 기술을 포함하는 디스플레이-유형 기술을 통해 확인될 수 있고, 생성되는 분자는 추가의 성숙, 예컨대 친화도 성숙에 적용될 수 있고, 이러한 기술은 관련 기술분야에 잘 공지되어 있다. 실시예 17에 기재된 특정한 전략은 파지-디스플레이를 사용하여 본 발명의 변이체를 제조하고 얻기 위해 임의의 항체에 적용될 수 있다.

[0291] 모 항체는 천연, 예를 들어 인간 Fc 도메인을 갖는 항체로 제한되지 않을 뿐만 아니라, 또한 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이, 예컨대 예를 들어 글리코실화에 영향을 주거나 또는 항체가 이중특이적 항체가 되도록 할 수 있는 돌연변이일 수 있다. 용어 "천연 항체"는 임의의 유전적으로 도입된 돌연변이를 포함하지 않는 임의의 항체를 의미한다. 자연적으로 발생된 변형, 예를 들어 상이한 동종이형을 포함하는 항체는 따라서 본 발명의 의미에서 "천연 항체"로서 이해되어야 하고, 모 항체로서 이해될 수 있다. 이러한 항체는 본 발명에 따른 하나 이상의 돌연변이에 대한 주형으로서 기능할 수 있고, 따라서 본 발명의 변이체 항체를 제공한다. 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이를 포함하는 모 항체의 예는 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 2개의 항체의 1/2-분자 교환을 촉진하고, 따라서, 응집체의 형성을 수반하지 않으면서 이중특이적 항체를 형성하는 환원 조건을 이용하는, WO2011/131746 (젠맵)에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체이다. 모 항체의 다른 예는 이중특이적 항체, 예컨대 이중이량체 이중특이적 항체: 트리옴 (프레제니우스); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코퍼레이션); Fc $\Delta$ Adp (레게네론); 노브-인투-홀 (제넨테크); 정전기적 스티어링 (암젠, 쥬가이, 온코메드); 시드바디 (머크); 아지메트릭 스캐폴드 (자임웁크스); mAb-Fv (젠코르); 및 LUZ-Y (제넨테크)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 예시적인 모 항체 포맷은 비제한적으로, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 인간 항체, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0292] 모 항체는 임의의 표적에 결합할 수 있고, 본 발명이 작용할 수 있는 이러한 표적 또는 항원의 예는 다음과 같을 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다; 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM17; AFP; AXL; ANGPT2 탄저병 항원; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; 암종 연관 항원 CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; Claudin4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; Cripto; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; 엔도텔린 B 수용체; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP 알파; Fc 감마 RI; FCER2; FGFR3; 피브린 II 베타쇄; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; GD3 강글리오시드; GDF2; GLP1R; 글리피칸-3; GPNMB; HBV (B형 간염 바이러스); HCMV (인간 시토크갈로바이러스); 열 쇼크 단백질 90 상동체 [칸디다 알비칸스]; 단순 포진 바이러스 gD 당단백질; HGF; HIV-1; HIV-1 IIIB gp120 V3 루프; HLA-DRB (HLA-DR 베타); 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 이중특이적; IgE Fc; IGF1R; IGHE 연결 영역; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; 인터류킨-2 수용체 베타 서브유닛; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV\_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; 루이스-y; 지질 A, 리포폴리사카라이드 LPS의 도메인; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; NCA-90 과립구 세포 항원; 넥틴 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; 포스포티딜세린; PTK-7; 슈도모나스 아에루기노사 혈청형 IATS 011; RSV (인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; 시가-유사 독소 II B 서브유닛 [에스캐리키아 콜라이]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; 스타필로코쿠스 에피더미디스 리포테이코산; T 세포 수용체 알파-베타; TF; TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; 및 비멘틴.

[0293] 모 항체는 임의의 이소형의 임의의 인간 항체, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM, 및

IgD, 임의적으로 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체일 수 있다. 모 항체는 임의의 서열 1, 2, 3, 4 및 5에 따른 서열을 포함할 수 있다.

[0294] 본 발명에서 사용하기 위한 모노클로날 항체, 예컨대 모 항체 및/또는 변이체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 따라서, 예를 들어 모노클로날 항체는 예를 들어 표면에서 항원을 발현하는 세포 또는 관심 항원을 코딩하는 핵산 형태의 관심 항원으로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 무린 비장 B 세포로부터 제조한 하이브리도마로부터 수득할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화시킨 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 수득할 수 있다.

[0295] 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 임의의 항원에 대해 지시된 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 트랜스제닉 및 트랜스크로모소믹 마우스는 본원에서 각각 HuMAb® 마우스 및 KM 마우스로 언급되는 마우스를 포함하고, 본원에서 "트랜스제닉 마우스"로서 총괄적으로 언급된다.

[0296] HuMAb® 마우스는 내인성  $\mu$  및  $\kappa$  채 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 비재배열된 인간 중쇄 ( $\mu$  및  $\gamma$ ) 및  $\kappa$  경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니유전자좌를 함유한다 (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는  $\kappa$ 의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진은 부류 전환 및 체세포 돌연변이를 거쳐 높은 친화도 인간 IgG,  $\kappa$  모노클로날 항체를 생성한다 (Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌; 문헌 [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) 및 Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)]에서 검토됨). HuMAb® 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 상세히 기재되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187을 참조한다.

[0297] HCo7, HCo12, HCo17 및 HCo20 마우스는 그의 내인성 경쇄 (카파) 유전자의 JKD 파괴 (문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)]에 기재된 바와 같음), 그의 내인성 중쇄 유전자의 CMD 파괴 (WO 01/14424의 실시예 1에 기재된 바와 같음), 및 KCo5 인간 카파 경쇄 트랜스진 (문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 기재된 바와 같음)을 갖는다. 추가로, HCo7 마우스는 HCo7 인간 중쇄 트랜스진을 갖고 (US 5,770,429에 기재된 바와 같음), HCo12 마우스는 HCo12 인간 중쇄 트랜스진을 갖고 (WO 01/14424의 실시예 2에 기재된 바와 같음), HCo17 마우스는 HCo17 인간 중쇄 트랜스진을 갖고 (WO 01/09187의 실시예 2에 기재된 바와 같음), HCo20 마우스는 HCo20 인간 중쇄 트랜스진을 갖는다. 생성된 마우스는 내인성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 유전자좌의 파괴에 동형접합성인 배경에서 인간 이뮤노글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 트랜스진을 발현한다.

[0298] KM 마우스 균주에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 기재된 바와 같이 동종접합 방식으로 파괴되고, 내인성 마우스 중쇄 유전자는 WO 01/09187의 실시예 1에 기재된 바와 같이 동종접합 방식으로 파괴되었다. 이러한 마우스 균주는 문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 기재된 바와 같이 인간 카파 경쇄 트랜스진 KCo5를 보유한다. 또한, 이러한 마우스 균주는 WO 02/43478에 기재된 바와 같이 염색체 14 단편 hCF (SC20)로 구성된 인간 중쇄 트랜스크로모솜을 보유한다. HCo12-Balb/C 마우스는 WO/2009/097006에 기재된 바와 같이 HCo12를 KCo5[J/K](Balb)에 교배시킴으로써 생성할 수 있다. 널리 공지된 기술에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해서 이러한 트랜스제닉 마우스로부터의 비장 세포가 사용될 수 있다.

[0299] 또한, 임의의 항원-결합 영역은 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 비제한적으로, 파지 디스플레이, 랫로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 다른 기술을 포함하는 디스플레이-유형 기술을 통해 확인된 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 항체로부터 수득할 수 있고, 생성된 분자는 추가의 성숙, 예컨대 친화도 성

속에 적용될 수 있고, 이러한 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (파지 디스플레이), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (파지 디스플레이), Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (리보솜 디스플레이), Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (파지 디스플레이), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)], 및 US 5,733,743 참조). 디스플레이 기술이 인간이 아닌 항체를 생산하기 위해 이용되는 경우, 이러한 항체는 인간화될 수 있다.

[0300] 본 발명에 따른 돌연변이는 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 아미노산의 치환은 임의의 자연 발생 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다.

[0301] "단일-돌연변이체"

[0302] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0303] 본 발명의 "단일-돌연변이체" 측면에 따른 항체 또는 폴리펩티드 변이체는 IgG2, IgG3, 및 IgG4 모 항체 내의 해당하는 위치의 아미노산 및 "예시적인" 및 "바람직한" 아미노산 치환과 함께 인간 IgG1 항체의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 각각의 아미노산 잔기를 열거한 표 1에 제시된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이, 전형적으로 아미노산 치환을 포함한다. IgG1에서 잔기 126 내지 326에 해당하는 IgG2 절편, 잔기 177 내지 377에 해당하는 IgG3 절편 및 잔기 127 내지 327에 해당하는 IgG4 절편은 도 2에 제시된다.

[0304] [표 1]

"단일-돌연변이체" 측면에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

| 아미노산<br>(IgG1) | 아미노산<br>(IgG2) | 아미노산<br>(IgG3) | 아미노산<br>(IgG4) | 예시적인 치환                     | 바람직한 치환            |
|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|--------------------|
| P247           | P247           | P247           | P247           | ACDFGHIKLMNRSTVW            | G                  |
| I253           | I253           | I253           | I253           | ADKLMNRSV, 대안적으로<br>EQT     | LV, 대안적으로 QN       |
| S254           | S254           | S254           | S254           | EFGHIKLPTVW                 | L                  |
| H310           | H310           | H310           | H310           | AGFKLPRTVW, 대안적으로<br>NQY    | PW, 대안적으로 Q        |
| Q311           | Q311           | Q311           | Q311           | ACEGHFIKLNPRSTWY            | LW, 대안적으로 ER       |
| E345           | E345           | E345           | E345           | ACDGHFIKLMNPQRSTVWY         | ADGHFIKLMNPQRSTVWY |
| D356/E356      | E356           | E356           | E356           | GILRTV                      | R                  |
| T359           | T359           | T359           | T359           | GNPR                        | R                  |
| E382           | E382           | E382           | E382           | FKLMPVW, 대안적으로<br>DHNQSTY   | LV, 대안적으로 DQKR     |
| G385           | G385           | G385           | G385           | ADHILNPQRSTV, 대안적으로<br>EKWY | NR, 대안적으로 DEKR     |
| Q386           | Q386           | Q386           | Q386           | ACDEGHFIKLNPRSTVWY          | K                  |
| E430           | E430           | E430           | E430           | ACDFGHIKLMNPQRSTVWY         | ADGHFIKLMNPQRSTVWY |
| H433           | H433           | H433           | H433           | R                           | R                  |
| N434           | N434           | N434           | N434           | DEGKRVSFV, 대안적으로<br>HQT     | W, 대안적으로 QHQR      |
| Y436           | Y436           | F436           | Y436           | IKLRSTVW, 대안적으로<br>AEFHMNQ  | IV, 대안적으로 NQST     |
| Q438           | Q438           | Q438           | Q438           | CEIKLSTVWY, 대안적으로<br>AGHNQR | CL, 대안적으로 NST      |
| K439           | K439           | K439           | K439           | ADEHLPRTY, 대안적으로 QW         | DEHR, 대안적으로 Q      |
| S440           | S440           | S440           | S440           | ACDEGHFIKLMNPQRTVWY         | WY, 대안적으로 DEQ      |
| K447           | K447           | K447           | K447           | DENQ, 결실                    | DENQ, 결실           |

[0305]

[0306] 표 1에 제시된 바와 같이, 실시예 19에서 Wien133 세포의 세포 용해의 증가를 일으킨 아미노산 치환이 "바람직한 치환"으로서 포함된다.

[0307] 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.



- [0308] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 OD405 nm에서의 흡광도 변화에 의해 측정시에 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 변이체의 결합을 30% 초과, 예컨대 20%, 10%, 또는 5% 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0309] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 실시예 34에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 마우스 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 모 항체의 결합 친화도를 배수 0.5 초과만큼 증가시키거나 또는 마우스 FcRn에 대한 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 결합 친화도를 배수 2 초과만큼 감소시키지 않는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc에 함유하지 않는다.
- [0310] 한 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이(들)는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0311] 한 실시양태에서, 변이체는 변이체의 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0312] 한 실시양태에서, 변이체는 실시예 37에 개시된 방법에서 결정된 바와 같이 변이체의 혈장 클리어런스를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0313] 또 다른 실시양태에서, 변이체는 실시예 37에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 혈장 클리어런스를 배수 3.0 초과, 예컨대 배수 2.5, 배수 2.0, 배수 1.5, 또는 배수 1.2 초과만큼 증가시키거나 또는 감소시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0314] 한 실시양태에서, 변이체는 변이체의 혈청 반감기를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0315] 한 실시양태에서, 변이체는 실시예 36에 개시된 방법에 의해 결정된 바와 같이 변이체의 표적 비의존성 유체 상보체 활성화를 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않는다.
- [0316] 한 실시양태에서, 변이체는 Fc 도메인에 임의의 추가의 돌연변이를 함유하지 않는다.
- [0317] 한 실시양태에서, 변이체는 오직 1개의 돌연변이를 포함한다.
- [0318] 한 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 변이체 항체일 수 있다.
- [0319] 한 구체적 실시양태에서, 아미노산 치환은 E345R이다.
- [0320] 실시예에 제시된 바와 같이, 이러한 아미노산 치환 중 하나를 포함하는 CD38 항체 HuMab-005 및 -003 (WO 2006/099875에 기재된 바와 같음) 및/또는 CD20 항체 HuMab-7D8 및 -11B8 (WO 2004/035607에 기재된 바와 같음) 및 리투시맙 및/또는 EGFR 항체 HuMab-2F8 (WO 2002/100348에 기재된 바와 같음)의 변이체는 각각 야생형 HuMab 005 및 7D8보다 높은 C1q-결합, 보체 활성화 및/또는 CDC를 나타내었다.
- [0321] 또한 변이체는 표 1에 열거된 "예시적인 치환"의 돌연변이 중 하나를 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 변이체는 1개 초과 돌연변이, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6개의 표 1에 열거된 임의의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0322] 지시된 돌연변이 외에, 변이체는 모 항체에 대해 기재된 바와 같은 임의의 특징을 가질 수 있다. 특히, 변이체는 인간 항체일 수 있다. 변이체는 돌연변이 외에, 임의의 IgG 하위유형일 수 있다.
- [0323] 항원-발현 세포의 표면, 세포 막, 비리온 또는 또 다른 입자 상의 그의 항원에 결합하거나, 또는 항원이 비리온과 회합할 때 (여기서, 임의적으로, 항원은 비리온의 단백질 코트 또는 지질 외피에 포함됨), 이러한 항체 변이체는 모 항체와 비교하여 증가된 (i) 항체에 의해 매개되는 CDC, (ii) 항체에 의해 매개된 보체 활성화, (iii) C1q-결합, (iv) 올리고머 형성, (v) 올리고머 안정성, 또는 임의의 (i) 내지 (v)의 조합 중 적어도 하나를 가질 수 있다. (iv) 또는 (v)의 한 실시양태에서, 올리고머는 육량체이다. 한 실시양태에서, 변이체는 또한 모 폴

리펩티드 또는 모 항체와 비교하여 증가된 ADCC를 가질 수 있다. 추가 실시양태에서, 변이체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교하여 동일한 또는 유사한 혈장 클리어런스를 유지한다. 추가 실시양태에서, 변이체는 모 폴리펩티드 또는 모 항체와 비교하였을 때 실시예 37에 개시된 방법에서 결정된 바와 같이 배수 3.0 초과, 예컨대 배수 2.5, 배수 2.0, 배수 1.5, 또는 배수 1.2 초과만큼 증가되거나 또는 감소된 혈장 클리어런스를 갖지 않는다.

- [0324] 임의의 특정한 이론에 제한되지 않으면서, 지시된 위치에서의 아미노산을 본 발명의 아미노산 잔기로 치환함으로써 발생하는 효과는 예를 들어 효과 그 자체를 야기하거나, 또 다른 분자의 Fc 도메인에 직접 접촉할 때 관련되거나, 또는 또 다른 Fc 도메인과 직접 상호작용하거나 또는 분자간 Fc:Fc 상호작용에 간접적으로 영향을 주기 위해 돌연변이될 수 있다. 따라서, 이론에 제한되지 않고, 치환은 올리고머 형태의 항체 분자 사이의 결합 강도를 직접 또는 간접적으로 증진시켜, 올리고머 구조, 예컨대 육량체, 오량체, 사량체, 삼량체, 또는 이량체 구조의 안정성을 증진시키는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 아미노산 치환은 새로운 분자간 Fc:Fc 결합의 형성, 예컨대 비제한적으로 반 데르 발스(Van der Waals) 상호작용, 수소 결합, 전하-전하 상호작용, 또는 방향족 적층 상호작용을 촉진하거나 강화시키는 것, 또는 물 분자의 방출에 의해 Fc:Fc 상호작용시에 증가된 엔트로피를 촉진하는 것일 수 있다. 또한, 표 1을 참고로 하면, "예시적인 치환"은 분자간 Fc:Fc 상호작용 또는 분자내 상호작용에 참여하거나 이를 촉진하는 크기 및 물리화학적 특성을 기초로 하여 선택될 수 있다. "바람직한 치환"은 분자간 Fc:Fc 상호작용 또는 분자내 상호작용에 참여하거나 자극하기에 최적인 크기 및 물리화학적 특성을 기초로 하여 선택될 수 있다.
- [0325] 한 실시양태에서, 변이체는 표 1로부터 선택된 추가의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0326] 한 실시양태에서, 변이체는 E345X/E430X, E345X/S440Y, E345X/S440W, E430X/S440Y, 및 E430X/S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 2개의 돌연변이의 조합을 포함한다.
- [0327] 이러한 적어도 2개의 아미노산에서의 돌연변이가 변이체에 포함되는 임의의 실시양태에서, 돌연변이는 변이체의 각각의 중쇄에 존재할 수 있거나, 또는 둘 중 하나가 중쇄 중 하나에 포함될 수 있고, 다른 하나가 다른 중쇄에 포함될 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다.
- [0328] 한 실시양태에서, 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 이러한 아미노산의 치환은 임의의 자연 발생 또는 인공 아미노산에 의한 것일 수 있다.
- [0329] 본 발명에 따른 돌연변이는 각각 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 아미노산의 치환은 임의의 자연 발생 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다.
- [0330] 따라서, 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 결실이다.
- [0331] 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 삽입이다.
- [0332] 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 치환이다.
- [0333] 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이의 예시적인 특정 조합은 E345R/E430T, E345R/S440Y, E345R/S440W, E345R/E430G, E345Q/E430T, E345Q/S440Y, E345Q/S440W, E430T/S440Y, 및 E430T/S440W이다.
- [0334] 본 발명의 실시양태에 따른 하나 이상의 아미노산에서의 돌연변이 이외에, IgG 중쇄는 관련 기술분야에 공지된 추가의 돌연변이, 예를 들어 이펙터 기능을 추가로 개선하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 추가의 돌연변이는 CDC, Fc-감마 수용체 결합 또는 FcRn-결합을 증진시키고/거나 Fc-감마 수용체-매개 이펙터 기능을 개선하는 공지된 돌연변이를 포함한다.
- [0335] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 공지된 CDC 증진 변형, 예를 들어 키메라 IgG 분자의 생성을 위한 IgG 이소형 사이의 절편 교환 (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72); 힌지 영역 내의 하나 이상의 아미노산 치환 (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138) 및/또는 잔기 D270, K322, P329, 및 P331 주위에 집중된 CH2 도메인 내의 C1q-결합 부위 내의 또는 근처의 하나 이상의 아미노산 치환 (Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575; Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564 및 WO 99/51642)을 추가로 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 CDC 또는 ADCC를 통한 증진된 이펙터 기능을 제공하는, 아미노산 치환 S267E, H268F, S324T, S239D, G236A 및 I332E의 임의의 조합을 추가로 포함한다 (Moore et al., 2010 mAbs 2(2), 181-189). Fc-수용체에 대한 결합 (WO 2006/105062, WO 00/42072, 미국 특허 6,737,056 및 미국 특허 7,083,784에 기재됨) 또는 항체의 물리적 특성 (WO 2007/005612

A1에 기재됨)에 영향을 주는 다른 Fc 돌연변이도 본 발명의 변이체에 사용될 수 있다.

[0336] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 Fc-감마 수용체 결합 및/또는 Fc-감마 수용체-매개 이펙터 기능을 증진시키는 변형을 추가로 포함한다. 이러한 변형은 (i) CH2 부착 글리코실화에서의 푸코스의 양의 감소 (글리코-조작) (Umana P, et al., Nat Biotechnol 1999; 17: 176-80; Niwa R, et al., Clin Cancer Res 2004; 10: 6248-55.)), 및 (ii) 항체의 힌지 또는 CH2 영역에서의 아미노산의 부위-지정 돌연변이유발 (단백질-조작) (Lazar GA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 4005-10)을 포함한다.

[0337] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 예를 들어 IgG 항체의 반감기 (t1/2)를 연장하기 위해 FcRn 결합 부위에서 추가로 조작된다. 이러한 변형은 (i) N434A 및 T307A/E380A/N434A 돌연변이 (Petcova et al. Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759); (ii) FcRn 결합을 개선하는, Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382, 및 Asn434 중 하나 이상의 알라닌 잔기로의 치환 (Shields RL, et al. J. Biol. Chem. 2001;276:6591); 및 (iii) FcRn에 대한 친화도를 증가시키는, IgG1에서의 M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, H433R/N434Y/Y436H, M252Y/S254T/T256E-H433K/N434F/Y436H 또는 M252Y/S254T/T256E-G385R/Q386T/P387R/N389P로부터 선택된 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합 (Dall'Acqua et al., 상기 문헌)을 포함한다.

[0338] "이중-돌연변이체"

[0339] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0340] 상기 및 추가로 하기에 기재된 바와 같이, 본 발명은 또한 "이중-돌연변이체" 측면에 관한 것이며, 여기서 2개의 돌연변이는 개별적으로는 각각 이펙터 기능을 감소시키지만 함께는 이펙터 기능을 모 항체의 수준으로 함께 회복시킨다. 함께 사용될 때, 변이체의 특이성은 증가한다. "이중-돌연변이체" 측면에 따른 항체 변이체는 특이적 아미노산 잔기 상호작용 쌍 K439 및 S440, K447 및 448, 또는 K447, 448, 및 449에 2개의 돌연변이, 전형적으로 아미노산 치환을 포함한다.

[0341] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E345K, 또는 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이; 및 (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기 (단, S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 제1 돌연변이가 S440Y 또는 S440W인 경우에 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이임),

[0342] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하거나 또는 K447K/R/H 및 448P에 해당하는 아미노산 잔기; 또는

[0343] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하거나 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 해당하는 아미노산 잔기에 해당하는 군으로부터 선택된 제2 돌연변이를 포함한다. 표 2A 및 B는 "이중-돌연변이체" (표 A) 및 "혼합-돌연변이체" (표 2B) 측면에 대한 "예시적인" 및 "바람직한 치환"을 보여준다.

[0344] [표 2A]

"이중-돌연변이체" 측면에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

| 아미노산 쌍 (IgG1,2,3,4) | 예시적인 치환                          | 바람직한 치환         |
|---------------------|----------------------------------|-----------------|
| K439/S440           | K439ED, 대안적으로 R/S440KR, 대안적으로 ED | K439E/S440K     |
| K447/448/449        | K447ED/448KRH/449P               | K447E/448K/449P |
| K447/448            | K447KRH/448ED                    | K447K/448E      |

[0345]

[0346] [표 2B]

"혼합-돌연변이체" 측면 (Ab1 + Ab2)에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

| 아미노산 쌍 (IgG1)       | 예시적인 치환                      | 바람직한 치환                |
|---------------------|------------------------------|------------------------|
| K439 + S440         | K439DER + S440DEKR           | K439E + S440K          |
| K447 + K447/448     | K447DE + K447KRH/448P        | K447E + K447/448P      |
| K447 + K447/448/449 | K447DE + K447KRH/448KRH/449P | K447E + K447/448K/449P |

[0347]

[0348]

한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, 및 E345Y에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이, 및 K439 및 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 포함하며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 및 S440W가 아니다.

[0349]

변이체는 또한 오직 아미노산 잔기 치환 중 하나, 예컨대 K439E 또는 S440K만을 포함할 수 있고, 예컨대 변이체는 임의적으로 S440에서의 돌연변이가 존재하지 않으면서 K439에서의 돌연변이를 포함한다는 것이 본 발명에 의해 고려된다.

[0350]

한 실시양태에서, 본 발명은 K439에서의 돌연변이가 E 및 D로부터 선택된 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 K439E인 변이체에 관한 것이다.

[0351]

또 다른 실시양태에서, 변이체는 임의적으로 K439에 돌연변이가 존재하지 않으면서 S440에 돌연변이를 포함한다.

[0352]

한 실시양태에서, 본 발명은 S440에서의 돌연변이가 K 및 R로부터 선택된 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 S440K인 변이체에 관한 것이다.

[0353]

한 실시양태에서, 변이체는 K439 및 S440 둘 다에 돌연변이를 포함한다.

[0354]

또 다른 실시양태에서, K439에서의 돌연변이는 K439 → D, E 또는 R, 예컨대 K439D/E로부터 선택되고, S440에서의 돌연변이는 S440 → D, E, K 및 R, 예컨대 S440K/R로부터 선택된다.

[0355]

또 다른 실시양태에서, K439에서의 돌연변이는 K439D 및 K439E로부터 선택되고, S440에서의 돌연변이는 S440K 및 S440R로부터 선택된다.

[0356]

또 다른 실시양태에서, 변이체는 K439E 및 S440K 돌연변이를 포함한다.

[0357]

한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 모 항체이다.

[0358]

실시에 4-6에 기재된 바와 같이, K439E 및 S440K 돌연변이 중 오직 1개만을 포함하는 항체 변이체는 C1q에 대해 급격하게 증가된  $K_D$ 를 가지며, 이는 감소된 보체 활성화 및/또는 CDC 능력을 반영한다. 놀랍게도, 돌연변이를 둘 다 포함하는 HuMAb 7D8 또는 005의 항체 변이체는 회복된 또는 증가된 C1q-결합 또는 CDC를 갖는 것으로 밝혀졌다. 임의의 특정한 이론에 제한되지 않고, 근본적인 메커니즘은 아마도 도 4 및 5에 예시된 바와 같이, 서로에 대해 입체적으로 보완하는 각각의 돌연변이에 의해 설명될 수 있다.

[0359]

한 실시양태에서, 모 폴리펩티드, 및 이에 의한 그의 변이체는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 항체일 수 있다.

[0360]

또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 위치 K439 및 S440 둘 다에서의 돌연변이를 포함하는 변이체는 모 항체 또는 K439 및 S440 중 하나에서만 돌연변이를 포함하는 항체 변이체와 비교하여, 보체 의존성 세포독성 (CDC), C1q-결합, 보체 활성화, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존성 세포 식세포작용 (ADCP), 보체-의존성 세포 세포독성 (CDCC), 보체-증진 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 그의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개 이펙터 기능의 증가를 나타낸다.

[0361]

본 발명은 또한 모 항체 (예를 들어, 야생형 항체일 수 있음) 또는 오직 K439E 또는 S440K 돌연변이 중 1개를 포함하는 항체 변이체와 비교하여, (i) 항체에 의해 매개되는 CDC, (ii) 항체에 의해 매개된 보체 활성화, (iii) C1q-결합력, (iv) 올리고머 형성, (v) 올리고머 안정성, 또는 임의의 (i) 내지 (v)의 조합 중 하나 이상을 회복하기 위한, 항체 내의 K439E 및 S440K 돌연변이의 용도를 제공한다. (iv) 또는 (v)의 한 실시양태에서, 올리고머는 육량체이다.



- [0362] 한 실시양태에서, 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0363] 혼합-돌연변이체
- [0364] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0365] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 또한 단독으로는 이펙터 기능을 감소시키지만 함께 사용될 때에는 이펙터 기능을 회복시키는 돌연변이, 예를 들어 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439 및 S440에서의 돌연변이가 존재한다는 것을 밝혀내었다. 이러한 개념은 또한 하나의 항체에 K439를 도입하고 다른 항체에 S440을 도입함으로써 2개의 상이한 항체의 쌍 형성을 보장하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, "혼합-돌연변이체" 측면에 따른 항체 변이체는, 전형적으로 동일한 Fc-분자 사이의 감소된 또는 상당히 감소된 Fc:Fc 상호작용을 일으키는 것을 제외한 돌연변이를 포함한다. 그러나, "혼합-돌연변이체" 항체로서 본 발명의 변이체는 서로 쌍을 형성하여, 예를 들어 각각의 변이체 단독 또는 모 항체 또는 모 항체들의 혼합물과 비교하여 특이적 항체 변이체 쌍에 대해 회복된 또는 심지어 증가된 CDC, C1q-결합, 보체 활성화, 올리고머 형성, 및/또는 올리고머 안정성을 제공할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 올리고머는 육량체이다. 한 실시양태에서, 항체 변이체 쌍은 부가적으로 또는 대안적으로 유지된 또는 개선된 다른 이펙터 기능, 예컨대 C1q-결합, 보체 활성화, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체-결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존성 세포 식세포작용 (ADCP), 보체-의존성 세포 세포독성 (CDCC), 보체-증진 세포독성, 옉소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 그의 임의의 조합을 갖는다. 본 발명의 상기 측면은 C1q-결합, 보체 활성화, CDC 또는 다른 이펙터 기능의 강도뿐만 아니라 선택성이 조절될 수 있는 많은 용도를 제공한다.
- [0366] "혼합-돌연변이체" 쌍에서의 각각의 항체 변이체에 대한 예시적인 돌연변이 부위는 표 2B에 제시된다. 구체적으로, 본 발명은 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 항체의 변이체를 제공하고, 여기서 변이체는 K439 및 S440 중 하나에 해당하는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0367] 한 실시양태에서, 돌연변이는 K439에서의 E 또는 D로부터 선택된 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 K439E이다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 S440에서의 K 또는 R로부터 선택된 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 S440K이다.
- [0368] 한 실시양태에서, 변이체는 오직 K439에 해당하는 위치에서의 아미노산 돌연변이를 포함하고, IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 아미노산 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0369] 한 실시양태에서, 변이체는 오직 S440에 해당하는 위치에서의 아미노산 돌연변이를 포함하며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 아미노산 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0370] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이; 및 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 포함하는 변이체에 관한 것이다.
- [0371] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, 및 E345Y에 해당하는 군으로부터 선택된 제1 돌연변이; 및 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 포함하는 변이체에 관한 것이며, 단 제2 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0372] 한 실시양태에서, 2개의 상기 기재된 실시양태는 본 발명에 따른 "혼합-돌연변이체" 쌍 측면에서, 조합될 수 있다.
- [0373] "혼합-돌연변이체" 쌍 내의 각각의 변이체는 표 1에 열거된 아미노산의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다.
- [0374] 본 발명의 한 실시양태에서, "혼합-돌연변이체" 쌍은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고,
- [0375] 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는 (i) K439에서의 돌연변이 이외에, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G,



E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 제1 돌연변이, 및 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하고;

- [0376] 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는 (i) S440에서의 돌연변이 이외에, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X 및 E345X, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, 및 E345Y에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 제1 돌연변이,
- [0377] 및 (ii) IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0378] 다른 예시적인 "혼합-돌연변이체" 쌍은 임의의 다음 쌍을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다: 돌연변이 K447E를 포함하는 제1 변이체 및 돌연변이 K447/P448을 포함하는 제2 변이체; 돌연변이 K447E를 포함하는 제1 변이체 및 돌연변이 K447/K448/P449를 포함하는 제2 변이체.
- [0379] 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 이러한 아미노산의 치환은 임의의 자연 발생 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다.
- [0380] 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실이다.
- [0381] 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 삽입이다.
- [0382] 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 아미노산의 치환이다.
- [0383] 특정한 실시양태에서, 제1 변이체 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0384] 예를 들어, 한 실시양태에서, "혼합-돌연변이체" 쌍에서의 하나의 변이체는 E430G, E430S, E345K 또는 E345Q 중 하나를 K439E 돌연변이와 함께 포함하고, 다른 변이체는 E430G, E430S, E345K 또는 E345Q 중 하나를 S440K 돌연변이와 함께 포함하며, 이에 따라 증가되고 보다 특이적인 C1q-결합력, 보체 활성화, CDC, 올리고머 형성, 올리고머 안정성, 및/또는 다른 이펙터-관련 기능, 예컨대 ADCC, Fc-감마 수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, CDC, 보체-증진 세포독성, 항체 매개 세포포작용, 내재화, 아포토시스, 오프온화 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 및/또는 그의 조합을 제공한다.
- [0385] "혼합-돌연변이체" 측면은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 표 2A에 열거된 각각의 하나 초과 돌연변이를 포함하는 2개의 변이체, 예컨대 돌연변이 S440K/K447E를 포함하는 제1 변이체, 및 돌연변이 K439E/K447/P448을 포함하는 제2 변이체; 예컨대 돌연변이 K439E/K447E를 포함하는 제1 변이체, 및 돌연변이 S440K/K447/P448을 포함하는 제2 변이체를 포함할 수 있다.
- [0386] 본원에 기재된 바와 같이, "혼합-돌연변이체" 쌍 내의 변이체는 동일한 또는 상이한 모 항체로부터 유래될 수 있다. 또한, "혼합-돌연변이체" 측면은 이중특이적 또는 비대칭적 항체에 사용될 수 있다. 또한, 제1, 제2 및 제3 항체는 동일한 또는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0387] 또한, "혼합-돌연변이체" 측면은 K439E 돌연변이를 갖는 제1 항원에 대한 제1 항체 및 S440K 또는 S440R 돌연변이를 갖는 제2 항원에 대한 제2 항체를 사용함으로써 2개의 특이적 종양 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 보다 특이적으로 작용하는 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 제공할 수 있다. 임의적으로 이중특이적 항체인 3개의 변이체를 포함하는 "혼합-돌연변이체" 측면을 이용함으로써 적어도 2개, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6개의 특이적 종양 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 보다 특이적으로 지시된 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 제공할 수 있다.
- [0388] 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체" 및 "혼합-돌연변이체" 측면의 한 실시양태에서, 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0389] "혼합-돌연변이체" 측면의 임의의 실시양태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 변이체는 표 1에 열거된 임의의 아미노산 치환의 동일한 또는 상이한 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0390] 다중특이적 항체
- [0391] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이

해되어야 한다.

- [0392] 본원에 기재된 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체" 및 "혼합-돌연변이체" 측면의 임의의 실시양태는 하기 기재되는 다중특이적 항체 측면에 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0393] 따라서, 한 실시양태에서, 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0394] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 WO 2011/131746에 기재된 포맷을 갖는다.
- [0395] 한 주요 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체인 모 항체의 변이체에 관한 것이며, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 제1 및/또는 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하고,
- [0396] 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 것으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하고;
- [0397] 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407 및 K409에 해당하는 것으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 포함하고, 제1 폴리펩티드에서의 추가의 돌연변이는 제2 폴리펩티드에서의 추가의 돌연변이와 상이하다.
- [0398] 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 이러한 아미노산의 치환은 임의의 자연 발생 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다.
- [0399] 본 발명의 이중특이적 항체는 특정한 포맷으로 제한되지 않고, 상기 및 본원에 기재된 임의의 것일 수 있다.
- [0400] 본 발명의 하나의 특정한 실시양태에서, (i) 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이 (예컨대, K409R)를 포함하고;
- [0401] (ii) 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이 (예컨대, F405L)를 포함하고; 또는 대안적으로
- [0402] (iii) 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이 (예컨대, F405L)를 포함하고;
- [0403] (iv) 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이 (예컨대, K409R)를 포함한다.
- [0404] 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된다.
- [0405] 본 발명에 따른 이러한 이중특이적 항체는 실시예 22에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 또한, 생성된 이중 이량체 단백질에 의한 CDC 사멸에 대한 효과는 실시예 23에 기재된 바와 같은 검정을 이용함으로써 시험할 수 있다.
- [0406] 이중특이적 항체는 예를 들어 CD20 항체의 항원-결합 영역 및 CD38 항체의 항원-결합 영역, 및 표 1 및/또는 2A/B에 열거된 하나 이상의 아미노산의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예시적인 CD20-결합 영역은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO2004/035607에 기재된 오파투무맙 (2F2), 7D8 및 11B8, 및 리톡시맙 (WO 2005/103081)의 것을 포함한다. 예시적인 CD38-결합 영역은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO2006/099875에 기재된 003 및 다라투무맙 (005)의 것을 포함한다.
- [0407] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 동일한 또는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0408] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 내의 제1 돌연변이는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0409] "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면의 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM, 또는 IgE 항체, 임의적으로 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0410] 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 측면, 및 다중특이적 항체 측면에서, 항체의

C1q-결합은 실시예 4에 기재된 검정에 따라 결정되고, CDC는 실시예 5, 6 또는 10에 기재된 검정에 따라 결정되고, 돌연변이는 임의적으로 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합을 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교함으로써 결정된 바와 같이 C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에 존재하지 않고, ADCC는 실시예 12에 기재된 검정에 따라 결정된다.

[0411] 추가로, 본 발명은 상기 기재된 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면 또는 실시양태의 변이체의 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 기재된 임의의 "이중-돌연변이체" 측면 및 실시양태의 변이체를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 상기 변이체, 제제, 또는 조성물의 의약으로서의 용도를 제공한다.

[0412] 본 발명의 상기 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합 돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면은 특히 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 (유니프루트 수탁 번호 P01857; 서열 1)의 밑줄 친 잔기 130 내지 330에 해당하는 관련 절편인 P247 내지 K447을 포함하는 IgG1 중쇄를 갖는 인간 항체 분자에 적용될 수 있다.

```
1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfpkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprep qvytlppsrdet ltknqvsltc
251 lvkgfyfypsdi avewesngqp ennykttpv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk
```

[0413]

[0414] 본 발명은 또한 인간 IgG2 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 IgG2 중쇄 불변 영역 (수탁 번호 P01859; 서열 2)의 밑줄 친 잔기 126 내지 326에 해당한다.

```
1 astkgpsvfp lapcsrstse staaгclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktver
101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vsvltvvhq dwlngkeykc
201 kvsnkqlpap iektisktkg qprepqvvtl ppsreemtkn qvsltcclvk
251 fypsdiavew esngqpenny kttpmlsd qsflysklt vdksrwqggn
301 vfscsvmhea lhnhytqksl slspgk
```

[0415]

[0416] 본 발명은 또한 인간 IgG3 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 다음과 같이 밑줄 친, IgG3 중쇄 불변 영역 (유니프루트 수탁 번호 P01860, 서열 3)의 잔기 177 내지 377에 해당한다.

```
1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
101 ktplgdtht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
201 pevqfkwyvd qvevhnaktk preeqynstf rvsvltvlh qdwlngkeyk
251 ckvsnkappa pietisktk gqprepqvvt lppsreemtk nqvsltcclvk
301 gfypsdiave wessgqpenn ynttpmlsd dgsfflyskl tvdksrwqgg
351 nifscsvmhe alhnrtqks lslspgk
```

[0417]

[0418] 본 발명은 또한 인간 IgG4 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 IgG4 중쇄 불변 영역 (수탁 번호 P01859, 서열 4)의 밑줄 친 잔기 127 내지 327에 해당한다.

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv  
 51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdhkps ntkvdkrves  
 101 kyggpcpscp afeilggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed  
 151 pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty rvvsvltvlh qdwlngkeyk  
 201 ckvsnkgpls siektiskak gqprepvyt lppsgeemtk nqvsltclvk  
 251 gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds dgsfflysrl tvdksrwqeg  
 301 nvfscsvmhe alhnhytqks lsllslgk

[0419]

[0420]

본 발명은 또한 인간 IgG1m(f) 동종이형 중쇄 부분을 갖는 항체에 적용될 수 있다. IgG1m(f) 동종이형의 아미노산 서열 (CH3 서열은 밑줄로 표시함) - 서열 5

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv  
 51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep  
 101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs  
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk  
 201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsree mtknqvsltc  
 251 lvkgfyysdi avewesngqp ennykttppv ldsgsffly skltvdksrw  
 301 qggnvfscsv mhealnhyt qksllslspgk

[0421]

[0422]

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 IgG1m(f) 불변 영역의 각각의 절편의 정렬이 도 2에 제시된다. 따라서, 표 1 또는 표 2A 및 B에 기재된 아미노산 내의 임의의 돌연변이는 본 발명에 따른 변이체를 얻기 위해 정렬에 의해 규정된 IgG2, IgG3, IgG4, 및/또는 IgG1m(f) 내의 그의 동등한 위치에 도입될 수 있다.

[0423]

한 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 임의의 측면에 따른 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 전장 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체의 변이체를 제공한다.

[0424]

임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 측면 및 다중특이적 항체 측면에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330, 서열 2의 잔기 126 내지 326, 서열 3의 잔기 177 내지 377, 또는 서열 4의 잔기 127 내지 327의 서열을 포함할 수 있다.

[0425]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 1-5, 예컨대 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 또는 서열 5로부터 선택되는 서열을 포함한다.

[0426]

한 실시양태에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330의 서열을 포함한다.

[0427]

모 항체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 모 항체일 수 있다. 이러한 문맥에서, 모 항체는 또한 제1 모 및 제2 모 항체인 것으로도 의도된다.

[0428]

한 실시양태에서, 모 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM 또는 IgE 항체이다.

[0429]

한 실시양태에서, 모 항체는 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.

[0430]

한 실시양태에서, 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 서열 1 또는 5를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1m(za) 또는 IgG1m(f) 동종이형이다.

[0431]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 2를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG2 항체이다.

[0432]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 3을 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG3 항체이다.

[0433]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 4를 포함하는 Fc-영역을 임의적으로 포함하는 인간 IgG4 항체이다.

[0434]

임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면의 특정 실시양태에서, 변이체는 본 발명에 따라 도입된 돌연변이를 제외하고, 서열 1, 2, 3, 4, 및 5의 아미노산 P247 내지 K447에 적어도 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성 정도를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0435]

따라서, 변이체는 본원에 정의된 임의의 돌연변이를 제외하고 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 또는 서열 5에 다른 서열을 포함할 수 있다.

- [0436] 본 발명에 따른 임의의 상기 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합-돌연변이체" 및 다중특이적 측면은 하기 실시양태를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0437] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 항체는 1가 항체, 중쇄 항체, 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED), 트리오맵, 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (DVD-Ig), 노브-인투-홀 항체, 미니-항체, 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART); LUZ-Y 항체, 바이클로닉 항체, 이중 표적화 (DT)-Ig 항체, 투-인-원 항체, 가교 결합된 Mab, mAb<sup>2</sup>, CovX-바디, IgG-유사 이중특이적 항체, Ts2Ab, BsAb, 허큘레스 항체, TvAb, ScFv/Fc 융합 항체, 스콜피온스, Fc 도메인에 융합된 scFv 단편, 및 Fc 도메인에 융합된 이중 scFv 단편으로 이루어진 군으로부터 임의적으로 선택되는 항체 단편이다.
- [0438] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체 둘 다는 인간 종양 세포의 표면 상에서 발현된 항원에 결합한다.
- [0439] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체에 대한 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrvIII, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택된다.
- [0440] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 완전 인간 항체이다.
- [0441] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체에 대한 항원은 CD20 및 CD38로부터 임의의 순서로 선택되고, 임의적으로 제1 및 제2 모 항체는 7D8 및 005로부터 임의의 순서로 선택된다.
- [0442] 추가 실시양태에서, 제1 항체 및 제2 항체 둘 다는 박테리아 세포 또는 비리온의 표면 상에서 발현된 항원에 결합한다.
- [0443] 또 다른 실시양태에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스, 에스. 에피더미디스, 에스. 뉴모니아, 바실루스 안트라시스, 슈도모나스 아에루기노사, 클라미디아 트라코마티스, 이. 콜라이, 살모넬라, 시겔라, 예르시니아, 에스. 티피유리움, 네이세리아 메닝기티데스 및 미코박테리움 투베르쿨로시스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0444] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원에 결합한다.
- [0445] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항체이다.
- [0446] 또 다른 실시양태에서, 모 항체는 7D8 및 005로부터 선택된다.
- [0447] 조성물
- [0448] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0449] 본 발명은 또한 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 모 항체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 변이체 및 모 항체일 수 있다. 구체적 측면 및 실시양태가 하기 기재될 것이다. 또한, 이러한 변이체는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 방법에 따라 수득할 수 있다.
- [0450] 한 측면에서, 본 발명은 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제1 및 제2 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 제1 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0451] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0452] 바람직한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함한다.
- [0453] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 둘 다 동일하거나 또는 상이할 수 있는 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함한다.
- [0454] 또 다른 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하



나 이상의 돌연변이(들)를 포함하고,

- [0455] 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하지 않는다.
- [0456] 한 실시양태에서, 조성물은 적어도 이뮤노글로불린의 CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 도메인을 포함하는 적어도 하나의 분자 및 본 발명에 따른 변이체를 포함하며, 여기서 분자는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E345K, 및 E345Q에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기(들)에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0457] 실시양태에서, 기재된 분자는 "Fc-단독 분자"로 지칭될 수 있고, 예를 들어 힌지 영역을 추가로 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 힌지 영역은 포함되지 않을 수 있다.
- [0458] Fc-단독 분자 및 본 발명에 따른 임의의 변이체를 포함하는 조성물은 영상화 진단 방법에 사용하기 위해 또는 세포 표면에 결합시에 변이체의 결합력을 조정하기 위해 적용될 수 있다.
- [0459] Fc-단독 분자는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및/또는 S440에 해당하는 아미노산 잔기에서의 추가의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있으며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 제1 돌연변이가 S440Y 또는 S440W인 경우에 추가의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 아미노산 잔기에 있다.
- [0460] 또 다른 실시양태에서, (i) 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하고, (ii) 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나; 또는
- [0461] (i) 및 (ii)는 대안적으로
- [0462] (iii) 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함하며, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고;
- [0463] (iv) 제2 변이체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다.
- [0464] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 K439에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 위치 S440에서의 돌연변이는 S440K/R이다.
- [0465] 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 조성물에 관한 것이며, 여기서
- [0466] (i) 제1 변이체는 전구약물을 추가로 포함하고,
- [0467] (ii) 제2 변이체는 제1 변이체 상의 전구약물에 대한 활성화제를 포함하거나; 또는
- [0468] (i) 및 (ii)는 대안적으로
- [0469] (iii) 제2 변이체는 전구약물을 포함하고,
- [0470] (iv) 제1 변이체는 제2 변이체 상의 전구약물에 대한 활성화제를 포함할 수 있다.
- [0471] 용어 "전구약물"은 본 발명에 따라 활성 약리학적 (항암) 작용제가 되기 전에 예를 들면 대사 과정에 의해 화학적 전환을 거쳐야 하는, 상대적으로 비-세포독성인 약물 전구체로서 이해되어야 한다. 전구 약물 및 이들의 제조 방법에 대한 예는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예는 효소-전구약물을 포함하는 항체 조합이며, 여기서 약물 전달은 동일한 세포 상에 존재하는 그의 항원 표적(들)에 대한 전구약물과 접합된 항체의 결합 및 상기 전구약물을 위한 활성화제와 접합된 항체의 결합에 의해 제공된다. 이는 전구약물 및 그의 활성화제를 서로 근접하게 만들고, 이에 의해 약물이 국부로 방출되어, 예를 들어 주변 세포에 침투하여 이들 세포를 사멸시킬 수 있다. (Senter and Springer, 2001 Adv Drug Deliv Rev. 2001 Dec 31;53(3):247-64, Senter, 1994 FASEB J. 1990 Feb 1;4(2):188-93).
- [0472] 용어 "전구약물의 활성화제"는 본 발명에 따라 전구약물을 활성 약물로 전환시킬 수 있는 분자로 이해되어야 한다. 전구약물의 활성화제 및 이들의 제조 방법에 대한 예는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 활성화제의 예는 전구약물의 활성 약물로의 전환을 위한 촉매로서 거동하는 효소일 수 있다. (Senter and Springer, 2001

Adv Drug Deliv Rev. 2001 Dec 31;53(3):247-64, Senter, 1994 FASEB J. 1990 Feb 1;4(2):188-93).

- [0473] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드는 각각 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 제1 및 제2 모 항체이다.
- [0474] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM, 또는 IgE 항체, 임의적으로 각각 인간 전장 항체, 예컨대 각각 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0475] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 각각 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0476] 추가 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 항체는 각각 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고; 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 해당하는 위치로부터 선택된 위치에서 추가의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이는 제2 CH2-CH3 영역에서의 추가의 아미노산 돌연변이와 상이하다.
- [0477] 바람직한 실시양태에서, 제1 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K409에 해당하는 위치에 있고 (예컨대, K409R); 제2 CH2-CH3 영역의 추가의 아미노산 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 F405에 해당하는 위치에 있다 (예컨대, F405L).
- [0478] 한 실시양태, 조성물의 제1 및 제2 변이체는 동일한 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0479] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 링커를 통해 독소에 접합된다.
- [0480] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 융합 단백질의 부분이다.
- [0481] 특정한 실시양태에서, 조성물의 제1 및/또는 제2 변이체는 오직 1개의 돌연변이를 포함한다.
- [0482] 제2 변이체가 본원에 기재된 임의의 열거된 돌연변이를 포함하지 않는 실시양태에서, 이러한 제2 변이체는 CDC를 증가시키는 방법과 관련하여 상기에 열거된 임의의 적합한 제2 항체의 예를 포함할 수 있다.
- [0483] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체 내의 적어도 하나의 제1 돌연변이는 상이하다.
- [0484] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM 또는 IgE 항체, 임의적으로 각각 인간 전장 항체, 예컨대 각각 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0485] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0486] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 제1 및 제2 항체가 이중특이적 항체인 실시양태에서, 항체는 각각 2개의 상이한 에피토프에 결합될 수 있다. 적어도 2개의 이중특이적 항체는 동일하거나 상이할 수 있다. 이중특이적 항체가 상이한 경우에, 조성물은 따라서 동일한 또는 상이한 표적 상의 최대 4개의 상이한 에피토프를 표적화한다.
- [0487] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 변이체, 임의의 이중특이적 항체 또는 임의의 조성물, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0488] 또한, "혼합-돌연변이체" 측면에 따른 임의의 실시양태가 임의의 조성물 실시양태에 포함될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0489] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체의 변이체는 동일한 세포 상에서 발현된 항원에 결합한다.
- [0490] 또 다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체는 K439의 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0491] 또 다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 K439E이다.
- [0492] 또 다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체는 S440의 K 및 R로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을

포함한다.

- [0493] 또 다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 S440K이다.
- [0494] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 열거된 실시양태 중 어느 하나의 제1 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 변이체 및 제2 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 변이체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0495] 제약 조성물은 통상의 기술, 예컨대 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 기재된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제 (예를 들어, 비이온성 세제, 예컨대 트윈(Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-무함유 아미노산), 보존제, 등장화제, 항산화제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 제약 조성물에 포함하기 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜)을 포함한다.
- [0496] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "비경구로 투여된"은 경장 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 투여를 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0497] 부분들의 키트
- [0498] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0499] 본 발명은 또한 모 폴리펩티드 및 모 항체의 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 모 폴리펩티드 및 모 항체의 임의의 변이체는 본원에 기재된 바와 같은 것일 수 있다. 구체적 측면 및 실시양태가 하기 기재될 것이다. 또한, 이러한 변이체는 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 수득될 수 있다.
- [0500] 한 측면에서, 본 발명은 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이며, 여기서 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 변이체는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고,
- [0501] (i) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함하며, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나,
- [0502] (ii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함하거나, 또는
- [0503] (iii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447D/E에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 해당하는 위치에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0504] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 이뮤노글로불린의 Fc 도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 항체일 수 있다.
- [0505] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439에 해당하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 S440에 해당하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/R이다.
- [0506] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서

의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서

- [0507] 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이(들)를 포함하며, 단 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 변이체의 결합을 변경시키는 임의의 추가의 돌연변이를 Fc 도메인에 함유하지 않고,
- [0508] 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 E430X, E345X, S440Y, 및 S440W, 예컨대 E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, 및 S440W에 해당하는 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0509] 제2 변이체가 본원에 기재된 임의의 열거된 돌연변이를 포함하지 않는 실시양태에서, 이러한 제2 변이체는 이펙터 기능의 방법과 관련하여 상기 열거된 임의의 적합한 제2 항체의 예를 포함할 수 있다.
- [0510] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체에서의 적어도 하나의 제1 돌연변이는 상이하다.
- [0511] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM 또는 IgE 항체, 임의적으로 각각 인간 전장 항체, 예컨대 각각 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0512] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 각각 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0513] 추가 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 제1 및 제2 항체가 이중특이적 항체인 실시양태에서, 항체는 각각 2개의 상이한 에피토프에 결합될 수 있다. 적어도 2개의 이중특이적 항체는 동일하거나 상이할 수 있다. 이중특이적 항체가 상이한 경우에, 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 부분들의 키트는 따라서 동일한 또는 상이한 표적 상의 최대 4개의 상이한 에피토프를 표적화하는 것을 포함한다.
- [0514] 추가 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 링커를 통해 독소에 접합된다.
- [0515] 추가 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 다는 융합 단백질의 부분이다.
- [0516] 또한, "혼합-돌연변이체" 측면에 따른 임의의 실시양태가 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 임의의 부분들의 키트 실시양태에 포함될 수 있음이 고려된다.
- [0517] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체의 변이체는 동일한 세포 상에서 발현된 항원에 결합한다.
- [0518] 또 다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체는 K439의 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0519] 또 다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 K439E이다.
- [0520] 또 다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체는 S440의 K 및 R로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0521] 또 다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 S440K이다.
- [0522] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 열거된 실시양태 중 어느 하나의 제1 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 변이체 및 제2 모 폴리펩티드 또는 모 항체의 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 제약 부분들의 키트에 관한 것이다.
- [0523] 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 제약 부분들의 키트는 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 요법에서의 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 제약 부분들의 키트는 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "비경구적으로 투여된"은 경장 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 투여를 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막 내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외, 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0524] 조합물
- [0525] 추가로, 본 발명은 상기 기재된 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 또는 실시양태의 변이체의 제제, 즉 다수 카피



의 변이체를 포함하는 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 기재된 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 및 실시양태의 변이체를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 이러한 "단일-돌연변이체" 변이체, 제제, 또는 조성물의 의약으로서의 용도를 제공한다.

[0526] 본 발명은 또한 하나의 변이체가 본 발명에 따른 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 하나의 변이체가 본 발명에 따른 적어도 하나의 다른 돌연변이를 포함하는 변이체의 조합 뿐만 아니라 이러한 변이체 조합의 제제 및 제약 조성물, 및 그의 의약으로서의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 2개의 변이체는 전형적으로 동일한 세포, 세포 막, 비리온 및/또는 다른 입자의 표면 상에서 발현되는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 결합한다.

[0527] 접합체

[0528] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체와 관련하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0529] 한 측면에서, 본 발명은 변이체에 관한 것이고, 여기서 상기 변이체는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 변이체는 링커를 통해 독소에 접합된다.

[0530] 한 실시양태에서, 상기 변이체는 용합 단백질의 부분이다.

[0531] 또 다른 측면에서, 본 발명의 변이체는 또 다른 분자, 예컨대 독소 또는 표지에 C-말단에서 접합되지 않는다. 한 실시양태에서, 변이체는 또 다른 분자에 또 다른 부위에서, 전형적으로 올리고머 형성을 방해하지 않는 부위에서 접합된다. 예를 들어, 항체 변이체는 독소 (방사성동위원소 포함), 전구약물 또는 약물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 다른 부위에서 연결될 수 있다. 이러한 화합물은 예를 들어 암 요법에서 표적 세포의 사멸을 보다 효과적으로 만들 수 있다. 생성되는 변이체는 따라서 면역접합체이다.

[0532] 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 치료 모이어티, 예컨대 세포독소, 화학요법 약물, 시토카인, 면역억제제, 및/또는 방사성동위원소에 연결되거나 접합된 항체를 제공한다. 이러한 접합체는 본원에서 "면역접합체" 또는 "약물 접합체"로 지칭된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 지칭된다.

[0533] 세포독소 또는 세포독성제는 세포에게 해로운 (예를 들어, 사멸시키는) 임의의 작용제를 포함한다. 본 발명의 면역접합체 형성에 적합한 치료제는 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브로민화에티딘, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 메이탄신 또는 그의 유사체 또는 유도체, 에네티다이엔 항종양 항생제, 예를 들어 네오크리노스타틴, 칼라케아마이신, 에스페라미신, 디네미신, 리다마이신, 케다르시딘 또는 그의 유사체 또는 유도체, 안트라시클린, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신, 항대사물 (예컨대, 메토크세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈, 클라드리빈), 알킬화제 (예컨대, 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부숴판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예컨대 카르보플라틴; 뿐만 아니라 듀오프로마인 A, 듀오프로마인 SA, CC-1065 (라켈마이신으로도 알려짐), 또는 CC-1065의 유사체 또는 유도체), 도라스타틴, 피롤로[2,1-c] [1,4] 벤조디아제핀 (PDB) 또는 그의 유사체, 항생제 (예컨대, 악티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 항유사분열제 (예를 들어, 튜블린-억제제), 예컨대 모노메틸 아우리스타틴 E, 모노메틸 아우리스타틴 F, 또는 도라스타틴 10의 다른 유사체 또는 유도체; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 히드록삼산 트리코스타틴 A, 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트, LAQ824, 및 파노비노스타트 뿐만 아니라 벤즈아미드, 엔티노스타트, CI994, 모세티노스타트 및 지방족산 화합물, 예컨대 페닐부티레이트 및 발프로산, 프로테아솜 억제제, 예컨대 다노프레비르, 보르테조미, 아파톡신, 예컨대  $\alpha$ -아만틴, 디프테리아 독소 및 관련 분자 (예컨대, 디프테리아 A 쇄 및 그의 활성 단편 및 하이브리드 분자); 리신 독소 (예컨대, 리신 A 또는 탈글리코실화 리신 A 쇄 독소), 콜레라 독소, 시가-유사 독소 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), LT 독소, C3 독소, 시가독소, 백일해 독소, 파상풍 독소, 대두 보우만-버크(Bowman-Birk) 프로테아제 억제제, 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 겔라닌, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII



및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(saponaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신 및 에노마이신 독소를 포함한다. 다른 적합한 접합 분자는 항미생물성/용해성 펩티드, 예컨대 CLIP, 마가이닌 2, 멜리틴, 세크로핀 및 P18; 리보뉴클레아제(RNase), DNase I, 스타필로코쿠스 장독소-A, 미국자리공 항바이러스 단백질, 디프테린 독소 및 슈도모나스 내독소를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Pastan *et al.*, Cell 47, 641 (1986) 및 Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994)]을 참조한다. 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 본 발명의 항체와 조합하여 투여될 수 있는 치료제, 예컨대 예를 들어 항암 시토카인 또는 케모카인이 또한 본 발명의 항체에 접합시키기에 유용한 치료 모이어티에 대한 후보물질이다.

[0534] 한 실시양태에서, 본 발명의 약물 접합체는 아우리스타틴 또는 아우리스타틴 펩티드 유사체 및 유도체(US5635483; US5780588)에 접합된, 본원에 개시된 바와 같은 항체를 포함한다. 아우리스타틴은 미세관 억제, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하고(Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584), 항암(US5663149) 및 항진균 활성(Pettit *et al.*, (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965)을 갖는 것으로 밝혀졌다. 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N(아미노) 말단 또는 C(말단)을 통하여, 링커를 통해 항체에 부착될 수 있다.

[0535] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 N-말단-연결된 모노메틸 아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다(문헌[Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volume 45, abstract number 623] (2004년 3월 28일에 제시됨)에 개시되고, US 2005/0238649에 기재됨)

[0536] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 MMAE(모노메틸 아우리스타틴 E)이다. 또 다른 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 MMAF(모노메틸 아우리스타틴 F)이다.

[0537] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 접합된 핵산 또는 핵산-회합된 분자를 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 접합 핵산은 세포독성 리보뉴클레아제, 안티센스 핵산, 억제 RNA 분자(예를 들어, siRNA 분자) 또는 번역자극 핵산(예를 들어, 번역자극 CpG 모티프-함유 DNA 분자)이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 압타머 또는 리보자임에 접합된다.

[0538] 한 실시양태에서, 하나 이상의 방사성표지된 아미노산을 포함하는 항체가 제공된다. 방사성표지된 변이체는 진단 및 치료 목적 둘 다를 위해 사용될 수 있다(방사성표지된 분자에 대한 접합이 또 다른 가능한 특징임). 폴리펩티드를 위한 표지의 비제한적 예는 <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, 및 <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, 및 <sup>186</sup>Re를 포함한다. 방사성표지된 아미노산 및 관련 펩티드 유도체의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Junghans *et al.*, in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2<sup>nd</sup> Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))] 및 U.S. 4,681,581, U.S. 4,735,210, U.S. 5,101,827, U.S. 5,102,990 (US RE35,500), U.S. 5,648,471 및 U.S. 5,697,902 참조). 예를 들어, 방사성 동위원소는 클로라민-T 방법에 의해 접합될 수 있다.

[0539] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 방사성동위원소 또는 방사성동위원소-함유 킬레이트에 접합된다. 예를 들어, 변이체는 항체가 방사성동위원소와 복합체를 형성하도록 허용하는 킬레이트화체 링커, 예를 들어 DOTA, DTPA 또는 티옥세탄에 접합될 수 있다. 또한, 변이체는 부가적으로 또는 대안적으로 하나 이상의 방사성표지된 아미노산 또는 다른 방사성표지된 분자를 포함하거나 이에 접합될 수 있다. 방사성표지된 변이체는 진단 및 치료 목적 둘 다를 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 알파-방출체에 접합된다. 방사성동위원소의 비제한적 예는 <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>186</sup>Re, <sup>213</sup>Bs, <sup>225</sup>Ac 및 <sup>227</sup>Th를 포함한다.

[0540] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 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, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, CD40L, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 안세스틴, 및 TNF $\alpha$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 시토카인에 접합될 수 있다.

[0541] 본 발명의 변이체는 또한 예를 들어 그의 순환 반감기를 증가시키기 위해 중합체에 대한 공유 접합에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 예시적인 중합체 및 이들을 펩티드에 부착시키는 방법은 예를 들어 US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 및 US 4,609,546에 예시되어 있다. 추가의 중합체는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리 에틸렌 글리콜(PEG)(예를 들어, 분자량이 약 1,000 내지 약 40,000, 예컨대 약 2,000 내지 약 20,000인 PEG)을 포함한다.

- [0542] 본 발명의 변이체를 접합되는 분자(들), 예컨대 상기 기재된 것에 접합시키기 위해, 문헌 [Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) 및 Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)]에 기재된 방법을 비롯하여 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 상기 변이체는 다른 모이어티를 변이체 또는 그의 단편 (예컨대, 항체 H 또는 L쇄)의 N-말단 측면 또는 C-말단 측면에 화학적으로 접합시킴으로써 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)] 참조). 또한, 이러한 접합된 변이체 유도체는 적절한 경우에 내부 잔기 또는 당에 접합시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0543] 이들 작용제는 본 발명의 변이체에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 제2 작용제의 간접적인 커플링의 하나의 예는 이중특이적 항체 내의 시스테인 또는 리신 잔기에 대한 스페이서 또는 링커 모이어티를 통한 커플링이다. 한 실시양태에서, 변이체는 스페이서 또는 링커를 통해 생체 내에서 치료 약물로 활성화될 수 있는 전구약물 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 세포내 조건 하에 절단가능하며, 이러한 링커의 절단이 항체로부터 세포내 환경에 약물 단위를 방출한다. 일부 실시양태에서, 링커는 세포내 환경에 (예를 들어, 리소솜 또는 엔도솜 또는 소포 내에) 존재하는 절단가능한 작용에 의해 절단될 수 있다. 예를 들어, 스페이서 또는 링커는, 활성 약물이 형성되는 종양-세포 회합 효소 또는 다른 종양-특이적 조건에 의해 절단될 수 있다. 이러한 전구약물 기술 및 링커의 예는 WO02083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2007089149, WO2009017394 및 WO201062171 (Syntarga BV, et al.)에 기재되어 있다. 적합한 항체-전구약물 기술 및 듀오카르마이신 유사체는 또한 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 6,989,452 (메다렉스(Medarex))에서 찾아볼 수 있다. 링커는 부가적으로 또는 대안적으로 예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하나 이에 제한되지는 않은 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커이다. 일부 실시양태에서, 펩티딜 링커는 적어도 2개의 아미노산 길이 또는 적어도 3개의 아미노산 길이이다. 절단제는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있고, 이들은 모두 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여 활성 약물을 표적 세포 내에 방출시키는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123] 참조). 구체적 실시양태에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit (발린-시트룰린) 링커 또는 Phe-Lys (페닐알라닌-리신) 링커이다 (예를 들어, US6214345 (Val-Cit 링커를 갖는 독소루비신의 합성 및 Phe-Lys 링커의 상이한 예를 기재함) 참조). Val-Cit 및 Phe-Lys 링커의 구조의 예는 하기 기재된 MC-vc-PAB, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB 또는 MC-Phe-Lys-GABA를 포함하나 이에 제한되지는 않고, 여기서 MC는 말레이미도 카프로일의 약어이고, vc는 Val-Cit의 약어이고, PAB는 p-아미노벤질카르바메이트의 약어이고, GABA는  $\gamma$ -아미노부티르산의 약어이다. 치료제의 세포내 단백질분해 방출을 이용하는 이점은 작용제가 전형적으로 접합되는 경우에 감소되고, 접합체의 혈청 안정성이 전형적으로 높다는 것이다.
- [0544] 또 다른 실시양태에서, 링커 단위는 절단가능하지 않고, 약물은 항체 분해에 의해 방출된다 (US 2005/0238649 참조). 전형적으로, 이러한 링커는 세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않다. 본원에 사용되는 바와 같이, 링커의 측면에서, "실질적으로 세포외 환경에 민감하지 않은"은 변이체 항체 약물 접합체 화합물의 샘플 내의 20% 이하, 전형적으로 약 15% 이하, 보다 전형적으로 약 10% 이하, 및 보다 더 전형적으로 약 5% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하의 링커가, 변이체 항체 약물 접합체 화합물이 세포외 환경 (예를 들어, 혈장)에 존재할 때 절단된다는 것을 의미한다. 링커가 실질적으로 세포외 환경에 민감하지 않은지의 여부는 예를 들어 변이체 항체 약물 접합체 화합물을 혈장과 함께 소정의 기간 (예를 들어, 2, 4, 8, 16 또는 24시간) 동안 인큐베이션한 후, 혈장 내에 존재하는 유리 약물의 양을 정량함으로써 결정할 수 있다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 예시적인 실시양태는 다음 구조를 갖는다 (여기서, Ab는 항체를 의미하고, 약물-부하 (또는 항체 분자당 세포증식억제 또는 세포독성 약물의 평균 개수)를 나타내는 p는 1 내지 약 8이고, 예를 들어 p는 4-6, 예컨대 3-5일 수 있거나, p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있음).
- [0545] 절단가능한 링커가 아우리스타틴과 조합된 예는 MC-vc-PAB-MMAF (또한 vcMMAF로 지칭됨) 및 MC-vc-PAB-MMAF (또한 vcMMAE로 지칭됨)를 포함하며, 여기서 MC는 말레이미도 카프로일의 약어이고, vc는 Val-Cit (발린-시트룰린) 기재 링커의 약어이고, PAB는 p-아미노벤질카르바메이트의 약어이다:
- [0546] 다른 예는 비-절단가능한 링커, 예컨대 mcMMAF (mc (MC는 이러한 문맥에서 mc와 동일함)는 말레이미도 카프로일의 약어임)와 조합된 아우리스타틴을 포함한다:
- [0547] 한 실시양태에서, 약물 링커 모이어티는 vcMMAE이다. vcMMAE 약물 링커 모이어티 및 접합 방법은 WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 및 US 11/833,028 (시애틀 제네틱스, 인크.(Seattle Genetics, Inc.)) (본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있고, vcMMAE 약물 링커 모이어티는 상기 문헌에 개시된

것과 유사한 방법을 이용하여 시스템에서 항체에 결합된다.

- [0548] 한 실시양태에서, 약물 링커 모이어티는 mcMMAF이다. mcMMAF 약물 링커 모이어티 및 접합 방법은 US7498298, US 11/833,954, 및 WO2005081711 (시애틀 제네틱스, 인크.) (본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있고, mcMMAF 약물 링커 모이어티는 상기 문헌에 개시된 것과 유사한 방법을 이용하여 시스템에서 변이체에 결합된다.
- [0549] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 이중특이적 항체가 방사성동위원소에 접합되는 것을 허용하는 킬레이트화제 링커, 예를 들어 티옥세탄에 부착된다.
- [0550] 한 실시양태에서, 변이체의 각각의 아암 (또는 Fab-아암)은 동일한 하나 이상의 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다.
- [0551] 한 실시양태에서, 변이체의 오직 하나의 아암만이 하나 이상의 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다.
- [0552] 한 실시양태에서, 변이체의 각각의 아암은 상이한 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다. 예를 들어, 변이체가 이중특이적 항체이고 본원에 기재된 바와 같은 2개의 상이한 단일특이적 항체, 예를 들어 제1 및 제2 항체의 조절된 Fab-아암 교환에 의해 제조되는 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체는 상이한 치료 모이어티와 접합되거나 회합된 단일특이적 항체를 사용하여 수득할 수 있다.
- [0553] 추가용도
- [0554] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체와 관련하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0555] 추가 측면에서, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한, 특히 표적 세포 (예를 들어, 종양, 박테리아 또는 진균 세포) 또는 표적 유기체 (예를 들어, 바이러스) 또는 박테리아 또는 바이러스 감염 세포의 CDC-매개 사멸이 요구되는 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약으로 사용하기 위한 본 발명의 변이체에 관한 것이다. 이러한 질환 및 장애의 예는 비제한적으로, 암 및 박테리아, 바이러스 또는 진균 감염을 포함한다.
- [0556] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암과 같은 질환의 치료를 위한, 본원에 기재된 변이체, 이중특이적 항체, 조성물 및 부분들의 키트에 관한 것이다.
- [0557] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는, 인간의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0558] 또 다른 측면에서, 본 발명은 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0559] "치료"는 증상 또는 질환 상태의 진정, 개선, 정지 또는 근절 (치유)을 목적으로 유효량의 본 발명의 치료 활성 화합물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0560] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과의 달성에 필요한 투여량에서 이러한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 항체의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별과 체중, 및 개체에서 항체가 목적하는 반응을 도출하는 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료상 유익한 효과가 더 큰 양이다.
- [0561] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진단 방법에 있어서 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 용도에 관한 것이다.
- [0562] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부에 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는 진단 방법에 관한 것이다.
- [0563] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부를 영상화하는데 있어서 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 용도에 관한 것이다.
- [0564] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트를 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 다른 포유동물의 신체의 적어도 일부를 영상화하는 방법에 관한 것이다.
- [0565] 이론에 제한되지 않고, 치료 활성 화합물의 유효량은 본 발명에 따른 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 또는 실시

양태가 상기 치료 활성 화합물에 도입될 때 감소될 수 있다.

- [0566] 암 항체에 대한 적합한 항원은 본원에 기재된 바와 같은 것과 동일할 수 있다. 실시예 15 내지 18은 종양 세포의 증진된 및/또는 보다 특이적 보체 활성화 또는 CDC를 제공하기 위한 구체적인 적용을 설명한다. 예를 들어, "단일-돌연변이체" 측면에 따른 항-종양 항체 (예를 들어, E345R 돌연변이 포함)는 종양 세포의 증진된 CDC 또는 ADCC, ADCC 반응을 제공할 수 있다. 또한, 이러한 방법의 변이체에서, "단일-돌연변이체" 측면에 따른 돌연변이, 예컨대 예를 들어 E345R, E430, 또는 S440S/W, 또는 표 1에 열거된 바와 같은 임의의 다른 돌연변이가 각각의 항체에 부가되어, 적어도 2개의 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 특이적으로 지시된 증진된 CDC 및/또는 ADCC 반응을 제공할 수 있다.
- [0567] 박테리아 감염을 위해 적합한 항체는 비제한적으로 에스. 아우레우스를 표적화하는 것, 예컨대 키메라 모노클로날 IgG1 파기박시맵 (BSYX-A110; 바이오시넥서스(Biosynexus)), 스타필로코쿠스의 세포벽에 포매된 리포테이코산 (LTA)을 표적화하는 것, 및 문헌 [Baker (Nat Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1491-3) 및 Weisman et al. (Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44)] (둘 다 그의 전문이 참조로 포함됨)에 기재된 것을 포함한다. 실시예 14는 E345R 돌연변이를 포함하는 에스. 아우레우스 항체 변이체를 사용하는 구체적 실시양태를 기재한다. 그러나, E430G 및 S440W를 포함하나 이에 제한되지는 않은, 표 1의 다른 돌연변이가 박테리아 항원에 대한 항체의 CDC-매개 능력을 증진시키기 위해 유사한 방식으로 적용될 수 있다.
- [0568] 바이러스 또는 진균 감염에 대한 적합한 항원은 본원에 기재된 임의의 것일 수 있다.
- [0569] 한 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 인간 EphA2가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 변이체는 인간 EphA2 mAb 12G3H11 (그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Dall'Acqua et al., 상기 문헌]에 기재됨)로부터 유래되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 IL-9가 아니다. 또 다른 실시양태에서, 변이체는 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO2007005612에 기재된 Fa-hG1 또는 Fa-hG4 항체, 또는 그의 임의의 변이체로부터 유래되지 않는다. 한 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 HIV-1 gp120이 아니다. 또 다른 실시양태에서, 변이체는 gp120에 대해 지시된 b12 인간 IgG1κ 항체로부터 유래되지 않는다.
- [0570] 특정한 실시양태에서, 변이체는 이중특이적 모 항체로부터 유래한다. 이중특이적 항체는 임의의 이소형, 예컨대 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있고, 전장 항체 또는 그의 Fc-함유 단편일 수 있다. 이중특이적 항체의 예시적인 제조 방법은 WO 2008/119353 (첼맵)에 기재되어 있다.
- [0571] 투여량
- [0572] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체와 관련하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 항체에 대한 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료할 질환 또는 상태에 따라 달라지며, 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 항체의 치료 유효량에 대한 예시적인 비-제한적 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.
- [0573] 본 발명의 항체 변이체는 또한 변이체의 치료 효능 증진 및/또는 보체 소비의 보충을 위해 하나 이상의 보체 인자 또는 관련 성분과 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 보체 인자 및 관련 성분은 C1q, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, MBL, 및 인자 B를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 조합 투여는 동시, 개별 또는 순차적일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본 발명은 사용 지침서와 함께, 본 발명의 변이체, 및 적어도 하나의 보체 인자 또는 관련 성분을 동일한 또는 상이한 제약 조성물에 포함하는 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0574] 본 발명의 항체 변이체는 또한 조합 요법으로, 즉 치료할 질환 또는 상태와 관련된 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체-함유 의약품은 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제 또는 항혈관신생제와 조합하기 위한 것이다. 이러한 조합 투여는 동시, 개별 또는 순차적일 수 있다.
- [0575] 추가 실시양태에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 변이체 또는 제약 조성물을 방사선요법 및/또는 수술과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 질환, 예컨대 암을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0576] 제조 방법
- [0577] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체와 관련하여 본원에 기재된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-



도메인 및 결합 영역을 포함하는 다른 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 적용가능할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

- [0578] 본 발명은 또한 상기 기재된 측면 중 어느 하나에 따른 변이체를 코딩하는 단리된 핵산 및 벡터 뿐만 아니라 변이체를 코딩하는 벡터 및 발현 시스템을 제공한다. 항체 및 그의 변이체에 대한 적합한 핵산 구축물, 벡터 및 발현 시스템은 관련 기술분야에 공지되어 있고 실시예에 기재되어 있다. 변이체가 중쇄 (또는 그의 Fc-함유 단편) 뿐만 아니라 경쇄도 포함하는 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 동일한 또는 상이한 핵산 또는 벡터 상에 존재할 수 있다.
- [0579] 본 발명은 또한
- [0580] a) 상기 기재된 측면 중 어느 하나에 따른 항체 변이체의 적어도 중쇄의 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 구축물을 제공하는 단계,
- [0581] b) 상기 뉴클레오타이드 구축물을 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및
- [0582] c) 상기 항체 변이체를 상기 숙주 세포의 세포 배양물로부터 회수하는 단계를 포함하는, 상기 기재된 측면 중 어느 하나에 따른 항체 변이체를 숙주 세포에서 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 변이체는 적어도 중쇄의 Fc 영역을 포함한다.
- [0583] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 항체이다. 그러나, 대부분의 실시양태에서, 항체는 또한 경쇄를 함유할 것이고, 따라서 상기 숙주 세포는 또한 동일한 또는 상이한 벡터 상의 경쇄-코딩 구축물을 발현한다.
- [0585] 항체의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야에 공지되어 있고, CHO, HEK-293, PER-C6, NS/O 및 Sp2/O 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 단백질의 Asn-연결 글리코실화가 가능한 세포, 예를 들어 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포이다. 추가 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 인간-유사 또는 인간 글리코실화를 갖는 당단백질을 생산하도록 유전자 조작된 비-인간 세포이다. 이러한 세포의 예는 유전자-변형된 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) 및 유전자-변형된 램나 미노르(*Lemna minor*) (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597)이다.
- [0586] 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 항체 중쇄로부터 C-말단 리신 K447 잔기를 효율적으로 제거할 수 없는 숙주 세포이다. 예를 들어, 문헌 [Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426] (본원에 참조로 포함됨)의 표 2는 다수의 이러한 항체 생산 시스템, 예를 들어 Sp2/O, NS/O 또는 트랜스제닉 유선 (염소)을 열거하고 있으며, 여기서 오직 C-말단 리신의 부분적 제거가 얻어진다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포이다. 이러한 세포는 관련 기술분야에 기재되어 있고, 본 발명의 변이체를 발현하여 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하기 위한 숙주 세포로 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1], 뿐만 아니라 EP1176195; WO03/035835; 및 WO99/54342를 참조한다. 조작된 글리코형을 생성하기 위한 추가의 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 문헌 [Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473], US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; 포텔리젠트(Potelligent)<sup>TM</sup> 기술 (바이오와 인크.(Biowa, Inc.), 뉴저지주 프린스턴); 글리코맵(GlycoMab)<sup>TM</sup> 글리코실화 조작 기술 (GLYCART 바이오테크놀로지 아게(GLYCART biotechnology AG), 스위스 취리히); US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49]에 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0587] 본 발명은 또한 상기 기재된 본 발명의 방법에 의해 수득된 또는 수득될 수 있는 항체에 관한 것이다.
- [0588] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 변이체를 생산할 수 있는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 본 발명의 뉴클레오타이드 구축물로 형질전환 또는 형질감염된 것이다.
- [0589] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 추가의 제한으로 간주되지 않아야 한다.
- [0590] 실시예
- [0591] 실시예 1
- [0592] 7D8 돌연변이체의 설계 및 생성



- [0593] 인간 모노클로날 항체 HuMab-7D8 (WO 2004/035607에 기재됨)을 모델 항체로 사용하였다. 이것은 오파투무맙 (HuMax-CD20, 2F2)을 비롯한 인간 항-CD20 IgG1 항체의 군에 속한다. 이러한 항체는 CD20 분자 상의 특유한 막-근위 에피토프를 표적으로 하고, 강한 CDC를 나타낸다.
- [0594] 보체 활성화 및 CDC에서 올리고머 Fc-Fc 상호작용의 기능적 관련성을 시험하기 위해, Fc:Fc 인터페이스에서의 소수성 패치 내의 아미노산을 7D8의 Fc-Fc 측면 상의 상호작용 및 CDC 효능을 잠재적으로 파괴하도록 돌연변이시켰다. 제1 세트의 돌연변이체 (표 3)에서, 1HZH 결정 구조에 기초하여 선택된 위치에서 전하를 변화시키기 위해 돌연변이를 도입하였으며, CH2-CH3 도메인에서 소수성 패치 내에 노출된 것으로 기재되었다 (Burton Mol Immunol 1985 Mar;22(3):161-206).
- [0595] 제1 세트의 돌연변이로부터, I253D 및 H433A가 7D8에 의한 CDC의 상실에 대해 가장 강한 효과를 유도하는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 실시예 5). 1HZH 결정 구조는 I253 및 H433이 쌍별 항체의 대향하는 Fc 위치 상의 2개의 상이한 포켓에 결합한다는 것을 보여준다. 이들 데이터에 기초하여, CDC에 대한 Fc:Fc 측면 상의 인터페이스에서 잔기의 중요성을 추가로 연구하기 위해 결정 구조 내에서 I253 및 H433 위치 주위에 제2 세트의 돌연변이를 합성하였다. Fc:Fc 인터페이스 및 결과적으로 CDC를 잠재적으로 탈안정화시키는 I253 및 H433 위치 주위의 제2 세트의 돌연변이를 표 4에 열거한다.
- [0596] C1q에 대한 직접 결합 부위의 파괴가 CDC에 대한 관찰된 효과의 원인이 될 가능성을 배제하기 위해, CDC 상실을 보여준 2개의 단일 돌연변이체에 기초하여 이중 돌연변이체를 생성하여 단일 돌연변이체에 의한 CDC의 상실을 회복하는 그의 능력을 시험하였다. 이러한 원리가 도 1d에 개략적으로 도시된다. 이중 돌연변이체를 표 5에 열거하고, 구조적 표현을 도 4 및 도 5에 제시한다.
- [0597] 퀵체인지(Quikchange) 부위-지정 돌연변이유발 키트 (스트라타진(Stratagene), 미국)를 사용하여 돌연변이체를 제조하였다. 간략하게, 목적하는 돌연변이를 코딩하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, IgG1m(f) 동종이형을 갖는 7D8 중쇄를 코딩하는 전장 플라스미드 DNA 주형을 복제하였다. 생성된 DNA 혼합물을 DpnI를 사용하여 소화시켜 공급원 플라스미드 DNA를 제거하고, 이. 콜라이를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 생성된 콜로니로부터 단리된 돌연변이체 플라스미드 DNA를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다 (아고바(Agowa), 독일). 항체의 중쇄 및 경쇄를 둘 다 코딩하는 플라스미드 DNA 혼합물을 본질적으로 제조업체에 의해 기재된 바와 같이 293펙틴 (인비트로젠(Invitrogen), 미국)을 사용하여 프리스타일(Freestyle) HEK293F 세포 (인비트로젠, 미국)에 일시적으로 형질감염시켰다.

[0598] [표 3]

7D8의 CH2-CH3 도메인에 도입된 세트 1 돌연변이.

| 돌연변이  | WT aa<br>전하 | 돌연변이체<br>aa 전하 |
|-------|-------------|----------------|
| I253D | =           | -              |
| I253Y | =           | =              |
| I253A | =           | =              |
| Q311A | =           | =              |
| H433A | δ+          | =              |
| N434A | =           | =              |
| H435A | Δ+          | =              |
| H435R | δ+          | +              |

(=) 전하 없음

(-) 음전하

(+) 양전하

(δ+) 부분적 양전하

[0599]

[0600] [표 4]

7D8의 CH2-CH3 도메인에 도입된 세트 2 돌연변이.

| 돌연변이(들)     | WT aa<br>전하 | 돌연변이체<br>aa 전하 |
|-------------|-------------|----------------|
| I253K       | =           | +              |
| I253R       | =           | +              |
| I253D/H433A | = / δ+      | - / =          |
| H310E       | δ+          | -              |
| H310R       | δ+          | +              |
| H310K       | δ+          | +              |
| Q311K       | =           | +              |
| K322A       | +           | =              |
| E345R       | -           | +              |
| E382R       | -           | +              |
| G385D       | =           | -              |
| H433D       | δ+          | -              |
| H433R       | δ+          | +              |
| Y436C       | =           | =              |
| Y436D       | =           | -              |
| Q438D       | =           | -              |
| K439E       | +           | -              |
| S440K       | =           | +              |

(=) 전하 없음  
(-) 음전하  
(+) 양전하  
(δ+) 부분적 양전하

[0601]

[0602] [표 5]

각각 CDC의 상실을 보여주는 2개의 단일 돌연변이를  
조합하기 위해 7D8의 CH2-CH3 도메인에 도입된  
이중 돌연변이

| 돌연변이        | WT aa<br>전하 | 돌연변이체<br>aa 전하 |
|-------------|-------------|----------------|
| K439E/S440K | + / =       | - / +          |

(=) 전하 없음  
(-) 음전하  
(+) 양전하

[0603]

[0604] 실시예 2

[0605] 7D8 돌연변이체에 의한 세포 상의 CD20 결합

[0606] CD20-양성 세포에 대한 정제된 항체 샘플의 결합을 FACS 분석에 의해 분석하였다. 제1 세트의 돌연변이 (표 3)를 Daudi 세포에서 시험하고, 제2 세트의 돌연변이 (표 4)를 Raji 세포에서 시험하였다. 10<sup>5</sup>개의 세포를 4℃에서 30분 동안 RPMI1640/0.1% BSA 내에서 항체 제제의 연속 희석액 (Daudi 상에서 제1 세트에 대해 3배 희석으로 0.04 내지 10 μg/mL 범위, 및 Raji 상에서 제2 세트에 대해 3배 희석으로 0.003 내지 10 μg/mL 범위)과 함께 폴리스티렌 96-웰 둥근-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner bio-one) 650101)에서 50 μL로 인큐베이션하였다. RPMI1640/0.1% BSA 내에서 2회 세척한 후에, 세포를 4℃에서 30분 동안 이차 항체와 함께 100 μL로 인큐베이션하였다. 이차 항체로서, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-접합된 토끼-항-인간 IgG (F0056, 다코(Dako, 덴마크 글로스트롭); 1/100)를 Daudi 세포에 대한 모든 실험에서 및 7D8 항체를 사용하는 Raji 세포에 대한 실험에서 사용하였다. 정제된 7D8 항체를 사용하는 Raji 세포에 대한 실험에 대해, R-피코에리트린 (R-PE)-접합된 염소 F(ab')<sub>2</sub> 항-인간 카파 경쇄 (2062-09, 서던바이오테크(SouthernBiotech); 1/500)를 이차 항체로 사용하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에서 2회 세척하고, 100 μL PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 채현탁하고, FACS 칸톨(FACS Cantoll) (BD 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) V5.01 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software, 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 이용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 이용하여 분석

하였다.

[0607] Daudi 세포에 대한 7D8 항체의 결합은 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 영향을 받지 않았고, 모든 시험된 돌연변이체 및 야생형 7D8에 대해 동일하였다. 또한, Raji 세포에 대한 7D8 항체의 결합은 E345R을 제외하고는 야생형 7D8과 비교하여 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 유의하게 영향을 받지 않았다. 0.3 µg/mL를 초과하는 시험 농도에서 CD20-양성 Raji 세포 상에서 IgG1-7D8-E345R의 감소된 결합이 검출되었다. 또한 H433D 및 H433R에 대해, 시험된 최고 항체 농도 (10 µg/mL)에서 감소된 결합이 검출되었다. IgG1-7D8-E345R, H433D 및 H433R에 의한 감소된 결합은 이차 항체의 에피토프의 차폐에 의해 설명될 수 있고, 이것은 E345R 및 H433R의 직접 표지가 Daudi 세포에 대한 유사한 또는 심지어 증가된 결합을 생성시키기 때문이다. 증가된 결합력은 야생형 IgG1-7D8과 비교하여 E345R 및 H433R에 의한 증가된 Fc-Fc 측면 상의 결합에 의해 설명될 수 있다.

[0608] K439E 및 S440K 돌연변이의 조합은 Raji 세포에 대한 7D8 항체의 결합에 영향을 미치지 않았고, 단일 돌연변이체 및 야생형 7D8과 동일하였다.

### [0609] 실시예 3

#### [0610] 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 결합 ELISA

[0611] 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 결합을 ELISA에서 시험하였으며, 여기서 정제된 항체를 플라스틱 표면 상에 코팅하고, 이는 랜덤 항체 다량체화를 일으켰다. 모든 인간 혈청을 C1q의 공급원으로 사용하였다.

[0612] 96-웰 마이크로론(Microlon) ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)를 PBS 중 항체의 연속 희석액 (1.5배 희석으로 0.58-10.0 µg/mL 범위)으로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 세척하고, 0.025% 트윈 20 및 0.1% 젤라틴을 보충한 200 µL/웰 0.5x PBS로 차단하였다. 인큐베이션 사이에 세척하면서, 플레이트를 3% 모은 인간 혈청 (상퀀(Sanquin), 제품# M0008)과 1시간 동안 37℃에서, 100 µL/웰 토끼 항-인간 C1q (다코, 제품# A0136, 1/4,000)와 1시간 동안 RT에서, 및 검출 항체로서 100 µL/웰 돼지 항-토끼 IgG-HRP (다코, P0399, 1:10,000)과 1시간 동안 RT에서 순차적으로 인큐베이션하였다. 1 mg/mL 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)을 사용하여 약 30분 동안 발색시켰다. 100 µL 2% 옥살산의 첨가에 의해 반응을 중지시켰다. 흡광도를 405nm에서 마이크로플레이트 판독기 (비오텍(Biotek), 버몬트주 위누스키)에서 측정하였다. log 변환된 데이터는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응 곡선을 피팅함으로써 계산하였다. 돌연변이체의 EC<sub>50</sub> 값을 야생형 IgG1-7D8에 대해 플레이트마다 정규화하고, 모든 야생형 IgG1-7D8 데이터의 평균을 곱하였다.

[0613] 도 6 및 표 6에 제시된 바와 같이, 시험된 점 돌연변이는 ELISA에 의해 측정할 때 C1q 결합에 대해 최소의 효과를 가졌다. IgG1-7D8-I253D 돌연변이체에 대해, 다소 덜 효율적인 C1q 결합이 ELISA에서 측정되었다 (보다 높은 EC<sub>50</sub> 값). 코팅 효능을 모든 항체에 대해 시험하였고, 모든 항체에 대해 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0614] [표 6]

ELISA에서의 C1q 결합에 대한 EC<sub>50</sub>

| 항체             | 평균 EC <sub>50</sub><br>(µg/mL) <sup>1</sup> | SD <sup>1</sup> | 유의성 <sup>2</sup> |
|----------------|---|-----------------|------------------|
| IgG1-7D8-WT    | 2.048                                       | 0               | Na               |
| IgG1-7D8-I253D | 3.838                                       | 1.341           | *                |
| IgG1-7D8-I253Y | 2.209                                       | 0.385           | Ns               |
| IgG1-7D8-I253A | 2.556                                       | 0.187           | Ns               |
| IgG1-7D8-Q311A | 2.182                                       | 0.062           | ns               |
| IgG1-7D8-H433A | 3.327                                       | 1.719           | ns               |
| IgG1-7D8-N434A | 2.120                                       | 0.492           | ns               |
| IgG1-7D8-H435A | 2.267                                       | 0.317           | ns               |
| IgG1-7D8-H435R | 1.242                                       | 0.492           | ns               |

<sup>1</sup> 평균 및 SD는 3회 이상의 실험으로부터 계산하였다.

<sup>2</sup> 통계: 던넷 다중 비교 시험 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하는 log 변환된 데이터에 대한 1원 ANOVA. 유의성은 야생형 IgG1-7D8과 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (ns) 유의하지 않음 (\*) p=0.01 내지 0.05 (\*\*) p=0.001 내지 0.01 (\*\*\*) p<0.001.

[0615]

### [0616] 실시예 4

#### [0617] 7D8 돌연변이체에 의한 세포 상의 C1q 결합

[0618] 플라스틱 표면 상에 항체를 코팅시켜 항체 결합 및 Fc-꼬리 제시의 인공 정적 시스템을 생성시킨다. 따라서, 보체 결합을 또한 세포-기반 검정에서 시험하였고, 여기서 항체-옵소닌화 CD20-양성 B 세포에 대한 C1q 결합을

FACS 분석에 의해 측정하였다. 세트 1 돌연변이체를 사용한 실험에서, Daudi 또는 Raji 세포를 얼음 상에서 10% FBS를 포함하는 90  $\mu$ L RPMI 1640 배지에 현탁시켰다 ( $2 \times 10^6$  개 세포/mL). 10  $\mu$ L의 일련의 농도의 C1q (컴플리먼트 테크놀로지스(Complement Technologies), 텍사스주 타일러)를 첨가하였다 (최종 농도 범위는 최대 결합에 따라 0-60  $\mu$ g/mL 및 0-140  $\mu$ g/mL에서 달라짐). 이어서, 10  $\mu$ L의 정제된 항체 (10  $\mu$ g/mL 최종 농도, 즉, 포화 조건)를 첨가하고, 반응 혼합물을 즉시 37°C 수조에 옮기고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세트 2 돌연변이체를 사용한 실험에서, 시험 mAb를 Daudi 세포에 대량으로 첨가한 후, 가변 농도의 C1q를 분취액에 첨가하고, 혼합물을 상기 기재된 바와 같이 인큐베이션하였다. 세포를 PBS/1% BSA로 3회 세척하고, 30분 동안 실온에서 토끼 FITC-표지된 항-C1q 항체 (다코사이토메이션 (DakoCytomation), 10  $\mu$ g/mL)와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 PBS/1% BSA로 세척하고, PBS 내에 재현탁하거나 PBS 중의 2% 포름알데히드 내에 고정하였다. 유동 세포측정법을 FACS칼리버(FACSCalibur) 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언시스) 상에서 수행하고, 평균 형광 강도를 교정된 비드 (스페로테크(Spherotech))를 사용하여 당량 가용성 형광의 분자 (MESF)로 전환시켰다. 지시된 7D8 항체로 옅소닌화 CD20-양성 세포에 대한 C1q의 결합에 대한 해리 상수 ( $K_D$  값)는 시그마플롯(SigmaPlot)® 소프트웨어 (시스템 소프트웨어 인크.(Systat Software Inc.), 워싱턴)를 사용하여 계산하였다. 평균  $K_D$  값은 반복된 결합 실험으로부터 계산하고 (Daudi 세포 상에서 4회, Raji 세포 상에서 3회), 야생형 7D8로 옅소닌화된 세포 상의 C1q 결합에 대한  $K_D$  값에 비교하였다 (표 7 및 표 8).

[0619] 세트 1 돌연변이체를 Daudi 및 Raji 세포 둘 다에서 시험하였고, 동일한 결과를 얻었다. C1q ELISA 결과와 반대로, 대부분의 시험된 돌연변이체는 항체-옅소닌화된 Daudi (표 7A) 및 Raji 세포 (표 8) 둘 다에서 감소된 C1q 결합력 (증가된  $K_D$ )을 나타내었다. 야생형 7D8과 비교하여, IgG1-7D8-Q311A 및 H435A는 거의 내지 전혀 감소를 나타내지 않았고, I253A, I253Y 및 N434A는 보다 확연한 감소를 나타내었으며, I253D 및 H433A는 옅소닌화된 Daudi 또는 Raji 세포 상에서 C1q 결합력에서 매우 극적인 감소를 나타내었다. IgG1-7D8-H435R은 두 세포 유형 상에서 C1q 결합에 대해 야생형 7D8보다 다소 더 높은 결합력 (더 낮은  $K_D$ )을 나타내었지만, 유의하지 않았다.

[0620] 세트 2 돌연변이체를 Daudi 세포 상에서 시험하였다. 야생형 7D8과 비교하여, IgG1-7D8-E345R, E382R 및 H433R은 보다 낮은  $K_D$  값에 의해 반영된, 옅소닌화된 Daudi 세포 상에서 증가된 결합력을 나타내었다 (표 7B). 다른 모든 세트 2 돌연변이체는 야생형 7D8과 비교하여 감소된 결합력을 나타내었으며, 여기서 G385D, Y436D, Q438D, K439E 및 S440K는 급격하게 증가된  $K_D$  값을 나타내고 (표 7B), H433D 및 Y436C는 신뢰할만한  $K_D$  값이 측정될 수 없는 정도로 급격하게 감소된 결합을 나타내었다.

[0621] 이중 돌연변이체 IgG1-7D8-K439E/S440K는 항체-옅소닌화된 Daudi 세포 상에서 회복된 C1q 결합을 나타내는 반면, 양쪽 단일 돌연변이체는 야생형 7D8과 비교하여 감소된 C1q 결합을 나타내었다. K439E/S440K 이중 돌연변이체의 결합력은 야생형 7D8과 비교하여 다소 증가하였다 (표 7C). 단일 돌연변이체 IgG1-7D8-K439E 및 IgG1-7D8-K440E의 혼합물은 C1q 결합을 완전히 회복할 수 있었고, 이것은 야생형 7D8의 C1q 결합에 대등하였다 (표 7C).

[0622] ELISA에서 변화되지 않은 C1q 결합 (실시예 3) 및 IgG1-7D8 돌연변이체에 의해 세포-기반 검정에서 영향을 받은 C1q 결합 사이의 불일치는 항체 분자들 사이의 Fc:Fc 상호작용에 관여하는 시험된 CH3 위치가 C1q 결합에 직접 영향을 미치지 않지만, 세포 상에서 결합될 때 항체 Fc-꼬리의 동적 위치배정에 영향을 미치고, 그에 의해 또한 C1q 결합의 강도에 영향을 미치는 중요한 결정인자임을 보여준다.

[0623] [표 7A]

항체-옵소닌화 Daudi 세포에의 C1q 결합에 대한  $K_D$  값 (돌연변이체 세트 1)

| mAb       | $K_D$ (nM)<br>Exp.1 | $K_D$ (nM)<br>Exp.2 | $K_D$ (nM)<br>Exp.3 | $K_D$ (nM)<br>Exp.4 | $K_D$ (nM)<br>Exp. 10 | $K_D$ (nM)<br>Exp. 11 | 평균<br>$K_D$ (nM) | sd   | P-값*   |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------|--------|
| 7D8       | 7.7                 | 9.3                 | 4.2                 | 4.3                 | 11.8                  | 13.3                  | 8.4              | 3.7  | na**   |
| 7D8-I253A | 33.0                | 20.4                | 16.7                | 15.7                |                       |                       | 21.5             | 8.0  | 0.007  |
| 7D8-I253Y | 58.5                | 37.0                | 21.1                | 48.7                |                       |                       | 41.3             | 16.1 | 0.001  |
| 7D8-I253D | 146.5               | 176.1               | 101.7               | 205.2               |                       |                       | 157.4            | 44.2 | <0.001 |
| 7D8-Q311A | 14.3                | 13.0                | 9.6                 | 5.9                 |                       |                       | 10.7             | 3.8  | 0.379  |
| 7D8-H433A | 168.0               | 76.1                | 45.2                | 180.7               |                       |                       | 117.5            | 67.0 | 0.003  |
| 7D8-N434A | 36.7                | 47.8                | 28.3                | 48.7                |                       |                       | 42.6             | 9.7  | <0.001 |
| 7D8-H435A | 7.8                 | 10.9                | 5.0                 | 10.9                |                       |                       | 8.6              | 2.8  | 0.925  |
| 7D8-H435R | 5.2                 | 8.7                 | 2.6                 | 3.0                 |                       |                       | 4.9              | 2.8  | 0.147  |

\* 야생형 7D8에 비교함 (t-시험)

\*\* (na) 적용가능하지 않음

[0624]

[0625] [표 7B]

항체-옵소닌화 Daudi 세포에의 C1q 결합에 대한  $K_D$  값 (돌연변이체 세트 2)

| mAb             | $K_D$ (nM)<br>Exp.5 | $K_D$ (nM)<br>Exp.6 | $K_D$ (nM)<br>Exp.7 | $K_D$ (nM)<br>Exp.8 | $K_D$ (nM)<br>Exp.9 | $K_D$ (nM)<br>Exp.10 | $K_D$ (nM)<br>Exp.11 | 평균<br>$K_D$ (nM) | sd   | P-값*     |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------|------|----------|
| 오파루무맙           | 6                   | 5.4                 | 4                   | 2.7                 | 12.47               | 12.8                 |                      | 7.2              | 4.3  | 0.6192   |
| 7D8             |                     |                     |                     |                     |                     | 11.8                 | 13.3                 | 8.4***           | 3.7  | na**     |
| 7D8-H310K       | 32.4                |                     |                     |                     |                     |                      | 216                  | 124              | 130  | 0.0371   |
| 7D8-E345R       | 3.5                 |                     | 0.17                | 0.35                |                     | 2.7                  |                      | 1.7              | 1.7  | 0.0106   |
| 7D8-E382R       |                     | 3.5                 | 1.18                | 1.13                |                     | 3.3                  |                      | 2.3              | 1.3  | 0.0150   |
| 7D8-G385D       |                     | 77                  |                     |                     |                     |                      | 71                   | 74               | 4    | < 0.0001 |
| 7D8-H433D****   |                     | (1227)              |                     |                     |                     |                      | (2694)               | (1961)           | 1037 | 0.0013   |
| 7D8-H433R       |                     | 5.2                 | 0.72                | 1.78                | 5.69                | 1.6                  |                      | 3                | 2.3  | 0.0205   |
| 7D8-Y436C****   | (2420)              |                     |                     |                     |                     |                      | (128)                | (1274)           | 1621 | 0.0576   |
| 7D8-Y436D       |                     | 431                 |                     |                     |                     |                      | 504                  | 468              | 52   | < 0.0001 |
| 7D8-Q438D       | 767                 |                     |                     |                     |                     |                      | 667                  | 717              | 70   | < 0.0001 |
| 7D8-K439E       |                     | 418                 |                     |                     |                     |                      | 304                  | 361              | 81   | < 0.0001 |
| 7D8-S440K       |                     | 170                 |                     |                     |                     |                      | 48                   | 109              | 87   | 0.0131   |
| 7D8-I253D/H433A |                     | 10316 <sup>1</sup>  |                     |                     |                     |                      | 246                  | 5291             | 7106 | 0.0681   |

\* 야생형 7D8에 비교함 (t-시험)

\*\* (na) 적용가능하지 않음

\*\*\* 7D8의 평균  $K_D$ 는 실험 1, 2, 3, 4, 10 및 11로부터 계산하였다.

\*\*\*\* 이들 돌연변이체의 너무 약한 결합으로 인해 신뢰할만한 핏팅 곡선 및  $K_D$  값을 측정할 수 없었다.

[0626]

[0627] [표 7C]

항체-옵소닌화 Daudi 세포에의 C1q 결합에 대한  $K_D$  값 (이중 돌연변이체)

| mAb                       | $K_D$ (nM)<br>Exp.5 | $K_D$ (nM)<br>Exp.6 | $K_D$ (nM)<br>Exp.7 | $K_D$ (nM)<br>Exp.8 | $K_D$ (nM)<br>Exp.9 | $K_D$ (nM)<br>Exp.10 | $K_D$ (nM)<br>Exp.11 | 평균<br>$K_D$ (nM) | sd  | P-값*     |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----|----------|
| 7D8                       |                     |                     |                     |                     |                     | 11.8                 | 13.3                 | 8.4***           | 3.7 | na**     |
| 7D8-K439E                 |                     | 418                 |                     |                     |                     |                      | 304                  | 361              | 81  | < 0.0001 |
| 7D8-S440K                 |                     | 170                 |                     |                     |                     |                      | 48                   | 109              | 87  | 0.0131   |
| 7D8-K439E/S440K           |                     | 4.6                 | 1.63                | 1.01                |                     | 2.9                  |                      | 2.6              | 1.6 | 0.0196   |
| 7D8-K439E + 7D8-S440K 혼합물 |                     | 3.6                 | 3.05                |                     |                     | 3.1                  |                      | 3.3              | 0.3 | 0.0555   |

\* 야생형 7D8에 비교함 (t-시험)

\*\* (na) 적용가능하지 않음

\*\*\* 7D8의 평균  $K_D$ 는 실험 1, 2, 3, 4, 10 및 11로부터 계산하였다.

[0628]



[0629] [표 8]

항체-옵소닌화 Raji 세포에의 C1q 결합에 대한  $K_D$  값 (돌연변이체 세트 1)

| mAb       | $K_D$ (nM)<br>Exp.1 | $K_D$ (nM)<br>Exp.2 | $K_D$ (nM)<br>Exp.3 | 평균<br>$K_D$ (nM) | sd   | P- 값*  |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|------|--------|
| 7D8       | 4.8                 | 7.0                 | 10.9                | 6.5              | 3.1  | na**   |
| 7D8-I253A | 10.0                | 25.7                | 20.1                | 18.6             | 7.9  | 0.020  |
| 7D8-I253Y | 24.3                | 45.6                | 46.2                | 38.7             | 12.4 | 0.001  |
| 7D8-I253D | 70.0                | 172.0               | 85.2                | 109.1            | 55.0 | 0.005  |
| 7D8-Q311A | 4.1                 | 10.1                | 12.2                | 9.1              | 3.5  | 0.280  |
| 7D8-H433A | 124.8               | 85.0                | 84.0                | 97.9             | 23.3 | <0.001 |
| 7D8-N434A | 35.9                | 46.7                | 35.2                | 44.9             | 12.5 | <0.001 |
| 7D8-H435A | 5.4                 | 9.9                 | 6.6                 | 7.3              | 2.3  | 0.721  |
| 7D8-H435R | 3.5                 | 6.2                 | 4.5                 | 4.7              | 1.4  | 0.721  |

\* 야생형 7D8에 비교함 (t-시험)

\*\* (na) 적용가능하지 않음

[0630]

[0631] 실시예 5

[0632] CDC20-양성 Raji 세포에 대한 CDC 검정에서 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 효능

[0633] IgG1-7D8 돌연변이체로 옵소닌화된 세포를 사용한 C1q 효능을 CDC 활성에 대한 C1q 결합력에서 관찰된 변화의 영향을 조사하기 위해 CDC 검정에서 시험하였다. 따라서, CDC 검정은 일련의 정해진 농도의 C1q를 보충한 C1q-고갈된 정상 인간 혈청을 사용하여 수행하였다.  $0.1 \times 10^6$  개의 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트 (Nunc, 뉴욕주 로체스터))에서  $10 \mu\text{g/mL}$ 의 정제된 항체 및 일련의 농도의 인간 C1q (0.005, 0.025, 0.1, 0.3, 1.0, 5.0,  $30.0 \mu\text{g/mL}$ )와 RT에서 15분 동안 0.1% BSA를 보충한 RPMI1640 배지 내에서  $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 예비-인큐베이션하였다. 이어서,  $25 \mu\text{L}$ 의 C1q-고갈된 혈청 (퀴델(Quidel, 캘리포니아주 샌디에고))을 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 수조 내에서 30분 동안 또는 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 샘플을 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 세포 용해는 아이오딘화프로피듐 (PI, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich, 네덜란드 쾰브트레흐트)) 생존 세포 배제 검정을 이용하여 FACS에서 결정하였다. 용해 %는 다음과 같이 결정하였다: 용해 % = (PI pos 세포의 수/세포의 총 수)  $\times$  100%.

[0634]  $30 \mu\text{g/mL}$  C1q의 존재 하의 야생형 7D8에 의한 용해에서 C1q를 첨가하지 않은 경우의 용해를 뺀 것을 100%로 설정하였다.  $\text{CH}_{50}$  값 (50% 용해를 유발하는 C1q 농도)을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 log-변환된 데이터 상에서 S자형 용량-반응 곡선을 피팅하여 계산하였다. 돌연변이체의  $\text{CH}_{50}$  값을 야생형 7D8에 대해 정규화하였다 (표 9).

[0635] 표 9의 데이터는 C1q 결합력 측정에 따라 IgG1-7D8-Q311A, E382R 및 H435A는 C1q 효능에서 감소를 보이지 않고; I253A, I253Y, G385D, N434A 및 Y436C는 C1q-효능에서 유의한 감소를 보이고; I253D, H310K, K322A, H433A, H433D, Y436D, Q438D, K439E 및 S440K는 시험된 모든 C1q 농도에서 CDC를 유도하는 능력을 거의 완전히 상실한다는 것을 보여준다.

[0636] IgG1-7D8-H435R 및 H433R은 C1q를 다소 더 효율적으로 사용하였고, 이것은 야생형 7D8보다 더 효율적인 CDC를 발생시켰다. IgG1-7D8-E345R은 C1q 효능의 극적인 증가를 보였고, 이것은 야생형 7D8과 비교하여 유의하게 더 높은 CDC 용해를 발생시켰다 (표 9).

[0637] 도 7은 둘 다 단일 돌연변이체로서는 CDC의 상실을 발생시키는 K439E 및 S440K 돌연변이를 조합하면 두 돌연변이가 하나의 분자 내에 조합될 때 (K439E/S440K 이중 돌연변이체) 또는 두 단일 돌연변이체가 조합될 때 (K439E + S440K 혼합물) C1q 효능 검정에서 CDC를 회복한다는 것을 보여준다.

[0638] [표 9]

Raji 세포에 대한 CDC 검정에서의 C1q 효능에 대한 CH<sub>50</sub>

| 항체                                  | n <sup>(1)</sup> | 평균 CH <sub>50</sub><br>(μg/mL) <sup>(2)</sup> | SD <sup>(2)</sup> | 유의성 <sup>(3)</sup> |
|-------------------------------------|------------------|---|-------------------|--------------------|
| IgG1-7D8-WT                         | 8                | 0.49  | 0.26              | na                 |
| IgG1-7D8-I253A                      | 3                | 11.16   | 16.31             | ***                |
| IgG1-7D8-I253D                      | 3                | >30 <sup>(4)</sup>                            | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-I253Y                      | 3                | 16.07   | 12.50             | ***                |
| IgG1-7D8-H310K                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-Q311A                      | 3                | 0.63  | 0.58              | ns                 |
| IgG1-7D8-K322A                      | 6                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-E345R                      | 3                | 0.03  | 0.01              | ***                |
| IgG1-7D8-E382R                      | 3                | 0.77  | 0.476             | ns                 |
| IgG1-7D8-G385D                      | 3                | 22.51   | 12.97             | ***                |
| IgG1-7D8-H433A                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-H433D                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-H433R                      | 3                | 0.16  | 0.09              | ns                 |
| IgG1-7D8-N434A                      | 3                | 21.16   | 15.32             | ***                |
| IgG1-7D8-H435A                      | 3                | 0.96  | 0.20              | ns                 |
| IgG1-7D8-H435R                      | 3                | 0.24  | 0.15              | ns                 |
| IgG1-7D8-Y436C                      | 3                | 23.03   | 12.07             | ***                |
| IgG1-7D8-Y436D                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-Q438D                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-K439E                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-S440K                      | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-I253D/H433A                | 3                | >30   | 0.00              | nd                 |
| IgG1-7D8-K439E/S440K                | 3                | 0.09  | 0.71              | ns                 |
| IgG1-7D8-K439E + IgG1-7D8-S440K 혼합물 | 3                | 1.33  | 1.48              | ns                 |

<sup>(1)</sup> (n) 실험 횟수

<sup>(2)</sup> 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.

<sup>(3)</sup> 통계: 던넛 다중 비교 시험 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하는 log 변환된 데이터에 대한 1원 ANOVA.

유의성은 야생형 IgG1-7D8과 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns) 유의하지 않음 (\*) p=0.01 내지 0.05 (\*\*) p=0.001 내지 0.01 (\*\*\*) p<0.001.

<sup>(4)</sup> 용해가 50%에 도달하지 않은 경우, CH<sub>50</sub>을 >30 μg/mL로 설정하였다.

<sup>(5)</sup> 50% 용해에 도달하지 않은 돌연변이체에 대한 P-값은 결정할 수 없었다. 그러나, 이들은 IgG1-7D8-WT와 유의하게 상이할 것으로 추정된다.

[0639]

[0640] 실시예 6

[0641] CD20-양성 세포에 대한 CDC 검정에서 7D8 돌연변이체에 의한 CDC

[0642] 0.1 x 10<sup>6</sup> 개의 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트 (뉴크, 뉴욕주 로체스터)에서 일련의 농도 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μg/mL)의 항체와 80 μL의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 20 μL 정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 0.1% BSA를 보충한 30 μL 빙냉 RPMI 배지를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 세포 용해는 아이오딘화프로피듐을 사용하여 FACS 상에서 결정되었다.

[0643] Daudi 세포에 대한 CDC 검정에 대해, EC<sub>50</sub> 값 (50% 용해를 발생시키는 항체 농도)은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 log 변환된 데이터 상에서 S자형 용량-반응 곡선을 피팅하여 계산하였다. 돌연변이체의 EC<sub>50</sub> 값을 야생형 7D8에 대해 정규화하였다 (표 10 및 표 11).

[0644] 표 10은 Daudi 세포 상에서, IgG1-7D8-I253A, Q311A, E382R, H433R 및 H435A가 야생형 7D8과 비교하여 CDC에서 차이를 보이지 않았음을 보여준다; 야생형 7D8보다 유의한 더 불량한 CDC (보다 높은 EC<sub>50</sub>)이 IgG1-7D8-I253D, I253Y, H310K, G385D, H433A, H433D, N434A, Y436C, Y436D, Q438D, K439E, S440K 및 I253D/H433A에 대해 발견되었고, 이것은 보다 높은 항체 농도에서 오직 CDC를 유도하였고; 대조군으로서 포함된 C1q 결합 결핍 돌연변이체 IgG1-7D8-K322A는 CDC를 유도하는 능력을 거의 완전히 상실하였고, 시험된 농도에서 EC<sub>50</sub>에 도달하지 않았고; IgG1-7D8-H435R은 Daudi 세포 상에서 야생형 7D8보다 더 효율적인 CDC를 나타내었다. 중요하게는, C1q 효능 CDC 검정에 따라, E345R은 야생형 7D8보다 급격하게 더 양호한 CDC를 보였고, 여기서 Daudi 세포 상에서 10배 더 낮은 EC<sub>50</sub> 값을 가졌다 (표 10). 도 8은 K439E 및 S440K 돌연변이 (둘 다 단일 돌연변이체로서 CDC의 상실을 일으킴)를 조합하면 두 돌연변이가 하나의 분자 내에 조합될 때 (K439E/S440K 이중 돌연변이체) 또는 두 단일 돌연변이체가 조합될 때 (K439E + S440K 혼합물) CDC를 회복한다는 것을 보여준다.

[0645] 표 11은 Raji 세포 상에서 IgG1-7D8 돌연변이체에 대해 유사한 데이터가 발견되었음을 보여준다.

[0646]

[표 10]

Daudi 세포에 대한 CDC 검정으로부터 계산된 EC<sub>50</sub>

| 항체                            | n <sup>(1)</sup> | 평균 EC <sub>50</sub><br>(μg/mL) <sup>(2)</sup> | SD <sup>(2)</sup> | 유의성 <sup>(3)</sup> |
|-------------------------------|------------------|---|-------------------|--------------------|
| IgG1-7D8                      | 12               | 0.48  | 0.11              | na                 |
| IgG1-7D8-I253A                | 4                | 0.79  | 0.15              | ns                 |
| IgG1-7D8-I253D                | 5                | 3.33  | 1.05              | ***                |
| IgG1-7D8-I253Y                | 4                | 1.77  | 0.43              | ***                |
| IgG1-7D8-H310K                | 3                | 3.03  | 0.30              | ***                |
| IgG1-7D8-Q311A                | 4                | 0.42  | 0.12              | ns                 |
| IgG1-7D8-K322A                |                  | >30 <sup>(4)</sup>                            | Nd                | *** <sup>(5)</sup> |
| IgG1-7D8-E345R                | 4                | 0.04  | 0.01              | ***                |
| IgG1-7D8-E382R                | 4                | 0.76  | 0.25              | ns                 |
| IgG1-7D8-G385D                | 3                | 2.12  | 0.45              | ***                |
| IgG1-7D8-H433A                | 5                | 3.44  | 1.17              | ***                |
| IgG1-7D8-H433D                | 4                | 4.73  | 2.57              | ***                |
| IgG1-7D8-H433R                | 4                | 0.33  | 0.14              | ns                 |
| IgG1-7D8-N434A                | 4                | 1.77  | 0.46              | ***                |
| IgG1-7D8-H435A                | 4                | 0.81  | 0.27              | ns                 |
| IgG1-7D8-H435R                | 5                | 0.28  | 0.06              | **                 |
| IgG1-7D8-Y436C                | 4                | 1.90  | 1.21              | ***                |
| IgG1-7D8-Y436D                | 3                | 1.88  | 0.45              | ***                |
| IgG1-7D8-Q438D                | 3                | 2.61  | 0.38              | ***                |
| IgG1-7D8-K439E                | 4                | 2.34  | 0.38              | ***                |
| IgG1-7D8-S440K                | 4                | 1.78  | 0.46              | ***                |
| IgG1-7D8-I253D/H433A          | 4                | 4.77  | 1.36              | ***                |
| IgG1-7D8-K439E/S440K          | 4                | 0.33  | 0.08              | ns                 |
| IgG1-7D8-K439E +<br>IgG1S440K | 4                | 0.48  | 0.17              | ns                 |

<sup>(1)</sup> (n) 실험 횟수

<sup>(2)</sup> 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.

<sup>(3)</sup> 통계: 던넛 다중 비교 시험 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하는 log 변환된 데이터에 대한 1원 ANOVA. 유의성은 야생형 7D8과 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns) 유의하지 않음 (\*) p=0.01 내지 0.05 (\*\*) p=0.001 내지 0.01 (\*\*\*) p<0.001.

<sup>(4)</sup> 용해가 50%에 도달하지 않은 경우, EC<sub>50</sub>을 >30 μg/mL로 설정하였다.

<sup>(5)</sup> EC<sub>50</sub>에 도달하지 않은 돌연변이체에 대한 P-값은 결정할 수 없었다. 그러나, 이들은 야생형 7D8-WT와 유의하게 상이할 것으로 추정된다.

[0647]

[0648] [표 11]

Raji 세포에 대한 CDC 검정으로부터 계산된 EC<sub>50</sub>

| 항체                            | n <sup>(1)</sup> | 평균 EC <sub>50</sub><br>(μg/mL) <sup>(2)</sup> | SD <sup>(2)</sup> | 유의성 <sup>(3)</sup> |
|-------------------------------|------------------|---|-------------------|--------------------|
| IgG1-7D8                      | 13               | 1.54  | 0.77              | Na                 |
| IgG1-7D8-I253A                | 4                | 5.55  | 3.19              | *                  |
| IgG1-7D8-I253D                | 6                | >30 <sup>(4)</sup>                            | 0.00              | *** <sup>(5)</sup> |
| IgG1-7D8-I253Y                | 4                | 28.95   | 2.09              | ***                |
| IgG1-7D8-H310K                | 2                | 19.29   | 15.15             | ***                |
| IgG1-7D8-Q311A                | 4                | 1.72  | 0.42              | Ns                 |
| IgG1-7D8-K322A                |                  | >30   |                   | ***                |
| IgG1-7D8-E345R                | 4                | 0.16  | 0.09              | ***                |
| IgG1-7D8-E382R                | 4                | 2.96  | 1.27              | Ns                 |
| IgG1-7D8-G385D                | 2                | 17.40   | 17.82             | ***                |
| IgG1-7D8-H433A                | 6                | 22.60   | 9.30              | ***                |
| IgG1-7D8-H433D                | 4                | >30   | 0.00              | ***                |
| IgG1-7D8-H433R                | 4                | 1.42  | 0.67              | Ns                 |
| IgG1-7D8-N434A                | 4                | 23.02   | 6.16              | ***                |
| IgG1-7D8-H435A                | 4                | 2.22  | 1.47              | Ns                 |
| IgG1-7D8-H435R                | 6                | 0.61  | 0.21              | **                 |
| IgG1-7D8-Y436C                | 2                | 11.93   | 10.13             | **                 |
| IgG1-7D8-Y436D                | 2                | 16.58   | 3.93              | ***                |
| IgG1-7D8-Q438D                | 2                | 19.49   | 14.87             | ***                |
| IgG1-7D8-K439E                | 4                | 21.51   | 9.96              | ***                |
| IgG1-7D8-S440K                | 4                | 19.53   | 12.71             | ***                |
| IgG1-7D8-I253D/H433A          | 4                | >30   | 0.00              | ***                |
| IgG1-7D8-K439E/S440K          | 4                | 1.34  | 0.45              | Ns                 |
| IgG1-7D8-K439E +<br>IgG1S440K | 4                | 1.58  | 0.64              | Ns                 |

<sup>(1)</sup> (n) 실험 횟수

<sup>(2)</sup> 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.

<sup>(3)</sup> 통계: 던넛 다중 비교 시험 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하는 log 변환된 데이터에 대한 1원 ANOVA.

유의성은 야생형 7D8과 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns)

유의하지 않음 (\*) p=0.01 내지 0.05 (\*\*) p=0.001 내지 0.01 (\*\*\*) p<0.001.

<sup>(4)</sup> 용해가 CH<sub>50</sub>에 도달하지 않은 경우, CH<sub>50</sub>을 >30 μg/mL로 설정하였다.

<sup>(5)</sup> EC<sub>50</sub>에 도달하지 않은 돌연변이체에 대한 P-값은 결정할 수 없었다. 그러나, 이들은 야생형 7D8-WT와 유의하게 상이할 것으로 추정된다.

[0649]

[0650] 실시예 7

[0651] CDC를 유도하는 그의 능력에 따른 7D8 돌연변이체의 순위결정

[0652] 시험된 7D8 돌연변이체에 대해, Daudi 세포 상에서 C1q 결합 (실시예 4에 기재됨)과 Raji 세포 상에서 C1q 효능 검정 (실시예 5에 기재됨) 사이에, 및 Daudi 세포 상에서 C1q 결합과 Daudi 및 Raji 세포에 대한 CDC 검정 (실시예 6에 기재됨) 사이에 상관관계가 발견되었다 (상관관계 데이터 표 13). 따라서, Daudi 세포 상에서 C1q 결합 검정의 K<sub>D</sub> 값을 사용하여 표 12에 제시된 바와 같이 CDC를 유도하는 능력에 따라 모든 시험된 7D8 돌연변이체를 순위결정하였다.

[0653] [표 12]

CDC를 유도하는 능력을 대표하는 것으로 제시된, Daudi 세포 상의 C1q 결합에 대한 내림차순의  $K_D$  값에 따른 모든 시험된 7D8 돌연변이체의 순위결정

| 항체                         | Daudi 세포 상의 C1q 결합 |                           |        |
|----------------------------|--------------------|---------------------------|--------|
|                            | $n^{(1)}$          | $K_D$ (nM) <sup>(2)</sup> | SD     |
| IgG1-7D8-E345R             | 4                  | 1.7                       | 1.7    |
| IgG1-7D8-E382R             | 4                  | 2.3                       | 1.3    |
| IgG1-7D8-K439E/S440K       | 4                  | 2.6                       | 1.6    |
| IgG1-7D8-H433R             | 5                  | 3.0                       | 2.3    |
| IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K | 3                  | 3.3                       | 0.3    |
| IgG1-7D8-H435R             | 3                  | 4.9                       | 2.8    |
| IgG1-7D8-H435A             | 3                  | 8.6                       | 2.8    |
| IgG1-7D8                   | 7                  | 8.7                       | 3.5    |
| IgG1-7D8-Q311A             | 3                  | 10.7                      | 3.8    |
| IgG1-7D8-I253A*            | 3                  | 21.5                      | 8.0    |
| IgG1-7D8-I253Y*            | 3                  | 41.3                      | 16.1   |
| IgG1-7D8-N434A*            | 3                  | 42.6                      | 9.7    |
| IgG1-7D8-G385D*            | 2                  | 74.0                      | 4.0    |
| IgG1-7D8-S440K*            | 2                  | 109.0                     | 87.0   |
| IgG1-7D8-H433A*            | 3                  | 117.5                     | 16.1   |
| IgG1-7D8-H310K*            | 2                  | 124.0                     | 130.0  |
| IgG1-7D8-I253D*            | 3                  | 157.4                     | 44.2   |
| IgG1-7D8-K439E*            | 2                  | 361.0                     | 81.0   |
| IgG1-7D8-Y436D*            | 2                  | 468.0                     | 52.0   |
| IgG1-7D8-Q438D*            | 2                  | 717.0                     | 70.0   |
| IgG1-7D8-Y436C*            | 2                  | (1274.0)                  | 1621.0 |
| IgG1-7D8-H433D*            | 2                  | (1961.0)                  | 1037.0 |
| IgG1-7D8-I253D/H433A*      | 2                  | (5291.0)                  | 7106.0 |

\* 신뢰할만한 핏팅 곡선이 없음. 이탤릭체의  $K_D$  값은 이들 돌연변이체의 너무 약한 결합으로 인해 측정할 수 없었다.

[0654]

[0655] [표 13]

Daudi 세포 상의 C1q 결합 (실시예 4) 및 Raji 세포에 대한 C1q 효능 검정 (실시예 5) 사이의 상관관계, 및 Daudi 세포 상의 C1q 결합 및 Daudi 및 Raji 세포에 대한 CDC 검정 (실시예 06) 사이의 상관관계. 데이터를 log 변환시킨 후에 상관관계를 분석하였다.

| 파라미터        | C1q 효능 Raji      | CDC Raji         | CDC Daudi        |
|-------------|------------------|------------------|------------------|
| XY 쌍의 개수    | 21               | 21               | 21               |
| 피어슨 r       | 0.8600           | 0.8668           | 0.8959           |
| 95% 신뢰 구간   | 0.6812 내지 0.9420 | 0.6952 내지 0.9449 | 0.7569 내지 0.9573 |
| P 값 (양측)    | < 0.0001         | < 0.0001         | < 0.0001         |
| P 값 요약      | ***              | ***              | ***              |
| 상관관계가 유의한가? |                  |                  |                  |
| (알파=0.05)   | 예                | 예                | 예                |
| R 제곱        | 0.7396           | 0.7513           | 0.8026           |

[0656]

[0657] 실시예 8

[0658] CD38 항체 005 돌연변이체의 설계 및 생성

[0659] 인간 모노클로날 항체 HuMab 005는 WO/2006/099875에 기재된 완전 인간 IgG1,  $\kappa$  항체이다. 여기서, 이것은 CDC 활성을 증진시키는 확인된 Fc 돌연변이의 검증을 위한 모델 항체로 사용되었다. 시험된 돌연변이를 표 14



에 열거한다.

[0660] 돌연변이유발 반응을 위한 주형으로서 IgG1m(f) 동종이형을 갖는 HuMab 005의 중쇄를 사용하여, 실시예 1에 기재된 바와 같이 상이한 돌연변이체에 대한 DNA 구축물을 제조하고 일시적으로 형질감염시켰다.

[0661] [표 14]

005 (HuMax-CD38)의 CH2-CH3 도메인에 도입된 돌연변이의 세트.

| 돌연변이  | WT aa<br>전하 | 돌연변이체<br>aa 전하 |
|-------|-------------|----------------|
| I253D | =           | -              |
| E345R | -           | +              |
| H433A | δ+          | =              |
| K439E | +           | -              |
| S440K | =           | +              |

(=) 전하 없음

(-) 음전하

(+) 양전하

(δ+) 부분적 양전하

[0662]

[0663] 실시예 9

[0664] HuMab-005 돌연변이체에 의한 세포 상에서의 CD38 결합

[0665] CD38-양성 Daudi 및 Raji 세포에 대한 정제되지 않은 항체 샘플의 결합을 FACS 분석에 의해 분석하였다.  $10^5$ 개의 세포를 100  $\mu$ L로 폴리스티렌 96-웰 둥근-바닥 플레이트 내에서 항체 제제의 연속 희석액 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu$ g/mL)과 함께 RPMI1640/0.1% BSA 내에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. RPMI1640/0.1% BSA에서 2회 세척한 후에, 세포를 50  $\mu$ L로 FITC-접합된 토끼 F(ab')<sub>2</sub> 항-인간 IgG (카탈로그 번호. F0056; 다코; 1:150)와 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에서 2회 세척하고, 100  $\mu$ L PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 재현탁하고, FACS 칸틀 (BD 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 V5.01 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 음성 대조군으로서, 모의-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

[0666] Daudi 세포에 대한 HuMab 005의 결합은 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 많이 영향을 받지 않았다. 모든 시험된 항체는 용량-의존성 방식으로 Daudi 세포에 결합하였다. 결합은 다소 감소한 결합을 보인 005-E345R을 제외하고는, 모든 시험된 돌연변이체에서 야생형 HuMab-005와 유사하였다. 그러나, 임의의 이론에 제한되지 않고, 보다 낮은 결합은 실시예 2에서 IgG1-7D8-E345와 유사한, 이차 항체에 의한 감소한 결합의 결과일 것이다. 005-E345R에 의한 실제 결합력은 005-WT와 비교하여 유사하거나 심지어 증가할 수 있지만, 본 발명자들은 직접 표지된 항체의 결어로 인해 이를 확인할 수 없었다.

[0667] Raji 세포에 대한 HuMab-005의 결합은 또한 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 많이 영향을 받지 않았다. 모든 시험된 항체는 용량-의존성 방식으로 Raji 세포에 결합하였다. 최대 결합은 005-I253D 및 H433A 돌연변이체에 대해 야생형 005와 유사하고, 005-E435R, K439E, S440K 돌연변이체 및 005-K439E + 005-S440K의 조합에 대해 더 낮았다. 그러나, 임의의 이론에 제한되지 않고, 보다 낮은 결합은 실시예 2 (에피토프의 차폐)에서 IgG1-7D8-E345R과 유사한, 이차 항체에 의한 감소한 결합의 결과일 수 있다.

[0668] 실시예 10

[0669] CD38 항체 005의 돌연변이체에 의한 CD38-양성 세포에 대한 CDC 검정

[0670]  $0.1 \times 10^6$ 개의 Daudi 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu$ g/mL)의 정제되지 않은 항체와 100  $\mu$ L의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu$ L 정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu$ L 아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0671] Daudi 및 Raji 세포 상에서 7D8 및 005 항체 둘 다의 CDC 활성을 증진시키는 것으로 밝혀진 E435R 돌연변이의 CDC 증진 능력을 Wien133 세포에 대해 상이한 농도의 정상 인간 혈청 (NHS)을 사용하여 추가로 분석하였다.  $0.1 \times 10^6$ 개의 Wien133 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1,

0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 정제되지 않은 항체와 함께 50  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, NHS를 C1q의 공급원으로서 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 20% 또는 50% NHS 중 어느 하나의 최종 농도에 도달하도록 첨가하였다. 반응 혼합물을 37 $^{\circ}\text{C}$  인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0672] CD20 항체 7D8에 대한 CDC 활성을 상실시키거나 또는 증가시키는 CH2-CH3 영역 내의 확인된 돌연변이는 CD38을 인식하는 005 항체에 대해 동일한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 도 9는 005-I253D, H443A, K439E 및 S440K가 Daudi (도 9a) 및 Raji (도 9b) 세포 모두에서 CDC 활성의 완전한 상실을 나타낸 반면, 005-E345R 돌연변이체는 세포주 둘 다에서 강하게 증진된 CDC 활성을 나타내었음을 보여준다. 7D8 데이터와 비교하여, 둘 다 단일 돌연변이체로서 CDC를 상실시키는 005-K439E + 005-S440K의 조합은 CDC를 회복시켰다. 놀랍게도, 005-E435R은 야생형 005가 CDC에 의해 사멸을 유도할 수 없는 Wien133 세포 상에서 CDC를 훨씬 강하게 유도하였다 (도 9c). Wien133 세포 상에서 005-E345R에 의한 CDC 사멸은 20% 및 50% 혈청 농도 둘 다에서 관찰되었다 (도 9c). 또한 Raji 세포 상에서, 7D8-E345R 및 005-E345R은 둘 다 50% 혈청 내에서 시험관내에서 증진된 CDC를 나타내었으며, 여기서 20% 혈청에서와 유사한 효능을 나타내었다 (도 9d).

[0673] CH2-CH3 영역 내의 E345R 돌연변이는 시험된 CD20 항체 7D8 및 CD38 항체 005 둘 다에서 CDC 활성을 증진시켰으므로, E345R 돌연변이는 CDC를 유도 또는 증진시키기 위해 적용될 수 있는 일반 항체 변형인 것으로 여겨진다.

[0674] 실시예 11

[0675] CDC-증진 돌연변이 E345R을 함유하는 IgG1 항체는 야생형 항체보다 Fc 결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의한 CDC의 억제에 덜 민감하다

[0676] IgG의 Fc:Fc 인터페이스에서 소수성 패치 내의 아미노산 위치를 돌연변이시킴으로써, CDC 효능은 방해 또는 증진되는 것으로 밝혀졌다. CDC 효능에서 Fc-Fc 인터페이스에서 상호작용의 관련성, 및 따라서 가능하게는 b12 결정 구조로 관찰된 것과 같은 올리고머 (예를 들어, 육량체 고리) 구조의 형성을 추가의 조사하였다. 따라서, 야생형 IgG Fc의 표면 상에서 소수성 패치 영역 내의 컨센서스 결합 부위를 표적으로 하는 13-잔기 펩티드 (DCAWHLGELVWCT (서열 7))를 사용하였다 (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83). 실제로, 다양한 구분된 분자와 상호작용하기 위해 제조된 순응 영역으로서 (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83) IgG Fc의 표면 상에서 컨센서스 결합 부위의 확인은 IgG1 b12 결정 구조 내에서 Fc-Fc 상호작용에 관여하는 소수성 패치 내의 코어 아미노산의 확인과 일치한다 (Sapphire et al., Science 2001 Aug 10;293(5532):1155-9). 모든 결합 인터페이스에 존재하는 상호작용은 6개 아미노산 (Met-252, Ile-253, Ser-254, Asn-434, His-435, 및 Tyr-436)의 공유된 세트, 및 공유된 백본 접촉에 의해 매개된다 (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83). 따라서, Fc 결합 펩티드는 Fc-Fc 상호작용 및 결과적으로 CDC 효능에 영향을 미치는 것으로 예상된다.

[0677]  $0.1 \times 10^6$ 개의 Daudi 세포를 75  $\mu\text{L}$ 에서 1.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 정제되지 않은 항체와 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 10분 동안 실온에서 진탕기 상에서 예비-인큐베이션하였다. 25  $\mu\text{L}$ 의 일련의 농도 (범위 0.06-60  $\mu\text{g/mL}$  최종 농도)의 Fc 결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT를 옅소닌화된 세포에 첨가하고, 10분 동안 진탕기 상에서 RT에서 인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  NHS를 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37 $^{\circ}\text{C}$  인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 0.1% BSA를 보충한 25  $\mu\text{L}$  빙냉 RPMI 배지를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 15  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS 분석에 의해 결정하였다.

[0678] 야생형 005 (도 10a) 또는 7D8 (도 10b)에 의해 매개되는 CDC는 용량-의존성 방식으로 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의해 억제되는 것으로 밝혀졌다. 이들 경쟁 데이터는 다시 CDC 효능에서 IgG의 소수성 패치에서 Fc-Fc 상호작용의 관련성을 제안한다. CDC-증진 IgG1-005-E345R 및 IgG1-7D8-E345R 돌연변이체는 둘 다 그의 상응하는 야생형 항체와 비교하여 Fc-결합 펩티드에 의한 경쟁에 덜 민감하였고, 이는 E345R 돌연변이가 Fc-Fc 상호작용의 안정성을 증가시키고 결과적으로 CDC를 증가시킨다는 것을 제안한다.

[0679] 실시예 12

[0680] CD38 항체 HuMAb 005의 변이체에 의한 CD38 발현 세포의 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)

[0681] Daudi 세포를 수거하고 ( $5 \times 10^6$  개 세포/ml), 세척하고 (PBS에서 2회, 1200rpm, 5분), 10% 코스믹(cosmic) 송아지

혈청 (CCS) (하이클론(HyClone), 미국 유타주 로건)을 보충한 1 mL RPMI 1640 배지에 수집하였고, 여기에 200  $\mu$ Ci  $^{51}$ Cr (크로뮴-51; 아머삼 바이오사이언시스 유럽 게엠베하(Amersham Biosciences Europe GmbH), 네덜란드 로젠달)을 첨가하였다. 혼합물을 진탕 수조 내에서 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포의 세척 후에 (PBS에서 2회, 1200 rpm, 5분), 세포를 10% CCS를 보충한 RPMI 1640 배지 내에 재현탁시키고, 트리판 블루 배제에 의해 계수하고,  $1 \times 10^5$ 개 세포/mL의 농도로 희석하였다.

[0682] 한편, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 제조업체 (림프구 분리 배지; 론자 (Lonza), 프랑스 베르비에)의 지시에 따라 표준 피콜(Ficoll) 밀도 원심분리를 이용하여 신선한 백혈구 연층 (상권, 네덜란드 암스테르담)으로부터 분리하였다. 세포를 10% CCS를 보충한 RPMI 1640 배지 내에 재현탁한 후, 세포를 트리판 블루 배제에 의해 계수하고,  $1 \times 10^7$ 개 세포/mL로 농축하였다.

[0683] ADCC 실험에 대해, 50  $\mu$ L  $^{51}$ Cr-표지된 Daudi 세포 (5,000개 세포)를 15  $\mu$ g/mL CD38 항체 IgG1-005 또는 돌연변이체 IgG1-005-E345R와 함께 10% CCS를 보충한 RPMI 배지 내에서 100  $\mu$ L의 총 부피로 96-웰 마이크로타이터 플레이트에서 예비-인큐베이션하였다. RT에서 10분 후에, 50  $\mu$ L PBMC (500,000개 세포)를 첨가하여, 이펙터 대 표적 비를 100:1로 하였다. 최대량의 세포 용해는 50  $\mu$ L  $^{51}$ Cr-표지된 Daudi 세포 (5,000개 세포)를 100  $\mu$ L 5% 트리톤-X100과 인큐베이션함으로써 결정하였다. 자발적 용해의 양은 5,000개의  $^{51}$ Cr-표지된 Daudi 세포를 임의의 항체 또는 이펙터 세포 없이 150  $\mu$ L 배지 내에서 인큐베이션함으로써 결정하였다. 항체-비의존성 세포 용해의 수준은 항체 없이 5,000개의 Daudi 세포를 500,000개의 PBMC와 인큐베이션함으로써 결정하였다. 후속적으로, 세포를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 내지 4시간 인큐베이션하였다. 세포 용해의 양을 결정하기 위해, 세포를 원심분리하고 (1200rpm, 3분), 75  $\mu$ L의 상청액을 마이크로닉 튜브에 옮기고, 그 후 방출된  $^{51}$ Cr을 감마 계수기를 이용하여 계수하였다. 측정된 분당 계수 (cpm)를 다음과 같이 항체-매개 용해의 백분율을 계산하기 위해 사용하였다:

[0684] 
$$(\text{cpm 샘플} - \text{cpm Ab-비의존성 용해}) / (\text{cpm 최대 용해} - \text{cpm 자발적 용해}) \times 100\%$$

[0685] 표 15는 수행된 ADCC 검정에서 IgG1-005-wt 및 IgG1-005-E345R의 계산된 EC<sub>50</sub> 값을 보여준다. 4개의 샘플을 시험하였다. IgG1-005-E345R은 4개의 모든 시험된 샘플의 IgG1-005-wt보다 유의한 더 낮은 EC<sub>50</sub> 값을 보여준다.

[0686] [표 15]

4회 수행된 실험의 계산된 EC50 값

| ADCC  |     | IgG1-005-wt | IgG1-005-E345R |       |
|-------|-----|-------------|----------------|-------|
|       |     | EC50        | EC50           |       |
| A     |     | 5.7         | 1.2            |       |
| B     |     | 8.3         | 4.0            |       |
| C     |     | 14.1        | 4.1            |       |
| D     |     | 5.0         | 0.6            |       |
|       | 평균  | 8.3         | 2.5            | ng/ml |
|       | SEM | 4.1         | 1.9            |       |
| TTEST | 양측  | P =         | 0.04           |       |
| 증진 배수 |     |             | 3.3            | 배     |

[0687]

[0688] 도 11은 야생형 항체 HuMab-005와 비교하여, 돌연변이체 IgG1-005-E345R이 보다 낮은 농도에서 ADCC를 유도할 수 있어서, ADCC 능력의 증진된 효능을 나타냈음을 보여준다.

[0689] 실시예 13

[0690] 야생형 7D8과 비교하는 7D8 돌연변이체의 FcRn 결합 및 약동학적 분석

[0691] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG를 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기를 책임진다. 항체의 내재화 후에, FcRn은 엔도솜 내에서 항체 Fc 영역에 결합하고, 여기서 온화한 산성 환경 (pH 6.0) 내에서 상호작용은

안정하다. 환경이 중성 (pH 7.4)인 형질막으로 재순환할 때, 상호작용을 잃고, 항체는 다시 순환계로 방출된다. 이것은 IgG의 혈장 반감기에 영향을 미친다.

[0692] 마우스, 시노물구스 원숭이 및 인간으로부터의 FcRn과 상호작용하는 7D8 돌연변이체 IgG1-7D8-E354R의 능력을 ELISA에서 시험하였다. 모든 인큐베이션은 실온에서 수행하였다. 96 웰 플레이트를 5 µg/mL (100 µL/웰)의 FcRn (마우스, 인간 또는 시노물구스)의 재조합 생산된 비오티닐화된 세포외 도메인 (FcRnECDHis-B2M-BIO)로 코팅하고, PBST + 0.2% BSA 내에 1시간 희석하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, (PBST/0.2% BSA, pH 6.0에서) 3배 연속 희석된 야생형 IgG1-7D8 또는 IgG1-7D8-E354R을 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST/0.2% BSA, pH 6.0으로 세척하였다. PBST/0.2% BSA, pH 6.0에서 희석된 염소-항-인간 IgG(Fab'2)-HRP (잭슨 이뮤노 리서치(Jackson Immuno Research), 카탈로그 번호: 109-035-097)를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척한 후에, ABTS를 기질로서 첨가하고, 플레이트를 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 흡광도를 EL808 ELISA 판독기를 사용하여 405에서 판독하였다.

[0693] 상기 연구에서 마우스를 중앙 실험실 동물 시설 (네덜란드 유트레흐트)의 장벽 유닛 내에 수용하고, 상단 필터 장착 케이지 내에 물 및 사료를 무제한 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 유트레흐트 대학 동물실험 윤리 위원회에서 승인받았다.

[0694] 7D8 돌연변이체의 약동학을 생체 내에서 분석하기 위해, SCID 마우스 (C.B-17/IcrCrl-scid-BR, 찰스-리버 (Charles-River))에 100 µg (5 mg/kg) 야생형 7D8, IgG1-7D8-E354R, -S440K 또는 K322A (군당 3마리 마우스)를 정맥내 주사하였다.

[0695] 50 µL 혈액 샘플을 항체 투여 10분, 4시간, 24시간, 2일, 7일, 14일 및 21일 후에 복제 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알에 수집하고, 5분 동안 10,000g에서 원심분리하였다. 혈장을 mAb 농도 결정시까지 -20°C에 저장하였다.

[0696] 인간 IgG 농도는 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. 2 µg/mL의 농도로 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (#M1268, CLB 상퀀(CLB Sanquin), 네덜란드)을 포획 항체로 사용하였다. 플레이트를 2% 닭 혈청을 보충한 PBS로 차단한 후에, 샘플을 첨가하고, ELISA 완충제 (0.05% 트윈 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS) 내에 연속 희석하고, 플레이트 진탕기 상에서 1시간 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 후속적으로 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (#109-035-098, 잭슨 (Jackson), 펜실베이니아주 웨스트 그레이스)과 인큐베이션하고, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)으로 발색시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 버몬트주 위누스키)에서 405nm에서 측정하였다.

[0697] SCID 마우스는 낮은 혈장 IgG 농도를 가지며, 이에 따라 IgG의 클리어런스가 비교적 느리기 때문에 선택되었다. 이것은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 Fc γ-부분의 감소된 결합 때문에 클리어런스의 변화를 검출하기 위해 매우 민감한 PK 모델을 제공한다.

[0698] 통계 시험은 그래프패드 프리즘 버전 4 (그래프패드 소프트웨어)를 이용하여 수행하였다.

[0699] 도 12는 야생형 HuMab-7D8 및 IgG1-7D8-E345R이 둘 다 마우스, 인간 및 시노물구스 FcRn에 잘 결합한다는 것을 보여준다. IgG1-7D8-E345R의 결합은 야생형 7D8보다 다소 더 양호하였다.

[0700] 도 13은 시간에 따른 혈장 농도를 보여준다. 야생형 HuMab-7D8 대 IgG1-7D8-E345R, -S440K 또는 K322A 중 하나의 시간 경과에 따른 혈장 농도의 변화 (클리어런스)에서 차이가 없었다.

#### [0701] 실시예 14

[0702] **Fc-결합 표면 단백질을 발현하는 박테리아에 대한 IgG 항체의 증가된 살박테리아 활성을 위한 Fc-Fc 안정화 돌연변이 E345R의 사용**

[0703] 보체 캐스케이드 시스템은 병원체에 대한 중요한 숙주 방어 메카니즘이고, 병원체를 인지하는 3가지 상이한 활성화 경로로 나눌 수 있다: i) 병원체-결합 항체에 대한 C1q 결합시에 활성화되는 항체-매개 고전적 경로, ii) 렉틴, 및 iii) 보체 시스템이 항체의 부재 하에 병원체를 직접적으로 인지하고 이에 의해 촉발되는 것인 대안적 경로. 3가지 경로는 C3 절단 및 C3b 침착의 단계에서 모인다. 미생물은 보체 회피의 다중 메카니즘을 발달시켰으며, 이 중 하나가 단백질 A에 의해 매개된다 (Joiner Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42:201-30; Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec;3(12):948-58). 단백질 A는 스타필로코쿠스 아우레우스의 세포벽에서 처음 확인되었고, IgG의 Fc 영역에 대한 그의 결합에 대해 잘 알려져 있다 (Deisenhofer et al., Biochem (1981) 20,



2361-70; Uhlen et al., J. Biol. Chem (1984) 259,1695-1702). 지금까지, 단백질 A의 항식세포작용 효과 및 에스. 아우레우스의 발병기전에서 그의 역할은 단백질 A 및 IgG 사이의 상호작용에 의해 설명되었고, 이것은 호중구 Fc 수용체에 의해 인식되는 항체 배향을 부정확하게 한다 (Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec;3(12):948-58).

[0704] 실시예 11은 B 세포-특이적 IgG1 항체에 의해 매개되는 CDC가, 경쟁하는 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의해 억제되었음을 보여준다. 펩티드는 단백질 A, 단백질 G 및 류마티스 인자에 대한 결합 부위와 일치하는 IgG Fc 상의 컨센서스 결합 부위를 표적으로 한다 (Delano et al., Science 2000 Feb 18;287(5456):1279-83). 이들 데이터에 기초하여, 단백질 A-매개 박테리아 보체 회피 메카니즘은 Fc 결합에 대해 경쟁하여, 미생물-특이적 항체의 Fc-Fc 상호작용의 불안정화를 일으키고 결과적으로 항체-매개 보체 활성화의 억제를 일으킴으로써 작용할 수 있는 것으로 여겨진다. 또한, 실시예 11은 또한 CDC-증진 E345R 돌연변이를 함유한 B 세포-특이적 IgG1 항체가 야생형 모 항체보다 경쟁하는 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의한 CDC의 억제에 덜 민감하다는 것을 보여준다. 이러한 결과를 미생물 상에서 발현된 Fc 결합 단백질에 외삽함으로써, E345R 돌연변이에 의한 IgG1 Fc-Fc 상호작용의 증가한 안정화는 미생물-특이적 항체가 미생물 표면 단백질, 예컨대 단백질 A에 의한 Fc 결합 경쟁을 통해 병원체의 탈출 전략에 의한 보체 억제에 덜 감수성이 되도록 할 것이다. 결과적으로, 박테리아에 대해 작용성인 IgG 항체 내에 E345R 돌연변이의 도입은 야생형 모 항체와 비교하여 박테리아 상에 C3b 침착을 증가시키고 살박테리아 활성을 증가시킬 것이다.

[0705] 보체-매개 박테리아 사멸에 대한 시험관내 척도로서, 호중구에 의한 식세포작용 및 혈장 내의 C3a의 생성 (이는 박테리아 상의 C3b 침착과 일치함)은 둘 다 하기 기재되는 바와 같이 결정할 수 있다. 실제로, 에스. 아우레우스 상의 C3b 침착은 식세포작용을 증진시키고 박테리아 사멸과 상호관련되는 것으로 설명되었다 (Rooijakkers et al., Nature Immunology 2005: 6,920-927).

[0706] 에스. 아우레우스가 대수 성장하고 있는 박테리아 배양액을 100 µg/mL FITC와 1시간 동안 37°C에서 0.1M 카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 중에서 인큐베이션함으로써 FITC로 표지할 것이다. 인간 다형체 핵 세포 (PMN)를 피콜구배를 이용하여 분리할 것이다. FITC-표지된 박테리아를 돌연변이 E345R이 있는 또는 없는 일련의 농도의 특이적 항체로 옅소닌화시킬 것이다. 식세포작용은  $1 \times 10^8$  개의 옅소닌화된 FITC-표지된 박테리아를 보체 공급원으로 25% IgG-고갈된 혈청의 존재 하에 인간 PMN과 함께 격렬하게 진탕 하면서 25분 동안 37°C에서 200 µL의 총 부피로 인큐베이션함으로써 시험관내에서 수행할 것이다. 세포를 고정시키고 적혈구를 BD FACS 용해 용액과 함께 15분 동안 실온에서 인큐베이션에 의해 용해시킬 것이다. 세척한 후에, 식세포작용을 FACS에 의해 측정할 것이다. 호중구 집단은 전방 및 측방 산란 게이팅을 통해 선택할 것이고, 식세포작용은 호중구 집단에서 평균 형광으로서 표현할 것이다. 대안적으로, 보체 활성화 및 C3b 침착에 대한 척도로서 C3a 생성을 ELISA에 의해 샘플 내에서 측정할 것이다.

[0707] E345R 돌연변이를 함유하는 에스. 아우레우스-특이적 항체는 야생형 모 항체보다 호중구에 의해 더 많은 보체 활성화 및 식세포작용을 유도할 것으로 예상된다. 이러한 실험에 사용될 수 있는 항체의 예는 스타필로코쿠스의 세포 벽에 포매된 리포테이코산 (LTA)을 표적으로 하는 키메라 모노클로날이 IgG1 파기박시맵 (BSYX-A110; 바이오시넥서스)이다 (Baker, Nat Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1491-3; Weisman et al., Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44).

[0708] 실시예 15

[0709] CDC 활성화를 2가지 상이한 치료 모노클로날 항체의 혼합물에 의해 동시에 결합된 표적 세포에 제한하는 CDC-억제 돌연변이의 사용

[0710] 실시예 6에 기재된 바와 같이, CD20 항체 7D8 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 7D8 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다. 실시예 10에 기재된 바와 같이, CD38 항체 005 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 005 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다.

[0711] 효율적인 CDC의 유도를 CDC 유도의 선택성을 개선하기 위해 그의 조합된 발현을 이용하여, 2개의 특이적 항원을 동시에 발현하는 표적 세포로 제한하는 것이 유리할 수 있다. CDC 유도를 CD20 및 CD38 항체 둘 다에 의해 동시에 결합된 세포로 제한하기 위해, 7D8-K439E와 005-S440K의 쌍 또는 7D8-S440K와 005-K439E의 쌍을 다음과



같이 CDC 실험에서 따로 첨가하거나 1:1 혼합할 것이다.  $0.1 \times 10^6$  개의 Daudi 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g/mL}$ )의 정제되지 않은 항체 또는 항체 혼합물과 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션할 것이다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션할 것이다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다. 7D8-K439E, 005-S440K, 7D8-S440K 및 005-K439E는 제한된 CDC 효능을 나타낼 것으로 예상된다. 7D8-K439E 및 005-S440K의 동시 첨가는 CD20 및 CD38을 둘 다 발현하는 세포 상에서 특이적으로 효율적인 CDC를 회복할 것으로 예상된다. 마찬가지로, 7D8-S440K 및 005-K439E의 혼합물이 CD20 및 CD38을 둘 다 발현하는 세포 상에서 특이적으로 효율적인 CDC를 회복할 것으로 예상된다.

## [0712] 실시예 16

### [0713] 2가지 상이한 모노클로날 항체의 혼합물에서 E345R을 상보성 억제 돌연변이 K439E 및 S440K와 조합함으로써 증진된 CDC의 증가된 특이성

[0714] 실시예 6에 기재된 바와 같이, CD20 항체 7D8 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 7D8 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포로 제한되었다. 실시예 10에 기재된 바와 같이, CD38 항체 005 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이러한 돌연변이를 함유하는 005 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 양쪽 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포로 제한되었다.

[0715] CDC 유도의 증진을 증진된 CDC 유도의 선택성을 개선하기 위해 그의 조합된 발현을 이용하여, 2개의 특이적 항원을 동시에 발현하는 표적 세포에 제한하는 것이 유리할 수 있다. CDC 유도의 증진을 적어도 2가지 상이한 항체의 혼합물에 의해 동시에 결합되는 표적 세포로 제한하는 것이 또한 유리할 수 있고, 여기서 상기 항체는 동일한 세포 표면 항원에 2가지 상이한 에피토프에서 동시에, 또는 2개의 교차-경쟁하는, 유사한, 또는 동일한 에피토프에서 결합한다.

[0716] 따라서, 증진된 CDC 유도를 CD20 및 CD38 항체 둘 다에 의해 동시에 결합된 세포로 제한하기 위해, CDC 증진 돌연변이 E345R을 항체 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K 및 005-E345R/K439E에서 CDC 억제 돌연변이와 조합시켰다. 이들 항체를 다음과 같이 CDC 실험에서 따로 첨가하거나 1:1 혼합하였다.  $0.1 \times 10^6$  개의 Wien133 세포 (Daudi 또는 Raji 세포와 같은 다른 세포 유형을 또한 사용할 수 있음)를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도의 정제되지 않은 항체 (7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K 또는 005-E345R/K439E)에 대해 3배 희석으로 최종 농도 0.056-10,000 ng/mL) 또는 항체 혼합물 (3배 희석으로 0-333 ng/mL CD38 항체와 혼합된 최종 농도 0.01  $\mu\text{g/mL}$  CD20 항체; 또는 3배 희석으로 0.0056-1,000 ng/mL CD20 항체와 혼합된 3.3  $\mu\text{g/mL}$  CD38 항체)과 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0717] 일련의 농도의 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K 항체를 고정 농도의 0.01  $\mu\text{g/mL}$  7D8 이중 돌연변이체 항체 (도 14a로부터 결정된 바와 같이 단일 작용체로서 Wien133 세포에 대한 최소의 CDC를 갖는 최대 농도)와 혼합하여 상보성 조합물 005-E345R/K439E + 7D8-E345R/S440K 또는 005-E345R/S440K + 7D8-E345R/K439E를 제조하였다. 도 14c는 005 이중 돌연변이체 CD38 항체가 각각 고정 농도의 상보성 7D8-E345R/K439E 또는 7D8-E345R/S440K CD20 항체의 존재 하에 CDC를 용량-의존성으로 유도하였다는 것을 보여준다. 이들 상보성 조합에 의한 CDC 효능 (도 14c)은 단일 작용체로서 005-E345R 단일 돌연변이체 (인헨서) 항체에 대등하였다 (도 14b). 이와 대조적으로 비관련 항체 b12의 존재 하에, 005-E345R/K439E 및 005-E345R/S440K는 둘 다 시험된 일련의 농도에서 어떠한 CDC도 거의 나타내지 않았다 (도 14b에 제시된 단일 작용체로서 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K와 대등함).

[0718] 일련의 농도의 7D8-E345R/K439E 또는 7D8-E345R/S440K 항체를 고정 농도의 3.3  $\mu\text{g/mL}$  005 이중 돌연변이체 항체 (도 14b로부터 결정된 바와 같이 단일 작용체로서 Wien133 세포에 대해 작지만 제한된 CDC를 나타냄)와 혼합하여 상보성 조합 7D8-E345R/K439E + 005-E345R/S440K 또는 7D8-E345R/S440K + 005-E345R/K439E를 제조하였다. 도 14d는 7D8 이중 돌연변이체 CD20 항체가 세포당 단지 몇 개의 7D8 이중 돌연변이체 항체 분자와 닮은, 심지어

어 시험된 최저 농도에서 각각 상보성 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K CD38 항체의 존재 하에 CDC를 매우 효율적으로 유도하였다는 것을 보여준다. 상보성 K439E 및 S440K 돌연변이를 갖는 7D8 및 005 항체의 혼합물에 의한 관찰된 증진된 CDC에 대한 세포막 상에 증가된 Fc-꼬리 밀도의 기여를 제거하기 위해, 비-상보성 돌연변이를 갖는 항체 조합을 또한 시험하였다. 도 14d는 비-상보성 조합이 상보성 조합보다 덜 효율적인 Fc-Fc 상호작용의 결과로서 상보성 조합보다 훨씬 더 낮은 CDC 효능을 보였음을 보여준다.

[0719] 이들 데이터는 치료 항체에 의한 (증진된) CDC의 유도가 본 경우에 상이한 항원 특이성을 갖는 2개의 상보성 항체의 혼합물에 동시에 결합하여 두 항원의 동시-발현을 요구함으로써 표적 세포 특이성을 증가시키는 세포로 제한될 수 있음을 제안한다.

[0720] 도 14a 및 14b에서 볼 수 있는 바와 같이, 7D8-E345R/K439E, 005-E345R/S440K, 7D8-E345R/S440K 및 005-E345R/K439E는 7D8-E345R 단독과 비교하여 제한된 CDC 효능을 나타내었다. 7D8-E345R/K439E 및 7D8-E345R/S440K의 혼합물이 단일 작용제로서 야생형 7D8 항체와 비교하여 증진된 효능을 갖는 CDC를 가능하게 한다는 것이 추가로 밝혀졌다. 마찬가지로, 005-E345R/K439E 및 005-E345R/S440K의 혼합물이 단일 작용제로서 야생형 005 항체와 비교하여 증진된 효능을 갖는 CDC를 가능하게 한다는 것이 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0721] 실시예 17

[0722] 효율적인 CDC 활성화를 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체로 제한하는 CDC-억제돌연변이의 사용

[0723] 실시예 6에 기재된 바와 같이, CD20 항체 7D8 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 감소된 CDC 효능을 회복시켰다. 실시예 10에 기재된 바와 같이, CD38 항체 005 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 억제된 CDC 효능을 회복시켰다. 관찰된 바와 같이, 단일 점 돌연변이는 Fc:Fc 인터페이스의 대향하는 측면 상에 돌연변이되지 않은 아미노산과 Fc:Fc 상호작용을 파괴한다. Fc:Fc 인터페이스의 대향하는 측면 상에 보완 돌연변이의 도입은 CDC 효능을 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 독점적으로 두 돌연변이를 모두 함유하는 항체로 이루어지는 항체 복합체에 명백하게 제한된다.

[0724] 또 다른 예에서, CDC의 유도는 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한된다. CDC 유도를 치료적 CD20에 의해 또는 CD38 항체에 의해 독점적으로 결합된 세포에 제한하기 위해, CDC 억제돌연변이 K439E 및 S440K를 항체 7D8-K439E/S440K 또는 005-K439E/S440K에서 조합시킬 것이다. 이들 항체를 다음과 같이 비-표적 특이적 IgG의 부재 또는 존재 하에 CDC 실험에서 따로 첨가할 것이다.  $0.1 \times 10^6$  개의 Daudi 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu$ g/mL)의 정제되지 않은 항체 또는 항체 혼합물과 100  $\mu$ L의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션할 것이다. 이어서, 25  $\mu$ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션할 것이다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10  $\mu$ L 아이오딘화프로피듐을 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다.

[0725] 7D8-K439E/S440K는 야생형 7D8 항체와 유사한 효율로 CDC를 유도할 것으로 예상된다. 7D8-K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하면 상기 항체에 대한 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 마찬가지로, 005-K439E/S440K는 야생형 HuMAb 005와 유사한 효율로 CDC를 가능하게 할 것으로 예상된다. 005-K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하는 것은 상기 항체에 대한 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다.

[0726] 실시예 18

[0727] 증진된 CDC 활성화를 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한하는 CDC-억제 돌연변이의 사용

[0728] 실시예 6에 기재된 바와 같이, CD20 항체 7D8 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 감소된 CDC 효능을 회복시켰다. 실시예 10에 기재된 바와 같이, CD38 항체 HuMAb 005 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 억제된 CDC 효능을 회복시켰다. 관찰된 바와 같이, 단일 점 돌연변이는 Fc:Fc 인터페이스의 대향하는 측면 상에 돌연변이되지 않은 아미노산과 Fc:Fc 상호작용을 파괴한다. Fc:Fc 인터페이스의 대향하는 측면 상에 보완 돌연변이의 도입은 CDC 효능을 회복시켰다.

따라서, 효율적인 CDC는 독점적으로 두 돌연변이를 모두 함유하는 항체로 이루어지는 항체 복합체에 명백하게 제한된다.

[0729] 또 다른 예에서, CDC 유도의 증진은 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한된다. CDC 자극을 위해 이용된 Fc:Fc 상호작용을 자극하는 돌연변이의 스크리닝 및 선택에 의해, 관심있는 항원 표적에 대해 특이적이지 않은 혈청 항체와 CDC-유도 항체 복합체를 형성할 수 있는 돌연변이를 확인할 수 있었다. 증진된 CDC 유도를 CD20의 복합체에 의해 또는 CD38 항체에 의해 독점적으로 결합된 세포에 제한하기 위해, CDC 증진 돌연변이 E345R을 항체 7D8-E345R/K439E/S440K 또는 005-E345R/K439E/S440K에서 CDC 억제돌연변이와 조합시킬 것이다. 이들 항체를 다음과 같이 비-표적 특이적 IgG의 부재 또는 존재 하에 CDC 실험에서 따로 첨가할 것이다.  $0.1 \times 10^6$  개의 Daudi 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g/mL}$ )의 정제되지 않은 항체 또는 항체 혼합물과 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션할 것이다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션할 것이다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다.

[0730] 7D8-E345R/K439E/S440K는 야생형 HuMAb 7D8과 비교하여 증진된 효율로 CDC를 유도할 것으로 예상된다. 7D8-E345R/K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하면 야생형 7D8 항체와 비교하여 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다. 마찬가지로, 005-E345R/K439E/S440K가 야생형 005 항체와 비교하여 증진된 효율을 갖는 CDC를 가능하게 할 것으로 예상된다. 005-E345R/K439E/S440K에 비특이적 IgG를 첨가하면 야생형 005 항체와 비교하여 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

[0731] 실시예 19

[0732] CDC 검정에 의해 검출된 Fc:Fc 상호작용 매개된 항체 올리고머화를 자극하는 돌연변이를 확인하기 위해 돌연변이체 스크리닝 접근법의 사용

[0733] 실시예 6 및 10에 기재된 바와 같이, 가변 수준의 항원을 발현하는 다수의 세포주 상에서 2개의 상이한 표적 항원, CD20 및 CD38을 인식하는 항체에 대한 CDC를 자극한 아미노산 돌연변이가 확인되었다. 놀랍게도, 단일 점 돌연변이 E345R은 Wien133 세포의 CDC-의존성 세포 용해가 야생형 IgG1 포맷에서 CDC에 의해 이들 세포를 용해시키지 못한 항-CD38 항체 005에 적용되도록 하기에 충분한 것으로 입증되었다.

[0734] Fc:Fc 인터페이스 상에 또는 그의 주변에서 다른 돌연변이는 유사한 양식으로 올리고머화 및 CDC를 자극할 수 있었다. 대안적으로, 돌연변이는 예를 들어 Fc:Fc 상호작용을 알로스테릭 방식으로 유도함으로써 올리고머화를 간접적으로 자극할 수 있었다.

[0735] 다른 아미노산 돌연변이가 Fc-매개 항체 올리고머화를 자극할 수 있는지 결정하기 위해, 항-CD38 IgG1-005 돌연변이체의 라이브러리를 CDC 검정을 이용하여, 둘 다 개별적으로 스크리닝하고, 예를 들어 Fc:Fc 인터페이스를 가로질러 상호작용하는 아미노산 쌍을 선택하기 위해 쌍별 방식으로 혼합하였다. 그러나, 동일한 전략이 다른 항체, 예컨대 또 다른 IgG1 또는 IgG3 항체에 적용될 수 있다.

[0736] 표 16에 지시된 위치에서의 돌연변이에 중점을 둔 라이브러리를 생성하였다. 쿼체인지 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타진, 미국)를 사용하여 돌연변이를 IgG1-005 Fc 영역 내로 도입하였다. 간략하게, 각각의 목적하는 돌연변이 위치에 대해, 목적하는 위치에서 축중성 코돈을 코딩하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, IgG1m(f) 동종이형을 갖는 005 중쇄의 전장 플라스미드 DNA 주형을 복제하였다. 생성된 DNA 혼합물을 DpnI를 사용하여 소화시켜 공급원 플라스미드 DNA를 제거하고, 이. 콜라이를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 생성된 콜로니를 모으고 배양하고, 플라스미드 DNA를 이들 풀로부터 분리하고, 이. 콜라이 내로 재형질전환시켜 클론 콜로니를 얻었다. 생성된 콜로니로부터 분리한 돌연변이체 플라스미드 DNA를 DNA 서열분석에 의해 검토하였다 (LGC 게노믹스(LGC genomics, 독일 베를린)). PCR에 의해 플라스미드 DNA로부터 발현 카세트를 증폭시키고, IgG1-005의 돌연변이체 중쇄 및 야생형 경쇄를 모두 함유하는 DNA 혼합물을 본질적으로 제조업체가 설명한 바와 같이 293펙틴 (인비트로젠, 미국)을 사용하여 프리스타일 HEK293F 세포 (인비트로젠, 미국)에 일시적으로 형질 감염시켰다. 항체 돌연변이체를 함유하는 형질감염된 세포의 상청액을 수집하였다. 돌연변이체 항체 상청액을 다음과 같이 둘 다 개별적으로 및 쌍별 혼합물로 CDC 검정에서 스크리닝하였다.

[0737]  $0.1 \times 10^6$  개의 Daudi 또는 Wien-133 세포 (Raji 세포와 같은 다른 세포 유형이 사용할 수 있음)를 둥근-바닥

96-웰 플레이트에서 1.0 ug/ml의 정제되지 않은 항체와 100 μL의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 30 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (30% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0738] 표 16, 표 17 및 표 18에 기재된 돌연변이를 단일 돌연변이체로서 또는 다른 돌연변이체와 혼합될 때, 예를 들어 Fc:Fc 인터페이스를 가로질러 돌연변이에 대항될 때 CDC 효율에 의해 검출될 때 올리고머화를 증진시키는 그의 능력에 대해 선택하였다. 임의로, 돌연변이를 Fc 도메인에 의해 매개된 FcRn, 단백질-A 또는 단백질-G 결합, ADCC, ADCC 또는 다른 이펙터 기능을 손상하지 않는 그의 능력에 대해 추가로 스크리닝할 수 있다. 상기 자극성 점 돌연변이를 하나의 Fc 도메인 내로 조합하면 올리고머화 및 CDC 효율을 훨씬 더 자극할 수 있다.

[0739] CD38 항체 005 내에 포함된 CH2-CH3 영역 내의 돌연변이를 Daudi 세포에 대한 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 돌연변이체 항체의 용해를 야생형 005에 비교하였고, 그에 대한 용해를 100%로 설정하였다. 억제에 대한 컷오프를 ≤66% 용해로 설정하였다. 이러한 방식으로 측정할 때, 대부분의 시험된 돌연변이는 CDC를 억제하였다 (표 16 참조).

[0740] CD38 항체 005 내에 혼입된 CH2-CH3 영역 내의 돌연변이를 Wien133 세포에 대한 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 증진시키는 그의 능력에 대해 시험하였다 (표 17). 야생형 CD38 항체 005는 Wien133 세포에 대한 CDC를 유도할 수 없다. ≥39% 세포 용해를 나타내는 돌연변이체를 증진으로서 스코어링하였다. 완전히 예상외로, 아미노산 E345 및 E430의 실질적으로 모든 수득된 치환이 CDC에 의한 세포 용해를 자극하였다. 이러한 결과를 입증하기 위해, 아미노산 E345, E430 및 S440을 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 각각의 가능한 돌연변이로 치환하고, 새로운 인간 혈청 배치를 사용하여 Wien133 세포에 대한 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 증진시키는 그의 능력에 대해 시험하였고, 다소 더 효율적인 용해를 얻었다 (표 18). 다시, E345 및 E430의 모든 치환은 Wien133 세포의 효율적인 CDC를 유도하였다.

[0741] 하기 바람직한 돌연변이는 Wien133 세포의 ≥39% 세포 용해를 유발하였다: P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W.

[0742] [표 16]

1.0 μg/ml IgG1-005 항체 점 돌연변이의 존재 하의 daudi 세포의 용해 백분율. IgG1-005 야생형은 이러한 조건 하에 세포의 66%를 용해시켰다. 또 다른 아미노산에 의해 치환된 개별 위치가 각각 외부 좌측 칼럼에 주어진다. 각각의 특정한 위치에서 치환된 아미노산이 주어지고, 그 뒤에 측정된 용해 백분율이 개별 위치의 수평 열의 괄호 ()에 표기된다.

|        |        |          |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 위치     |        |          |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| P247   | A (42) | C (67)   | D (91)  | F (93) | G (95) | H (80) | I (89) | K (96) | L (13) | M (83) | N (78) | R (93) | S (93) | T (10) | V (9)  | W (82) |        |        |
| I253   | A (17) | D (12)   | K (13)  | M (6)  | N (5)  | R (7)  | S (6)  | V (94) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S254   | E (14) | F (75)   | G (100) | H (46) | I (93) | K (86) | L (99) | P (4)  | T (8)  | W (7)  |        |        |        |        |        |        |        |        |
| H310   | K (6)  | W (87)   |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Q311   | A (53) | C (72)   | E (5)   | F (90) | G (68) | H (72) | I (92) | K (93) | L (96) | N (53) | P (97) | R (87) | S (66) | T (54) | W (93) | Y (85) |        |        |
| E345   | A (85) | C (91)   | F (95)  | G (86) | H (83) | I (96) | K (94) | L (98) | M (94) | N (97) | P (74) | R (98) | S (93) | T (82) | V (92) | W (95) | Y (95) |        |
| D/E356 | G (88) | I (95)   | L (94)  | R (97) | T (97) | V (98) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| T359   | G (88) | N (93)   | P (87)  | R (96) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| E382   | F (3)  | K (3)    | L (99)  | M (90) | P (3)  | V (96) | W (3)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| G385   | D (28) | H (9)    | Q (24)  | R (27) | S (14) | T (10) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Q386   | A (56) | C (18)   | D (6)   | E (9)  | F (11) | G (10) | H (26) | I (42) | K (98) | L (15) | N (25) | P (6)  | R (10) | S (43) | T (12) | V (53) | W (13) | Y (42) |
| E430   | A (97) | F (97)   | G (99)  | H (98) | L (95) | P (95) | Q (90) | R (96) | S (94) | V (98) |        |        |        |        |        |        |        |        |
| N434   | D (5)  | E (5)    | K (5)   | R (5)  | S (6)  | W (98) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Y436   | I (98) | K (7)    | L (10)  | R (35) | S (8)  | T (7)  | W (6)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Q438   | E (5)  | K (6)    | S (5)   | T (8)  | W (10) | Y (31) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| K439   | A (6)  | D (5)    | H (5)   | L (5)  | P (8)  | T (4)  | Y (7)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S440   | A (61) | C (10)   | D (95)  | E (24) | F (13) | G (40) | I (8)  | N (33) | R (11) | T (28) | Y (98) |        |        |        |        |        |        |        |
| K447   | E(20)  | *del(90) |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |

\*"del"은 표기된 위치에 아미노산 잔기의 결실이 존재한다는 것을 의미한다.

[0743]



[0744] [표 17]

1.0 µg/ml IgG1-005 항체 점 돌연변이의 존재 하의 Wien-133 세포의 용해 백분율. IgG1-005 야생형은 이러한 조건 하에 세포의 3%를 용해시켰다. 또 다른 아미노산에 의해 치환된 개별 위치가 각각 외부 좌측 칼럼에 주어진다. 각각의 특정한 위치에서 치환된 아미노산이 주어지고, 그 뒤에 측정된 용해 백분율이 개별 위치의 수평 열의 괄호 ()에 표기된다.

| 위치     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--|
| P247   | A (5)  | C (5)  | D (12) | F (16) | G (50) | H (11) | I (10) | K (14) | L (4)  | M (13) | N (7)  | R (10) | S (7)  | T (4)  | V (3)  | W (9)  |       |       |  |
| I253   | A (11) | D (9)  | K (3)  | M (3)  | N (3)  | R (4)  | S (3)  | V (51) |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| S254   | E (14) | F (10) | G (32) | H (2)  | I (15) | K (12) | L (65) | P (2)  | T (9)  | W (9)  |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| H310   | K (3)  | W (13) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| Q311   | A (9)  | C (4)  | E (3)  | F (19) | G (4)  | H (6)  | I (28) | K (16) | L (55) | N (6)  | P (12) | R (18) | S (9)  | T (3)  | W (41) | Y (12) |       |       |  |
| E345   | A (57) | C (22) | F (48) | G (47) | H (49) | I (59) | K (42) | L (72) | M (67) | P (51) | R (64) | S (60) | T (53) | V (67) | W (52) | Y (70) |       |       |  |
| D/E356 | G (39) | I (31) | L (30) | R (64) | T (32) | V (13) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| T359   | G (2)  | N (3)  | P (4)  | R (40) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| E382   | F (2)  | K (2)  | L (44) | M (21) | P (3)  | V (53) | W (2)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| G385   | D (5)  | H (4)  | N (18) | Q (4)  | R (14) | S (4)  | T (4)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| Q386   | A (3)  | C (4)  | D (4)  | E (4)  | F (3)  | G (3)  | H (3)  | I (4)  | K (60) | L (3)  | N (4)  | P (2)  | R (4)  | S (3)  | T (3)  | V (3)  | W (3) | Y (4) |  |
| E430   | A (54) | F (68) | G (55) | H (57) | L (58) | P (56) | Q (31) | R (39) | S (20) | V (53) |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| N434   | D (2)  | E (2)  | K (2)  | R (2)  | S (3)  | W (18) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| Y436   | I (49) | K (3)  | L (4)  | R (3)  | S (3)  | T (2)  | W (3)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| Q438   | E (3)  | K (3)  | S (2)  | T (2)  | W (2)  | Y (2)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| K439   | A (3)  | D (2)  | H (2)  | L (2)  | P (2)  | T (2)  | Y (4)  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |  |
| S440   | A (3)  | C (3)  | D (6)  | E (2)  | F (2)  | G (3)  | I (2)  | N (2)  | R (2)  | T (3)  | Y (64) |        |        |        |        |        |       |       |  |

[0745]

[0746] [표 18]

1.0 µg/ml IgG1-005 항체 점 돌연변이의 존재 하의 Wien-133 세포의 용해 백분율. IgG1-005 야생형은 이러한 조건 하에 세포의 12%를 용해시켰다. 또 다른 아미노산에 의해 치환된 개별 위치가 각각 외부 좌측 칼럼에 주어진다. 각각의 특정한 위치에서 치환된 아미노산이 주어지고, 그 뒤에 측정된 용해 백분율이 개별 위치의 수평 열의 괄호 ()에 표기된다.

| 위치   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| E345 | A (94) | C (87) | D (76) | F (95) | G (95) | H (94) | I (93) | K (97) | L (94) | M (96) | N (93) | P (97) | Q (98) | R (94) | S (93) | T (92) | V (96) | W (93) | Y (94) |
| E430 | A (95) | C (79) | D (91) | F (96) | G (96) | H (95) | I (96) | K (83) | L (94) | M (75) | N (95) | P (97) | Q (86) | R (92) | S (96) | T (97) | V (96) | W (98) | Y (97) |
| S440 | A (12) | C (8)  | D (41) | E (9)  | F (7)  | G (8)  | H (26) | I (7)  | K (6)  | L (7)  | M (8)  | N (12) | P (10) | Q (21) | R (9)  | T (10) | V (7)  | W (86) | Y (90) |

[0747]

[0748] 실시예 20

[0749] 피하 B 세포 림프종 이중이식편 모델에서 IgG1-7D8-E345R의 생체내 효능

[0750]

IgG1-7D8-E345R 항체의 생체내 항-종양 효능을 Raji-luc #2D1 세포를 사용하는 피하 모델에서 평가하였다. 이들 세포는 세포당 ~300,000개의 CD20 분자 (QIFIKIT 분석에 의해 결정됨, 데이터는 제시되지 않음) 및 높은 보체 방어 수용체 발현을 나타낸다. 세포를 10% 코스믹 송아지 혈청 (하이클론, 유타주 로간), 페니실린 및 스트렙토마이신, 1% (v/v) 피루브산나트륨 및 1 µg/mL 퓨로마이신 (P-8833, 시그마(Sigma), 쯔빈드레흐트)를 함유하는 RPMI 내에서 배양하였다. 세포를 log-상 (약 70% 전면성장률)에서 수거하였다. 6 내지 11주령 암컷 SCID 마우스 (C.B-17/IcrPrkdc-scid/CRL)를 이용하였다 (찰스-리버). 제0일에, 200 µL PBS 중의 5x10<sup>6</sup> 개 Raji-luc #2D1 세포를 각각의 마우스의 우측 측복부에 피하 주사하였다. 종양 발생을 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 평균 종양 부피가 100 mm<sup>3</sup> 일 때 (약 제7일), 마우스를 군 (n = 9)으로 분류하고, 마우스당 50 µg 항체의 단일 용량 (2.5 mg/kg)의 복강내 (i.p.) 주사에 의해 처리하였다. 모든 항체 샘플을 비관련 항체 b12로 보충하여 0.5 mg/mL의 총 항체 농도를 얻었다. 처리 군은 표 18에 제시된다. 처리 7일 후에, 정확한 항체 투여를 검토하기 위해 인간 IgG 혈청 수준을 결정하기 위해 혈액 샘플을 얻었다. 종양을 1500 mm<sup>3</sup>의 종점 종양 부피까지, 종양이 껍질화를 보일 때 또는 중증 임상 신호가 관찰될 때까지 캘리퍼 (PLEXX)를 사용하여 적어도 1주에 2회 측정하였다.

[0751] [표 18]

처리군 및 투여.

| 군               | 항체             | 용량                  |
|-----------------|----------------|---------------------|
| 1. 야생형          | IgG1-7D8-WT    | 50 µg (= 2.5 mg/kg) |
| 2. CDC-중진 돌연변이체 | IgG1-7D8-E345R | 50 µg (= 2.5 mg/kg) |
| 3. 비관련 Ab 대조군   | IgG1-b12       | 50 µg (= 2.5 mg/kg) |

[0752]

[0753]

도 15a는 모든 군이 여전히 완전할 때 제22일에 평균 종양 성장을 보여준다. 야생형 항체 IgG1-7D8은 음성 대조군 항체 IgG1-b12와 비교하여 종양 성장을 다소 억제하였지만, 이것은 통계학적으로 유의하지 않았다. 오직 IgG1-7D8-E345R만이 음성 대조군 항체 IgG1-b12와 비교하여 유의하게 종양 성장을 억제하였다 (1원 ANOVA 분석



$p < 0.01$ ).

[0754] 도 15b는  $700 \text{ mm}^3$ 보다 더 작은 종양 크기를 갖는 마우스의 백분율의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯을 보여준다. 음성 대조군 항체 IgG1-b12로 처리된 마우스와 비교하여, IgG1-7D8-E345R 항체 (만텔-콕스(Mantel-Cox) 분석  $p < 0.01$ )로 처리된 마우스에서 종양 형성이 유의하게 지연되었으나, 야생형 IgG1-7D8로 처리된 마우스에서는 그렇지 않았다.

[0755] 이들 데이터는 E345R 돌연변이가 CD20 항체 7D8의 생체내 항-종양 효능을 증진시켰다는 것을 보여준다.

[0756] 실시예 21

[0757] 피하 B 세포 림프종 모델에서 IgG1-005-E345R의 생체내 효능

[0758] IgG1-005-E345R 항체의 생체내 항-종양 효능을 Raji-luc #2D1 세포를 사용하는 피하 모델에서 평가하였다. 이들 세포는 세포당 ~150,000개의 CD38분자 (QIFIKIT 분석에 의해 결정됨, 데이터는 제시되지 않음) 및 높은 보체 방어 수용체 발현을 보인다. 종양 접종 및 측정을 위한 프로토콜은 실시예 20에 기재된 바와 기본적으로 동일하다. 제0일에,  $200 \mu\text{L}$  PBS 내의  $5 \times 10^6$ 개 Raji-luc #2D1 세포를 SCID 마우스의 우측 측복부에 s.c. 주사하였다. 평균 종양 부피가  $100 \text{ mm}^3$ 일 때 (약 제7일), 마우스를 군 ( $n = 7$ )으로 분류하고, 마우스당  $500 \mu\text{g}$  항체의 단일 용량 ( $25 \text{ mg/kg}$ )의 i.p. 주사에 의해 처리하였다. 처리군을 표 19에 제시한다. 주요 불편을 피하기 위해  $1500 \text{ mm}^3$ 의 종점 종양 부피까지 또는 종양이 궤양화를 보이거나 중증 임상 신호가 관찰될 때까지 종양을 측정하였다.

[0759] 도 16a는 모든 군이 여전히 완전할 때 제21일에 평균 종양 성장을 보여준다. 야생형 항체 IgG1-005는 종양 성장을 다소 억제하였지만, 이것은 통계학적으로 유의하지 않았다. 오직 IgG1-005-E345R만이 제21일에 비관련 항체 대조군과 비교하여 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (1원 ANOVA  $p < 0.05$ ).

[0760] 도 16b는  $500 \text{ mm}^3$ 보다 더 작은 종양 크기를 갖는 마우스의 백분율의 카플란-마이어 플롯을 보여준다. 종양 형성은 음성 대조군 항체 IgG1-b12 (만텔-콕스 분석  $p < 0.001$ ) 또는 야생형 IgG1-005 ( $p < 0.05$ )로 처리된 마우스와 비교하여 IgG1-005-E345R 항체로 처리된 마우스에서 유의하게 지연되었다.

[0761] 이들 데이터는 CD38 항체 005 내에 E345R 돌연변이의 도입이 생체내 항-종양 활성을 증진시켰다는 것을 보여준다.

[0762] [표 19]

처리군 및 투여.

| 군               | 항체             | 용량  |
|-----------------|----------------|---|
| 1. 야생형          | IgG1-005-WT    | $500 \mu\text{g}$ (= $25 \text{ mg/kg}$ ) |
| 2. CDC-중진 돌연변이체 | IgG1-005-E345R | $500 \mu\text{g}$ (= $25 \text{ mg/kg}$ ) |
| 3. 비관련 Ab 대조군   | IgG1-b12       | $500 \mu\text{g}$ (= $25 \text{ mg/kg}$ ) |

[0763]

[0764] 실시예 22

[0765] 1가 표적 결합은 E345R 항체의 CDC 효능을 추가로 증진시킨다

[0766] b12 결정 구조 내에서 관찰된 IgG1 욕량체 고리의 분자 표면은 욕량체 고리 내의 각각의 IgG에 대해, 2개의 C1q 결합 부위 중 하나는 고리 구조의 상향으로 대향하고 다른 부위는 하향으로 대향하고, 또한 각각의 항체의 하나의 Fab-아암은 위로 배향되고 하나는 아래로 배향하는 것으로 나타나, 항체당 오직 하나의 Fab-아암이 항원 결합에 참여하도록 하고, 이것은 욕량체 항체 고리 내에 항체 분자당 1가 결합을 제안한다. 1가성은 항체를 욕량체화 적합성 배향으로 항원 결합시킬 수 있다. 상기 가설을 시험하기 위해, E345R 돌연변이를 갖는 이중특이적 CD38/EGFR 항체의 CDC 효능을 CD38-양성, EGFR-음성 Wien133 세포 (이러한 이중특이적 항체는 여기에 CD38을 통해 오직 1가로 결합할 수 있음) 상에서 시험하고, 또한 E345R 돌연변이를 갖는 2가 결합 CD38 항체의 CDC 효능과 비교하였다. 인간 모노클로날 항체 HuMax-EGFr (2F8, WO 2004/056847에 기재됨)를 본 실시예에 기재된 EGFR 항체에 대한 기준으로 사용하였다.

[0767] 이중특이적 항체를 듀오바디™ 플랫폼에 따라, 즉, WO 2011/147986에 기재된 바와 같이 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환에 따라 시험관내에서 생성하였다. 이러한 방법에 대한 기초는 상보성 CH3 도메인의 사용이고, 이것은 특

이적 검정 조건 하에 이중이량체 형성을 촉진한다. 이 방법에 의해 이중특이적 항체의 생산을 가능하게 하기 위해, CH3 도메인에 특정 돌연변이를 보유하는 IgG1 분자를 생성하였다: 모 IgG1 항체 중 하나에 F405L 돌연변이를, 다른 모 IgG1 항체에 K409R 돌연변이를 보유한다. 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 이들 2개의 모 항체를 (각각의 항체에 대해, 0.5 mg/mL의 최종 농도에서) 25 mM 2-메르캅토에틸아민-HCl (2-MEA)와 함께 100  $\mu$ L TE의 총 부피로 37°C에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 회전 칼럼 (마이크로콘 원심분리 필터, 30k, 밀리포어(Millipore))을 사용하여 환원제 2-MEA를 제거할 때 환원 반응이 중단된다.

[0768] CDC 검정을 위해,  $0.1 \times 10^6$  개의 Wien133 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도의 항체 (0.01 내지 10.0  $\mu$ g/mL)와 함께 100  $\mu$ L의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu$ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu$ L 아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0769] 도 17은 예상된 바와 같이, E345R 돌연변이가 없는 CD38 항체 (야생형 IgG1-005 및 IgG-b12-K409R x IgG1-005-F405L)가 Wien133 세포의 사멸을 유도하지 않았음을 보여준다. 또한, EGFR-음성 Wien133 세포에 결합하지 않는 (데이터는 제시되지 않음) EGFR 항체 IgG1-2F8-E345R/F405L은 예상된 바와 같이 CDC를 유도하지 않았다. K409R 돌연변이의 도입은 Wien133 세포 상에서 ~60% 사멸을 유도하는 (실시에 10에 기재됨) IgG1-005-E345R 항체의 능력에 영향을 미치지 않았다. 흥미롭게도, CD38-양성, EGFR-음성 Wien133 세포에 오직 1가로 결합할 수 있는 이중특이적 CD38/EGFR 항체 IgG1-005-E345R/K409R x IgG1-2F8-E345R/F405L은 증가된 최대 CDC 사멸 (~60% 내지 ~100% 사멸)을 나타내었다.

[0770] 이들 데이터는 1가 표적화가 CDC 증진 E345R 돌연변이를 함유하는 항체의 최대 사멸 능력을 추가로 증진시킬 수 있음을 보여준다. 또한, 이러한 데이터는 CDC 활성을 증진시킴으로써 측정할 때 E345R 올리고머화 증진 돌연변이가 다른 항체 형식, 예컨대 듀오바디에 적용될 수 있음을 보여준다.

[0771] **실시에 23**

[0772] **올리고머화 증진 E345R 돌연변이는 다른 항체 포맷, 예컨대 듀오바디™에 적용될 수 있다**

[0773] E345R 돌연변이의 효과를 듀오바디 형식의 이중특이적 항체에서 시험하였다. CDC 검정은 CD20-양성, CD38-양성 Wien133 및 Raji 세포 상에서 CD20/CD38 이중특이적 항체를 사용하여 수행하였다.

[0774] 이중특이적 항체를 실시에 22에 기재된 바와 같이 생성하였다. CDC 검정을 위해,  $0.1 \times 10^6$  개 Wien133 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.01 내지 30.0  $\mu$ g/mL)의 항체와 100  $\mu$ L의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu$ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu$ L 아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0775] 도 18은 E345R 돌연변이의 도입이 Wien 133 (도 18a) 및 Raji (도 18b) 세포 상에서 이중특이적 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R 항체의 CDC를 증진시켰다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 E345R 올리고머화 증진 돌연변이가 CDC 활성을 증진시키기 위해 다른 항체 포맷에 적용될 수 있음을 보여준다.

[0776] **실시에 24**

[0777] **E345R은 EGFR 항체 2F8에 의한 CDC를 회복하고, 이것은 1가 표적 결합에 의해 추가로 증진될 수 있다**

[0778] 실시에 6, 10 및 26에 기재된 바와 같이, E345R은 상이한 혈액 종양 표적 (CD20 및 CD38)을 인식하는 항체에 대한 CDC를 증진 또는 회복시켰다. 고형 종양 항원으로 분석을 확장하기 위해, EGFR 항체 2F8의 CDC 능력에 대한 E345R의 효과를 A431 표피양 암종 세포 상에서 시험하였다. 또한, E345R-매개 CDC 유도에 대한 1가 EGFR 표적화의 효과를 EGFR-양성, CD20-음성 A431 세포 상에서 이중특이적 EGFRxCD20 항체 (IgG1-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R)를 사용하여 시험하였다.

[0779] 이중특이적 항체를 실시에 22에 기재된 바와 같이 생성하였다. CDC 검정을 위해,  $5 \times 10^6$  개 A431 세포/mL를 100  $\mu$ Ci  $^{51}\text{Cr}$ 로 1시간 동안 37°C에서 표지하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고,  $1 \times 10^5$  개 세포/mL의 농도로 배지 내에 재현탁시켰다. 25,000개의 표지된 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (3배 희석으로 0-30  $\mu$ g/mL)의 정제되지 않은 항체와 100  $\mu$ L의 총 부피로 15분 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 이어서, 50  $\mu$ L

정상 인간 혈청 회석액을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (25% 최종 농도), 37℃ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 회전 침강시키고 (300xg에서 3분), 25  $\mu$ L 상청액을 15분 동안 진탕기 (750 rpm) 상에서 인큐베이션하는 동안 백색 96웰 옵티플레이트 (퍼킨엘머(PerkinElmer))에서 100  $\mu$ L 마이크로싯트에 첨가하였다.  $^{51}\text{Cr}$  방출을 섬광 계수기 상에서 분당 카운트 (cpm)로 결정하였다. 최대 용해 (100%)는 트리톤 X-100-처리된 세포의 상청액 내에서 측정된  $^{51}\text{Cr}$  수준에 의해 결정하였다. 자발적 용해는 항체 없이 인큐베이션한 세포의 상청액 내에서 측정된  $^{51}\text{Cr}$  수준에 의해 결정하였다. 특이적 세포 용해를 하기 화학식에 따라 계산하였다: 특이적 용해 =  $100 \times (\text{cpm 샘플} - \text{cpm 자발적 용해}) / (\text{cpm 최대} - \text{cpm 자발적 용해})$ .

[0780] 도 19는 IgG1-2F8-E345R/F405L은 CDC에 의해 A431 세포를 용해시킬 수 있지만, 야생형 2F8은 A431 세포를 사멸시킬 수 없다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 CDC 활성이 E345R 돌연변이의 도입에 의해 EGFR 항체 2F8에서 회복될 수 있음을 보여준다. 이것은 잠재적으로 CDC 증진 E345R 돌연변이의 적용가능성을 고품종 종양 항원을 표적으로 하는 항체로 확장시킨다.

[0781] 이중특이적 EGFRxCD20 항체 IgG-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R은 EGFR-양성, CD20-음성 A431 세포 상에서 추가의 CDC 증진을 나타내었다.

[0782] 이들 데이터는 1가성이 실시예 22에 기재된 CD38 결합 항체에 대해 가정된 Fc-Fc 상호작용의 형성 및 후속적인 CDC 유도를 용이하게 한다는 가설을 추가로 지지한다.

[0783] **실시예 25**

[0784] **E345R은 CD38 항체 003 및 CD20 항체 11B8 및 리톡시맵에 의한 CDC를 증진 또는 회복시킨다**

[0785] 실시예 6, 10 및 24에 기재된 바와 같이, E345R은 가변 수준의 항원을 발현하는 다수의 세포주 상에서 시험할 때 상이한 표적 특이성 (CD20, CD38 및 EGFR)을 갖는 몇몇 항체의 CDC 활성을 증진 또는 유도한다. 따라서, E345R 돌연변이의 도입은 기존의 항체에 대한 CDC를 증진 또는 회복시키기 위한 일반 메카니즘인 것으로 여기기에 이르렀다. 이를 추가로 뒷받침하기 위해, CDC에 대한 E345R 돌연변이의 효과를 Daudi 및 Wien133 세포에 대해 가변 본질적 CDC 효능을 갖는 보다 많은 항체에 대해 시험하였다: WO 2006/099875에 기재된 CD38 항체 003 및 WO 2005/103081에 기재된 CD20 항체 리톡시맵 (유형 I) 및 11B8 (유형 II). CD20 항체는 2개의 하위군으로 분리될 수 있다 (Beers et al. Seminars in Hematology 47, (2) 2010, 107-114). 유형 I CD20 항체는 CD20 분자를 형질막 내에서 항체 Fc 영역을 클러스터링시키는 지질 래프트 내로 재분포시키고 개선된 C1q 결합을 가능하게 함으로써 보체를 활성화시키고 CDC를 도출하는 현저한 능력을 나타낸다. 유형 II CD20 항체는 CD20 분포를 눈에 띄게 변화시키지 않고, 수반하는 클러스터링 없이, CDC에서 비교적 비효과적이다.

[0786]  $0.1 \times 10^6$  개의 Daudi 또는 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0  $\mu\text{g/mL}$ )의 정제되지 않은 항체와 70  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 30  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (30% 최종 농도), 37℃ 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0787] 도 20은 E345R 돌연변이가 (a) Daudi 세포 및 (b) Wien133 세포 둘 다에서 모든 처리된 항체에 대한 CDC를 증진시켰다는 것을 보여준다. 흥미롭게도, 사용된 농도에서 야생형 포맷으로 CDC를 유도하지 않는 모든 항체가 E345R 돌연변이: Daudi 세포에서 CD38 mAb 003 및 CD20 유형 II mAb 11B8, 및 Wien133 세포에서 CD38 mAb 005 및 003 및 CD20 유형 II mAb 11B8의 도입 후에 CDC를 효율적으로 유도하였다. 이러한 데이터는 보다 구체적으로 E345R 돌연변이의 도입에 의한 항체 올리고머화의 증진이 기존 항체에 의한 CDC를 증진 또는 회복시키는 일반 메카니즘임을 제안한다.

[0788] **실시예 26**

[0789] **E345R은 조직 인자 항체의 내재화를 증진시킨다**

[0790] 증진된 올리고머화가 증가된 항체 내재화를 유도할 수 있는지 시험하기 위해, 리소솜 마커 LAMP1과 야생형 및 E345R 돌연변이된 조직 인자 (TF) 항체의 공동국재화 연구를 공초점 현미경에 의해 수행하였다.

[0791] SK-OV-3 세포를 유리 커버슬립 (두께 1.5 마이크로미터, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific, 독일 브라운슈바이크) 상에서 표준 조직 배양 배지 내에서 37℃에서 1일 동안 성장시켰다. 세포를 1시간 동안 50

$\mu\text{g/mL}$  류벡틴 (시그마)과 함께 예비-인큐베이션하여 리소솜 활성을 차단하고, 그 후  $10\mu\text{g/mL}$  조직 인자 (TF) 항체 (WO 2010/066803)를 첨가하였다. 세포를 추가로 1, 3 또는 16시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 30분 동안 실온 (RT)에서 4% 포름알데히드 (클리니패스(Klinipath))와 인큐베이션하였다. 슬라이드를 차단 완충제 (0.1% 사포닌 (로슈) 및 2% BSA (로슈)를 보충한 PBS)로 세척하고,  $20\text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 함유하는 차단 완충제와 함께 20분 동안 인큐베이션하여 포름알데히드를 퀀칭시켰다. 슬라이드를 차단 완충제로 다시 세척하고, 45분 동안 RT에서 리소솜 LAMP1을 확인하기 위해 마우스-항-인간 CD107a-APC (BD 파밍겐(BD Pharmingen)) 및 TF 항체를 확인하기 위해 염소-항-인간 IgG-FITC (잭슨)의 각테일과 인큐베이션하였다. 슬라이드를 차단 완충제로 다시 세척하고,  $20\mu\text{L}$  마운팅 배지 (6 그램 글리세롤 (시그마) 및 2.4 그램 모위올 (Mowiol) 4-88 (옵니레보(Omnilabo))을  $12\text{ mL}$   $0.2\text{ M}$  트리스 (시그마) pH 8.5를 첨가한 후 10분 동안  $50\text{--}60^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션한  $6\text{ mL}$  증류수에 용해시키고; 마운팅 배지를 분취하고  $-20^\circ\text{C}$ 에서 저장함)를 사용하여 현미경 슬라이드 상에 밤새 마운팅하였다. 슬라이드를  $63\times 1.32\text{--}0.6$  오일 침지 대물 렌즈 및 LAS-AF 소프트웨어가 장착된 라이카(Leica) SPE-II 공초점 현미경 (라이카 마이크로시스템즈(Leica Microsystems))을 사용하여 영상화하였다.

[0792] 12-비트 흑백(grayscale) TIFF 영상을 메타모र्फ(MetaMorph)® 소프트웨어 (버전 메타 시리즈 (Meta Series) 6.1, 몰레큘라 디바이시스 인크 (Molecular Devices Inc, 미국 캘리포니아 서니베일))를 이용하여 공동국재화에 대해 분석하였다. 영상을 적층시키고, 배경을 공제하였다. 동일한 역치 설정을 모든 FITC 영상 및 모든 APC 영상에 대해 사용하였다 (수동으로 설정). 공동국재화를 관심 영역 (ROI) 내의 FITC의 픽셀 강도로서 표시하였고, ROI는 모든 APC 양성 영역으로 이루어진다. 상이한 TF 항체로 염색된 상이한 슬라이드를 비교하기 위해, 영상을 APC의 픽셀 강도를 이용하여 정규화하였다. 마우스-항-인간 CD107a-APC를 사용하여 리소솜 마커 LAMP1 (CD107a)를 염색하였다. LAMP1의 픽셀 강도는 영상화한 다양한 TF 항체 사이에 상이하지 않아야 한다.

[0793] FITC 및 APC의 공동국재화에 대한 정규화된 값은 식  $[(\text{TPI FITC} \times \text{공동국재화 백분율})/100] \times [1/\text{TPI APC}]$ 에 따른 임의 단위로서 표현된다.

[0794] 공동국재화 백분율 = APC 픽셀과 공동국재화되는 TPI FITC / TPI APC

[0795] TPI, 전체 픽셀 강도

[0796] 도 21은 APC-표지된 리소솜 마커와 겹치는 야생형 및 E345R 돌연변이된 TF 항체의 FITC 픽셀 강도의 양을 도시한다. 시험된 각각의 항체 또는 조건에 대해, ~1, 3 또는 >5 셀을 함유하는 하나의 슬라이드로부터 3개의 상이한 영상을 분석하였다. 각각의 슬라이드 내에서 상이한 영상 사이에서 변동이 관찰되었다. 여전히, 항체 011 및 098에 대한 E345R 돌연변이가 야생형 011 및 098과 비교하여 1시간 인큐베이션 후에 증가된 리소솜 공동국재화를 일으켰음은 명백하였다. 이들 결과는 돌연변이 E345R이 보다 신속한 내재화 및 리소솜 공동국재화를 유도하고 따라서 항체 약물 집합체를 강화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0797] 실시예 27

[0798] 유사한 CD20 발현을 갖지만 상이한 수준의 막-결합 보체 조절 단백질을 갖는 상이한 B 세포주에서 리톡시맙 내에 E345R 돌연변이에 의해 증진된 CDC

[0799] 실시예 25 및 28은 Daudi 및 Wien133 세포에 대한 야생형 리톡시맙의 CDC 효능이 E345R 돌연변이를 도입함으로써 증진되었음을 보여준다. 이러한 증진된 CDC 효능은 Fc-Fc 상호작용의 E345R-매개 안정화로부터 기인한다. 이어서, 표적 세포 막 상에서 공동으로 형성된 육량체 항체 고리 구조는 세포 막에 가까운 활성화된 보체 성분의 포획 및 농축을 용이하게 함으로써 막 공격 복합체의 효율적인 생성을 촉진할 수 있다. 상기 효율적인 보체 활성화의 결과로서, 막-결합 보체 조절 단백질 (mCRP)의 억제 효과는 부분적으로 극복될 수 있다. mCRP, 예컨대 CD55, CD46 및 CD59의 과다발현은 모노클로날 항-종양 항체를 사용하는 성공적인 면역요법에 대한 장벽으로 간주된다 (Jurianz et al., Mol Immunol 1999 36:929-39; Fishelson et al. Mol Immunol 2003 40:109-23, Gorter et al., Immunol Today 1999 20:576-82, Zell et al., Clin Exp Immunol. 2007 Dec 150(3):576-84). 따라서, 리톡시맙-E345R의 효능을 상이한 수준의 mCRP CD46, CD55 및 CD59를 갖지만 대등한 수준의 CD20 표적 발현을 갖는 일련의 B 세포주 상에서 야생형 리톡시맙에 비교하였다.

[0800] B 세포주 Daudi, WIL2-S, WSU-NHL, MEC-2 및 ARH-77은 QIFIKIT 분석에 의해 결정된 바와 같이 대등한 양의 CD20 분자 (~250,000개 특이적 항체-결합 능력 - sABC)를 발현할 수 있다 (데이터는 제시되지 않음). 이들 세포주 사이의 보체 조절 단백질의 발현 수준을 비교하기 위해, QIFIKIT 분석을 수행하여 CD46 (마우스 항-인간 CD46, CBL488, 클론 J4.48 케미콘(Chemicon)), CD55 (마우스 항-인간 CD55, CBL511, 클론 BRIC216, 케미콘),



및 CD59 (마우스 항-인간 CD59, MCA1054x, 클론 MEM-43, 세로텍(Serotec))의 수준을 결정하였다.

- [0801] CDC 검정을 위해,  $0.1 \times 10^6$ 개의 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (4배 희석으로 0.002-40.0  $\mu\text{g/mL}$ )의 포화 항체와 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다. 최대 CDC-매개 사멸은 그래프패드 프리즘 5에서 비-선형 피트의 상위 최적-적합 값을 이용하여 2회의 독립적인 실험으로부터 계산하였다.
- [0802] 도 22a-d는 야생형 리톡시맵에서 E345R의 도입이 모든 시험된 B 세포주에 대해 증가된 최대 용해 및 감소된  $\text{EC}_{50}$ 에 의해 관찰된 바와 같이 증진된 CDC 효능을 발생시켰다는 것을 보여준다.
- [0803] 도 22e는 리톡시맵-E345R 돌연변이체에 의해 유도된 최대 CDC-매개 사멸이 막-결합 보체 조절 단백질의 발현 수준에 무관하게 야생형 리톡시맵보다 항상 더 높다는 것을 보여준다. 이들 데이터는 종양 세포가 E345R 함유 항체에 의한 항체-매개 보체 공격을 피하는데 덜 효과적이므로, E345R의 도입이 모노클로날 항체의 치료 가능성을 증진시킨다는 것을 나타낸다.
- [0804] **실시예 28**
- [0805] **야생형 및 E345R 항체에 대한 CDC 동역학의 비교**
- [0806] Fc:Fc 상호작용 안정화 E345R 돌연변이의 도입은 실시예 6 (Daudi 및 Raji에서 CD20 항체 7D8), 실시예 10 (Daudi, Raji 및 Wien133에서 CD38 항체 005) 및 실시예 25 (Daudi 및 Wien133에서 CD38 항체 003 및 CD20 항체 리톡시맵 및 11B8)에 기재된 상이한 세포주 상에서 상이한 항체에 대한 감소된  $\text{EC}_{50}$  값 및 증가된 최대 용해에 의해 관찰된 바와 같이 CDC를 증진 또는 회복하는 것으로 나타났다. 이어서, 야생형 및 E345R 항체 사이의 CDC 효능의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.
- [0807]  $0.1 \times 10^6$ 개의 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 포화 농도 (10.0  $\mu\text{g/mL}$ )의 항체와 함께 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 0 내지 60분 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [0808] 도 23a는 야생형 CD20 항체 IgG1-7D8이 Raji 세포의 80%의 최대 CDC-매개 사멸을 보였음을 보여주고, 이것은 시험된 조건 하에 5분 후에 이미 달성되었다. 그러나, IgG-7D8-E345R에 대해, Raji 세포의 80% 사멸은 훨씬 더 빨리 3분 후에 관찰되었다. IgG-7D8-E345R에 의한 최대 용해 (95%)는 또한 5분 후에 달성되었다.
- [0809] 도 23b는 또한 사용된 Raji 세포에 대한 CDC를 유도하기 위해 7D8보다 덜 강력한 야생형 CD20 항체 리톡시맵에 대해, E345R 돌연변이의 도입이 표적 세포의 보다 빠른 사멸을 일으켰다는 것을 보여준다. 야생형 리톡시맵은 32%의 최대 CDC-매개 사멸을 나타내었고, 이것은 20분 후에 달성되었다. 리톡시맵-E345R은 대략 3분 후에 이미 32% 사멸에 도달하였고, 특히, 리톡시맵-E345R에 의한 최대 용해 (85%)는 또한 20분 후에 달성되었다.
- [0810] 도 23c+d는 야생형 CD38 항체 IgG1-003 및 IgG1-005에 의한 CDC-매개 사멸에 대해 내성인 사용된 Raji 세포가 E345R 돌연변이를 도입함으로써 빠르게 사멸될 수 있었음을 보여준다. IgG1-003-E345R 및 IgG1-005-E345R은 5분 후에 이미 최대 CDC (각각 50% 및 60%)를 보여주었다.
- [0811] 요약하면, E345R 항체는 그의 야생형 상대보다 더 강력하고, 이것은 보다 큰 효능 (보다 낮은  $\text{EC}_{50}$ ), 증가된 최대 용해 및 CDC 반응의 보다 빠른 동역학의 조합으로부터 기인한다.
- [0812] **실시예 29**
- [0813] **E345R 돌연변이의 존재 또는 부재 하에 이중특이적 항체에 대한 CDC 동역학의 비교**
- [0814] 실시예 23에서, E345R 돌연변이가 듀오바디 플랫폼에 의해 생성된 CD38xCD20 이중특이적 항체 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R에 적용될 수 있어서, Raji 및 Wien133 세포에 대한 CDC 검정에서 감소된  $\text{EC}_{50}$ 에 의해 관찰된 바와 같이 증진된 사멸 능력을 일으키는 것이 설명된다. 이어서, E345R이 있는 및 없는 CD38xCD20 이중특이적 항체 사이의 CDC 효능의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.



- [0815]  $0.1 \times 10^6$ 개의 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 포화 농도 ( $10.0 \mu\text{g/mL}$ )의 항체와 함께  $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서,  $25 \mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도),  $37^\circ\text{C}$  인큐베이터 내에서 0 내지 60분 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다.  $10 \mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [0816] 도 24는 이중특이적 항체 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R이 83%의 최대 CDC-매개 사멸을 유도하였다는 것을 보여주고, 이것은 10분 후에 달성되었다. E345R의 도입은 IgG1-005-E345R-F405L x IgG1-7D8-E345R-K409R (98%)에 의해 증가된 최대 사멸을 일으켰고, 이것은 이미 2분 후에 달성되었다. 이들 데이터는 이중특이적 항체 내에 Fc-Fc 안정화 E345R 돌연변이를 도입하면 표적 세포의 CDC-매개 사멸을 가속화시킨다는 것을 나타낸다.
- [0817] **실시예 30**
- [0818] **E345R의 존재 및 부재 하의 1가 결합 항체에 대한 CDC 동역학의 비교**
- [0819] 실시예 22는 1가 표적 결합이 CD38-양성, EGFR-음성 Wien133 세포 상에서 CD38xEGFR 이중특이적 항체를 사용하여 증가된 최대 용해에 의해 관찰된 바와 같이 E345R 항체의 CDC 효능을 추가로 증진시켰다는 것을 보여준다. 이어서, E345R의 존재 및 부재 하의 1가 결합 항체 사이의 CDC-매개 사멸 능력의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.
- [0820] E345R 돌연변이가 있는 또는 없는 이중특이적 CD38xEGFR 및 CD20xEGFR 항체를 실시예 22에 기재된 바와 같이 듀오바디 플랫폼에 따라 시험관내에서 생성하였다. CD38xEGFR 이중특이적 항체의 CDC 효능을 CD38-양성, EGFR-음성 Raji 세포 상에서 시험하였고, 여기에 이중특이적 항체는 CD38을 통해 오직 1가로 결합할 수 있다.  $0.1 \times 10^6$ 개의 Raji 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 포화 농도 ( $10.0 \mu\text{g/mL}$ )의 항체와 함께  $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서,  $25 \mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도),  $37^\circ\text{C}$  인큐베이터 내에서 0 내지 60분 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다.  $10 \mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [0821] 도 25는 이중특이적 항체 CD38xEGFR (IgG1-005-K409R x IgG1-2F8-F405L)이 55%의 최대 CDC-매개 사멸을 유도하였다는 것을 보여주고, 이것은 대략 10분 후에 달성되었다. E345R의 도입은 증가된 최대 사멸 (96%)을 발생시켰으며, 이는 5분 내에 이미 달성되었다.
- [0822] 도 25는 이중특이적 항체 CD20xEGFR (IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L)이 85%의 최대 CDC-매개 사멸을 유도하였다는 것을 보여주고, 이것은 대략 5분 후에 달성되었다. 그러나, 도입된 E345R을 갖는 CD20xEGFR 항체를 사용할 때, 85% 용해는 보다 빠르게 2분 후에 관찰되었다. E345R CD20xEGFR 항체에 의한 최대 용해 (97%)는 또한 5분 후에 달성되었다.
- [0823] 요약하면, 이들 1가 결합 항체 내에 E345R 돌연변이의 도입은 보다 강력한 항체를 생성시켰고, 이것은 증가된 최대 용해 및 CDC 반응의 보다 빠른 동역학의 조합으로부터 기인한다.
- [0824] **실시예 31**
- [0825] **치료 항체 및 E345R/Q386K 항체의 조합에 의한 CDC**
- [0826] 실시예 19에 기재된 바와 같이, IgG1-005로부터 유래한 돌연변이체 CD38 항체는 야생형 항체의 E345 위치가 글루타메이트 (E) 이외의 임의의 아미노산으로 치환될 때 Wien133 세포 상에서 효율적인 CDC를 유도할 수 있다. 이것은 CDC의 전제 조건인 올리고머화가 항체의 위치 345에서 글루타메이트 측쇄의 존재에 의해 방해된다는 것을 제안한다. 하나의 Fc 상의 E345는 육량체 항체 고리 구조 내에서 대향하는 제2 Fc 모이머티 상의 Q386에 밀접하게 근접하므로, 제1 항체에서 올리고머화의 E345-매개 방해는 가능하게는 제2 항체의 Q386 위치에서 치환에 의해 제거될 수 있다. 이어서, 이것은 두 항체가 조합되는 경우에 제1 항체 내의 E345가 제2 항체 내의 돌연변이된 386 위치와 보다 양호하게 상호작용할 수 있도록 할 것이다. 상기 가설을 시험하기 위해, Wien133에 대해 CDC 검정을 수행하였고, 여기서 야생형 항체 (IgG1-003, IgG1-005 또는 IgG1-11B8)을 예로서 IgG1-005-E345R/Q386K 또는 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G와 혼합하였다.
- [0827]  $0.1 \times 10^6$ 개의 Wien133 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (3.33배 희석으로  $0.0001$ - $20.0 \mu\text{g/mL}$ )의 정제되지 않은 IgG1-005-E345R/Q386K, IgG1-005-E345R/Q386K/E430G 또는 대조군 항체와 함께  $1.0$  또는

10.0  $\mu\text{g/mL}$  야생형 IgG1-003, IgG1-005 또는 IgG1-11B8 항체의 존재 또는 부재 하에 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0828] 도 26a/b/c는 CD38 항체 IgG1-005-E345R/Q386K가 Wien133 세포의 CDC-매개 용해를 용량-의존성 방식으로 유도하였다는 것을 보여준다 (파선). IgG1-005-E345R/Q386K를 1 또는 10  $\mu\text{g/mL}$  야생형 CD38 항체 IgG1-003 (도 26a) 또는 야생형 CD20 항체 IgG1-11B8 (도 26b)과 조합하면 증가된 최대 세포 용해를 일으켰다. IgG1-005-E345R/Q386K를 야생형 IgG1-005와 조합하면 가능하게는 결합 부위에 대해 경쟁함으로써 CDC를 용량-의존성 방식으로 억제하였다 (도 26c).

[0829] 도 26d/e/f는 CD38 항체 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G에서와 유사한 결과를 보여준다.

[0830] 이들 데이터는 야생형 항체 IgG1-003 및 IgG1-11B8이 IgG1-005-E345R/Q386K 또는 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G와 조합될 때 항체 올리고머화 및 CDC 활성화에 참여함을 나타낸다. 이러한 조합에서, 야생형 항체 내에 존재하는 E345-위치에 의한 올리고머화의 방해는 적어도 부분적으로, 돌연변이체 항체에서 Q386K 치환에 의해 제거될 수 있다. 이러한 적용은 E345 위치에서 야생형인 항체, 예컨대 리톡시맵, 오파투무맵, 다라투무맵 또는 트라스투주맵을 사용한 요법을 개선하기 위해 특히 흥미롭다. 또한, 이러한 올리고머화-유도 항체는 종양 세포 또는 박테리아와 같은 표적 세포에 대해 지히된 환자-자신의 항체와의 세포-결합된 복합체의 형성을 촉진할 수 있다.

[0831] 실시예 19는 돌연변이 시에 CDC를 증진시키는, E345 이외의 다수의 아미노산, 예를 들어 E430 및 S440을 기재하고, 여기서 특이적 돌연변이는 CD38 항체 IgG1-005에 도입될 때 Wien133 세포에서 효율적인 CDC를 유도하였다. I253 및 Y436 돌연변이체를 제외하고, 확인된 올리고머화-증진 돌연변이는 육량체 고리 구조에서 대항하는 제2 Fc 모이어티 상의 돌연변이되지 않은 아미노산과 접촉한다. 따라서, 확인된 올리고머화-증진 돌연변이 (둘 다 단독으로 또는 조합으로)는 또한 돌연변이되지 않은 항체와의 올리고머화를 촉진하는 것으로 예상할 수 있고, 이러한 돌연변이체의 추가의 최적화는 실시예 19에서 적용된 것과 유사한 선택 전략에 의해 달성할 수 있다.

[0832] 실시예 32

[0833] E345R은 IgG2, IgG3 및 IgG4 항체 이소형에서 CDC를 유도하였다

[0834] 올리고머화-촉진 돌연변이의 도입이 비-IgG1 항체 이소형의 CDC 활성을 자극할 수 있는지 시험하기 위해, 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 인간 IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 도메인을 갖는 CD38 항체의 이소형 변이체 IgG1-005를 생성하여, IgG2-005, IgG3-005 및 IgG4-005를 수득하였다. 또한, 올리고머화 증진 E345R 돌연변이를 이들 모든 항체 내에 도입하여, IgG2-005-E345R, IgG3-005-E345R 및 IgG4-005-E345R을 수득하였다. 유사한 방식으로, 또한 CD38 항체 IgG1-003으로부터 IgG2-003 및 IgG2-003-E345R을 생성하였다. 상이한 이소형의 CDC 효능을 시험관내 CDC 검정으로 비교하였다.

[0835]  $0.1 \times 10^6$  개의 Wien133 세포를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 10  $\mu\text{g/mL}$  정제되지 않은 항체와 함께 100  $\mu\text{L}$ 의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. IgG1-005-E345R을 3.0  $\mu\text{g/mL}$ 로 첨가하였다. 이어서, 25  $\mu\text{L}$  정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10  $\mu\text{L}$  아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[0836] 도 27은 IgG2-005, IgG2-003, IgG3-005 및 IgG4-005가 시험된 조건 하에 (a) Daudi 또는 (b) Wien133 세포를 효율적으로 용해할 수 없었음을 보여준다 (관찰된 ~20% 용해는 배경으로 고려됨). E345R 돌연변이의 도입은 시험된 모든 IgG 이소형에 의해 Daudi 세포 상에서 강력한 CDC를 가능하게 하였다. IgG3-005-E345R이 다른 이소형 변이체와 비교하여 제한된 CDC 활성을 나타내긴 하였으나 이러한 결과를 Wien133 세포에 대한 CDC를 이용하여 확인하였다. 이러한 데이터는 IgG1 이외에, 올리고머화 증진 돌연변이, 예컨대 E345R이 또한 IgG2, IgG3 및 IgG4 항체의 CDC 활성을 촉진하도록 적용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0837] 실시예 33

[0838] 환자-유래 CD38-양성 B 세포 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포에 대한 생체의 CDC 검정에서 IgG1-005 및 IgG1-005-E345R에 의한 CDC.

- [0839] CLL 환자 샘플로부터 냉동보존된 일차 세포를 CDB-IDIBAPS-병원 클리닉(CDB-IDIBAPS-Hospital Clinic) (엘리아스 캄포 박사 (Dr. Elias Campo), 스페인 바르셀로나의 바르셀로나 대학 IDIBAPS(Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer), 병원 클리닉, 병리학 부서 혈액병리학과)의 혈액병리학 바이오뱅크(biobank)로부터, 또는 미국 국립 심장, 폐, 혈액 연구원(National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)) (아드리안 위스트너 박사 (Dr. Adrian Wiestner), 베데스다의 미국 국립보건원 (NIH)의 혈액병리학 분과, NHLBI)에 의한 임상 연구로부터 입수하였다. 병원 임상 연구 윤리 위원회(Institutional Ethics Committee of the Hospital Clinic (스페인 바르셀로나)) 또는 NIH의 연구 심사 위원회(Institutional Review Board of the NIH) 및 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki)에 따라 모든 환자로부터 사전 동의를 받았다. 모든 샘플을 유전적으로 및 면역표현형에 의해 특성화하였다.
- [0840] CLL 샘플을 FACS에 의해 결정된 바와 같이 그의 CD38 발현에 따라 2개의 군으로 분류하였다: 5개의 샘플은 CD38 높은 군 (Daudi 세포 상에서 CD38 발현의 50% 내지 98%)에 포함되고, 4개의 샘플은 CD38 낮은 군 (Daudi 세포 상에서 CD38 발현의 0.5% 내지 3%)에 포함되었다.
- [0841] 형광 표지된 CLL 세포 (5  $\mu$ M 칼세인 AM으로 표지함)를 일련의 농도 (10배 희석으로 0.01-10  $\mu$ g/mL)의 항체와 인큐베이션하였다. 이어서, 정상 인간 혈청을 항체-오프소닌화된 세포 (100,000개 세포/웰)에 보체의 공급원으로서 첨가하고 (10% 최종 농도), 45분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 상청액을 회수하고, 세포 용해에 대한 척도로서 형광을 시너지(Synergy)<sup>TM</sup> HT 형광계에서 관독하였다. 세포 사멸은 다음과 같이 계산하였다:
- [0842] 특이적 용해 =  $100 \times (\text{샘플} - \text{자발적 용해}) / (\text{최대 용해} - \text{자발적 용해})$ , 여기서 최대 용해는 1% 트리톤으로 처리한 세포의 샘플에 의해 결정되고, 자발적 용해는 세포를 항체 없이 10% NHS의 존재 하에 인큐베이션한 경우에 샘플로부터 결정된다.
- [0843] 도 28은 IgG1-005-E345R이 야생형 IgG1-005와 비교하여 높은 CD38 발현을 갖는 CLL 일차 세포 및 낮은 CD38 발현을 갖는 CLL 일차 세포 둘 다에서 CDC 효능을 강하게 증진시킨 것을 보여준다.
- [0844] **실시예 34**
- [0845] **야생형 IgG1-005와 비교한 IgG1-005 돌연변이체의 FcRn 결합**
- [0846] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG를 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기를 책임진다. 항체의 내재화 후에, FcRn은 엔도솜 내에서 항체 Fc 영역에 결합하고, 여기서 온화한 산성 환경 (pH 6.0) 내에서 상호작용은 안정하다. 환경이 중성 (pH 7.4)인 형질막으로 재순환할 때, 상호작용을 상실하고, 항체는 다시 순환계로 방출된다. 이는 IgG의 혈장 반감기에 영향을 미친다.
- [0847] IgG1-005 돌연변이체 E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430F, E430G, E430S, E430T, S440Y, K439E 및 S440K가 마우스, 시노몰구스 원숭이 및 인간으로부터의 FcRn과 상호작용하는 능력을 ELISA에서 시험하였다. 마우스 FcRn ELISA에서 돌연변이체 P247G 및 I253D를 또한 시험하였다. I253D를 FcRn에의 결합에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 모든 인큐베이션은 실온에서 수행하였다. 96-웰 플레이트를 5  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L/웰)의 FcRn (마우스, 인간 또는 시노몰구스)의 재조합적으로 생성된 비오틴화 세포외 도메인 (FcRnECDHis-B2M-BIO)으로 코팅하고, PBST + 0.2% BSA에 희석하고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, (PBST/0.2% BSA, pH 6.0에서) 3배 연속 희석된 야생형 IgG1-005 또는 005 돌연변이체를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST/0.2% BSA, pH 6.0으로 세척하였다. PBST/0.2% BSA, pH 6.0에 희석된 염소-항-인간 IgG(Fab'2)-HRP (잭슨 면역노 리서치, 카탈로그 번호: 109-035-097)를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척한 후에, ABTS를 기질로서 첨가하고, 플레이트를 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 흡광도를 EL808 ELISA 관독기를 사용하여 405 nm에서 관독하였다. 마우스 FcRn ELISA에서 생성된 데이터를 그래프패드 프리즘 5에서 log-변환된 농도를 사용하는 비-선형 효능제 용량-반응 핏의 최적-적합 값을 이용하여 분석하고, 겔보기 친화도 EC<sub>50</sub>를 계산하였다 (표 20). 실험은 FcRn 결합이 야생형 IgG1-005와 비교하여 IgG1-005 돌연변이체 중 어느 것에 의해서도 변경되지 않았다는 것을 보여준다.

[0848] [표 20]

IgG1-005 및 돌연변이체의 마우스 FcRn에 대한 결합기 친화도 (EC50) (μg/ml)

| 시험된 변이체 | 005-WT    | 005-P247G | 005-E345K | 005-E345N | 005-E345Q | 005-E345R | 005-E345Y | 005-E430F |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 결합기 친화도 | 0.14      | 0.28      | 0.10      | 0.11      | 0.12      | 0.09      | 0.13      | 0.11      |
| 시험된 변이체 | 005-E440Y | 005-E430G | 005-E430H | 005-E430S | 005-E430T | 005-E440K | 005-E439E |           |
| 결합기 친화도 | 0.15      | 0.13      | 0.11      | 0.14      | 0.15      | 0.11      | 0.31      |           |

[0849]

[0850] 도 29는 야생형 IgG1-005 및 IgG1-005의 모든 시험된 돌연변이체가 pH 6.0에서 마우스, 인간 및 시노물구스 FcRn에 잘 결합한다는 것을 보여준다. pH 7.4에서 FcRn에 대한 유의한 결합이 검출되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음).

[0851] 실시예 35

[0852] B 세포주 Ramos 및 SU-DHL-4에서 리톡시맙의 상이한 돌연변이에 의해 증진된 CDC

[0853] 실시예 19에 기재된 바와 같이, 항-CD38 항체 IgG1-005의 올리고머화 및 CDC 활성은 Fc:Fc 인터페이스의 주변 상의 또는 주변에서의 특정 잔기에서의 단일 돌연변이에 의해 자극될 수 있다. 올리고머화는 또한 Fc:Fc 상호작용을 알로스테릭 방식으로 강화시키는 Fc:Fc 인터페이스로부터 떨어진 잔기에서의 또 다른 유형의 돌연변이에 의해 간접적으로 자극될 수 있다. 이는 또한 2가지 B 세포주 (Ramos 및 SU-DHL-4)에서 IgG1 항-CD20 항체 리톡시맙에 대해 시험하였다. 하기 돌연변이를 시험하였다: E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430G, E430S, E430T, 및 S440Y (본질적으로 실시예 19에 기재된 바와 같음).

[0854] CDC 검정을 위해,  $0.1 \times 10^6$ 개의 세포 (Ramos 또는 SU-DHL-4)를 둥근-바닥 96-웰 플레이트에서 일련의 농도 (3배 희석으로 0.0001-10.0 μg/mL)의 포화 항체와 100 μL의 총 부피로 15분 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 아이오딘화프로피듐을 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다. 데이터는 그래프패드 프리즘 5에서 log-변환된 농도를 이용하는 비-선형 효능제 용량-반응 피트의 최적-적합 값을 이용하여 분석하였다. 도 30은 모든 시험된 리톡시맙 돌연변이체가 B-세포 둘 다에서 CDC 효능을 증가시킬 수 있었다는 것을 보여준다.

[0855] 실시예 36

[0856] 표적 비의존성 보체 상 보체 활성화: IgG1-005 돌연변이체를 야생형 IgG1-005에 비교하였다

[0857] 표적 비의존성 보체 활성화는 항체가 혈류 또는 기관 조직에서 보체를 활성화시킬 때 안전성 문제를 나타낼 수 있다. 이는 원치않는 보체 활성화 생성물 또는 원치않는 보체 침착을 발생시킬 수 있다. 표적 비의존성 유체 상 보체 활성화를 시험하기 위해 100 μg/ml의 IgG1-005 돌연변이체 E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430F, E430G, E430S, E430T, S440Y, 야생형 IgG1-005 또는 열 응집된 IgG (HAG, 양성 대조군)를 90% 정상 인간 혈청에서 1 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 ELISA-키트로 전달하여 C4d 생성 (마이크로 뷰 C4d-단편, 퀴텔, 미국 캘리포니아주 샌디에고)을 측정하였다. C4d는 고전적 보체 경로 활성화에 대한 마커인 C4의 활성화 단편이다.

[0858] 도 31은 야생형 IgG1-005, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, 및 IgG1-005-S440Y가 최소의 C4 활성화를 나타내는 반면, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E430F 및 IgG1-005-E430T가 야생형 IgG1-005와 비교하여 증가된 C4d 생성 (C4 활성화)을 나타낸다는 것을 보여준다.

[0859] 실시예 37

[0860] 야생형 IgG1-005와 비교한 IgG1-005 돌연변이체의 혈장 클리어런스율

[0861] 본 연구에서 마우스를 중앙 실험실 동물 시설 (네덜란드 유트레흐트)의 장벽 유닛 내에 수용하고, 유트레흐트 케이지 내에 물 및 사료를 무제한 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 유트레흐트 대학 동물실험 윤리 위원회에서 승인받았다. 군당 3마리 마우스를 이용하여 SCID 마우스 (C.B-17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup>/IcrIcoCr1,



칼스-리버)에 500  $\mu$ g 항체를 정맥내로 주사하였다.

[0862] 50  $\mu$ L 혈액 샘플을 항체 투여 10분, 4시간, 1일, 2일, 7일, 14일 및 21일 후에 복제 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알에 수집하고, 5분 동안 10,000g에서 원심분리하였다. 혈장을 항체 농도의 결정시까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다.

[0863] 특이적 인간 IgG 농도를 전체 hIgG 및 CD38 특이적 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다.

[0864] 전체 hIgG ELISA를 위해, 2  $\mu$ g/mL의 농도로 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (#M1268, CLB 상퀀 (네덜란드)을 포획 항체로 사용하였다. 플레이트를 0.2% 소 혈청 알부민을 보충한 PBS로 차단한 후에, 샘플을 첨가하고, ELISA 완충제 (0.05% 트윈 20 및 0.2% 소 혈청 알부민을 보충한 PBS)에서 연속 희석하고, 플레이트 진탕기 상에서 1시간 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 후속적으로 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (#109-035-098, 잭슨, 펜실베이니아주 웨스트 그레이스)과 인큐베이션하고, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)으로 발색시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 버몬트주 위누스키)에서 405nm에서 측정하였다.

[0865] 특이적 CD38 ELISA를 위해, His-태그부착된 CD38 세포의 도메인을 2  $\mu$ g/mL의 농도로 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 코팅하였다. 플레이트를 ELISA 완충제로 차단한 후에, ELISA 완충제로 연속 희석시킨 샘플을 첨가하고, 플레이트 진탕기 상에서 1시간 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 후속적으로 30 ng/ml 마우스 항 인간 IgG1-HRP (상퀀 M1328, 클론 MH161-1)와 인큐베이션하고, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)으로 발색시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 버몬트주 위누스키)에서 405nm에서 측정하였다.

[0866] 도 32a는 야생형 참조 항체 IgG1-005 및 항체 변이체 IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E345Y, IgG1-005-E430F, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430T, IgG1-005-S440Y의 IgG 클리어런스를 보여준다. 돌연변이체 IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430G, 및 IgG1-005-S440Y, IgG1-005-E430T, IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345Q, 및 IgG1-005-E345Y는 야생형 IgG1-005와 유사한 클리어런스를 나타내었다. 돌연변이체 IgG1-005-E430F 및 IgG1-005-E345R은 보다 빠른 클리어런스를 나타내었다. 혈장 클리어런스를 용량/AUC (mL/일/kg)로 계산하였다. AUC 값 (곡선하 면적)을 농도-시간 곡선으로부터 결정하였다.

[0867] 도 32b는 8.0 mg 비관련 IgG1-B12 대조 항체의 복강내 투여 1일 후에 정맥내로 주사되었을 때 CD38 특이적 ELISA에 의해 결정된 바와 같은 야생형 참조 항체 IgG1-005 및 항체 변이체 IgG1-005-E345K, IgG1-005-E345R, IgG1-005-E430G, IgG1-005-E430S, 및 IgG1-005-S440Y의 IgG 클리어런스를 보여준다. 비관련 b12 대조군의 부재 하의 야생형 참조 항체 IgG1이 대조군으로 포함되었다. 돌연변이체 IgG1-005-E430S, IgG1-005-E430G, IgG1-005-S440Y 및 IgG1-005-E345K는 야생형과 유사한 클리어런스를 나타내었다. 돌연변이체 IgG1-005-E345R은 보다 빠른 클리어런스를 나타내었다.

[0868] **등가물**

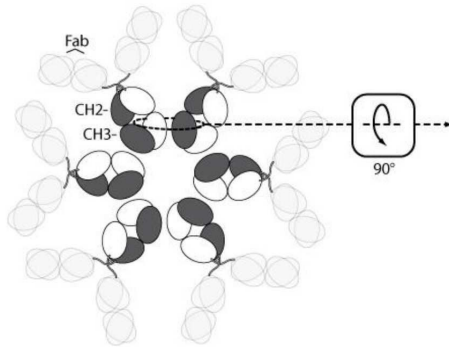
[0869] 통상의 기술자는 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 다수의 등가물을 인식할 것이거나 또는 더 이상의 통상적인 실험을 이용하지 않고 확인할 수 있다. 이러한 등가물은 하기 특허청구범위에 포괄되는 것으로 의도된다. 종속항에 개시된 실시양태의 임의의 및 모든 조합은 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.



## 도면

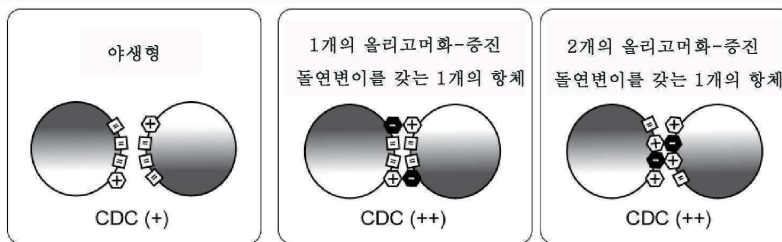
### 도면1a

육량체를 형성한 IgG 분자



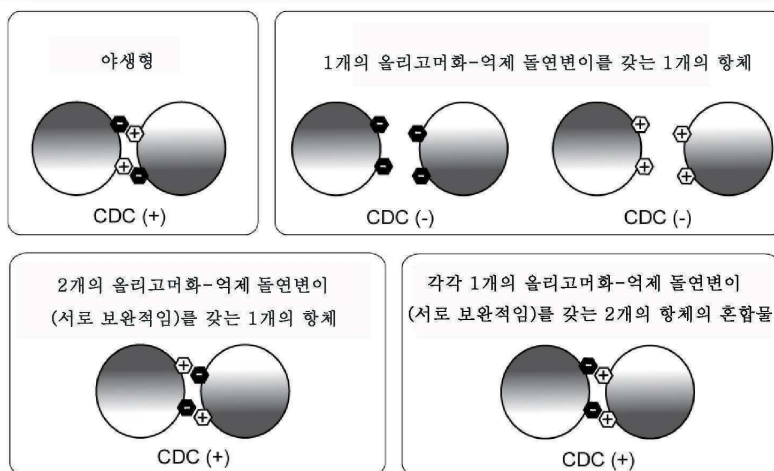
### 도면1b

CDC에 대한 올리고머화-증진 돌연변이의 관찰된 효과



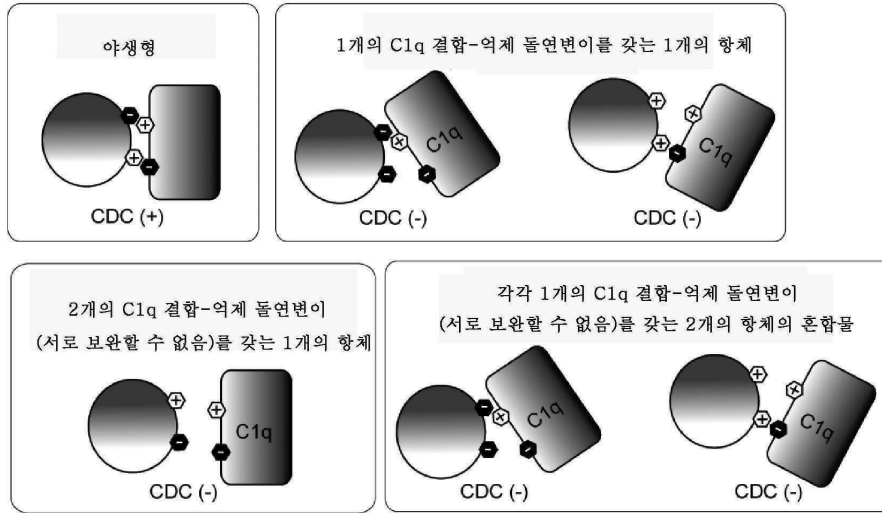
### 도면1c

CDC에 대한 올리고머화-억제 돌연변이의 관찰된 효과



도면1d

CDC에 대한 C1q 결합-억제 돌연변이의 이론적 효과





도면 3a

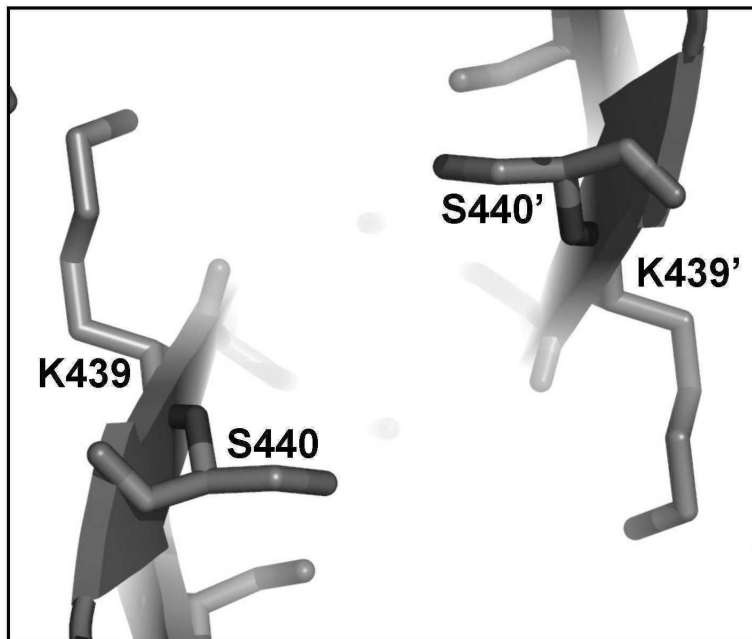
[illegible]

도면 3b

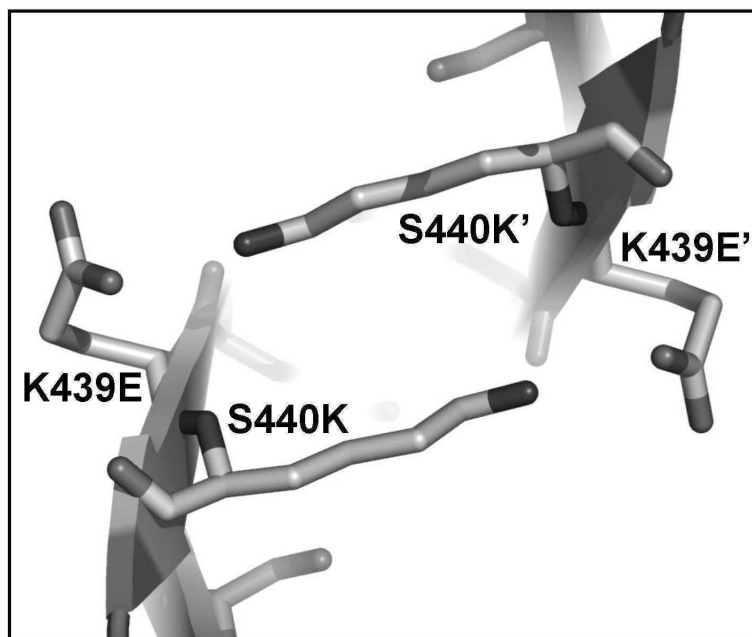
[illegible]



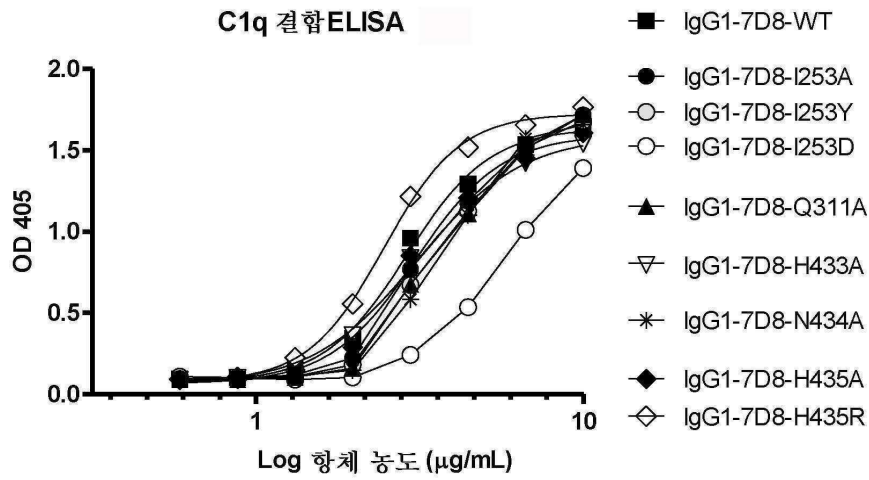
도면4



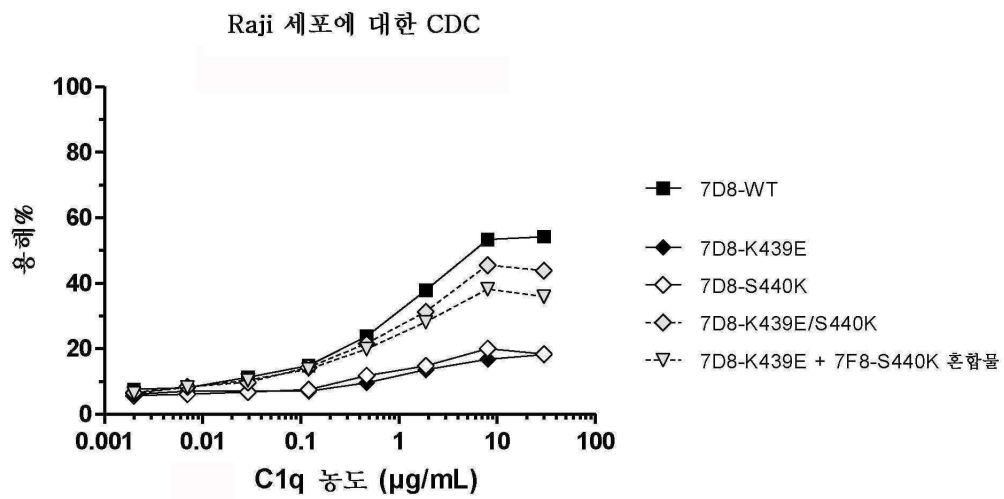
도면5



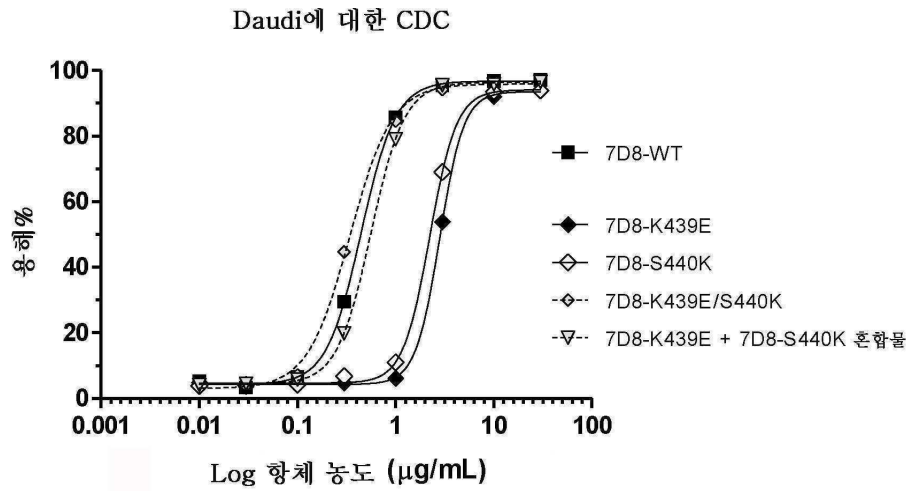
도면6



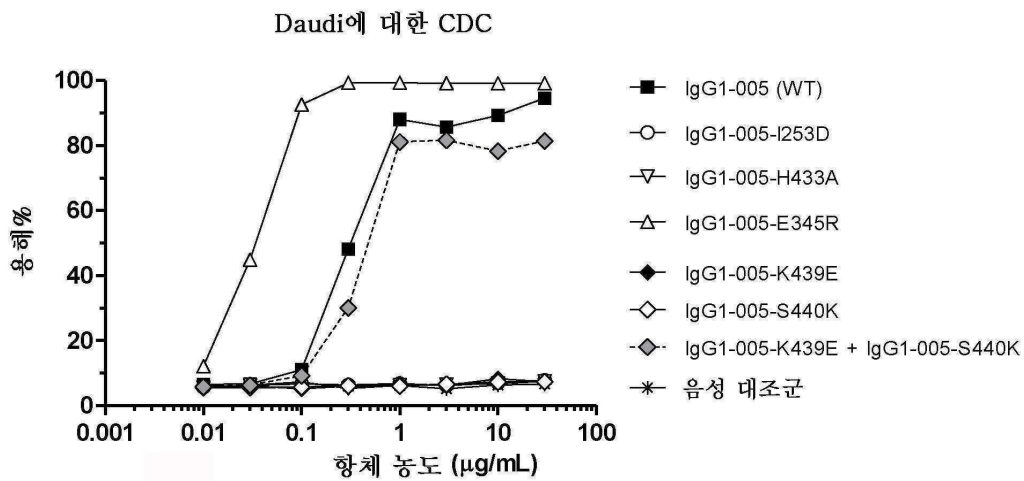
도면7



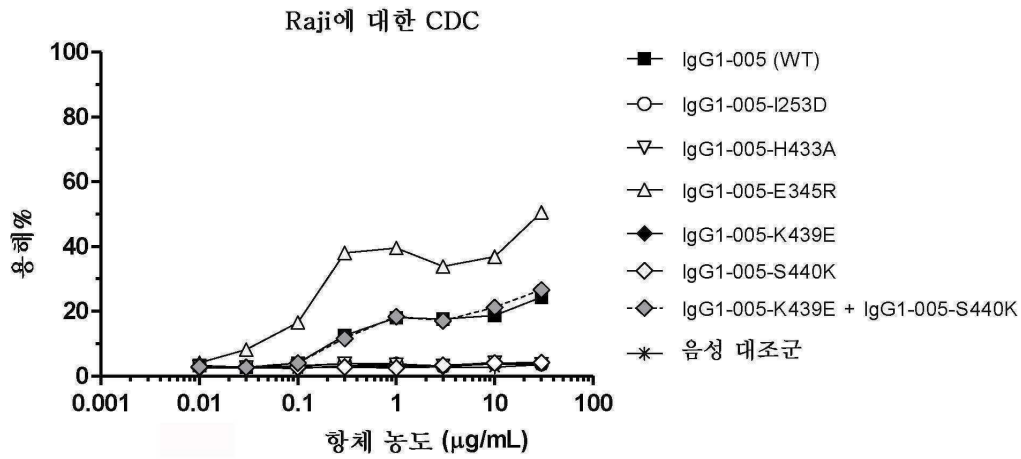
도면8



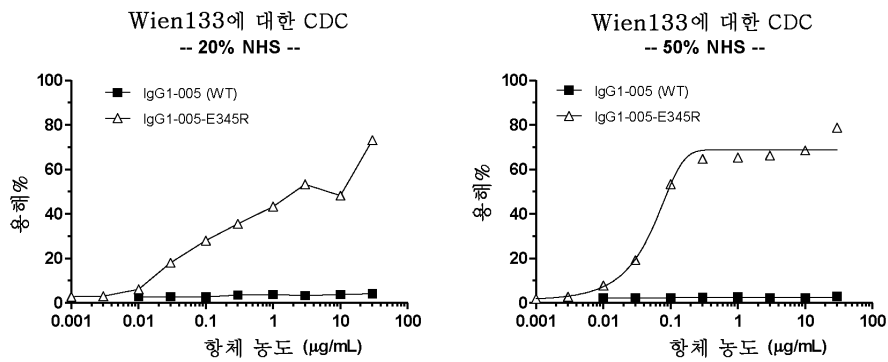
도면9a



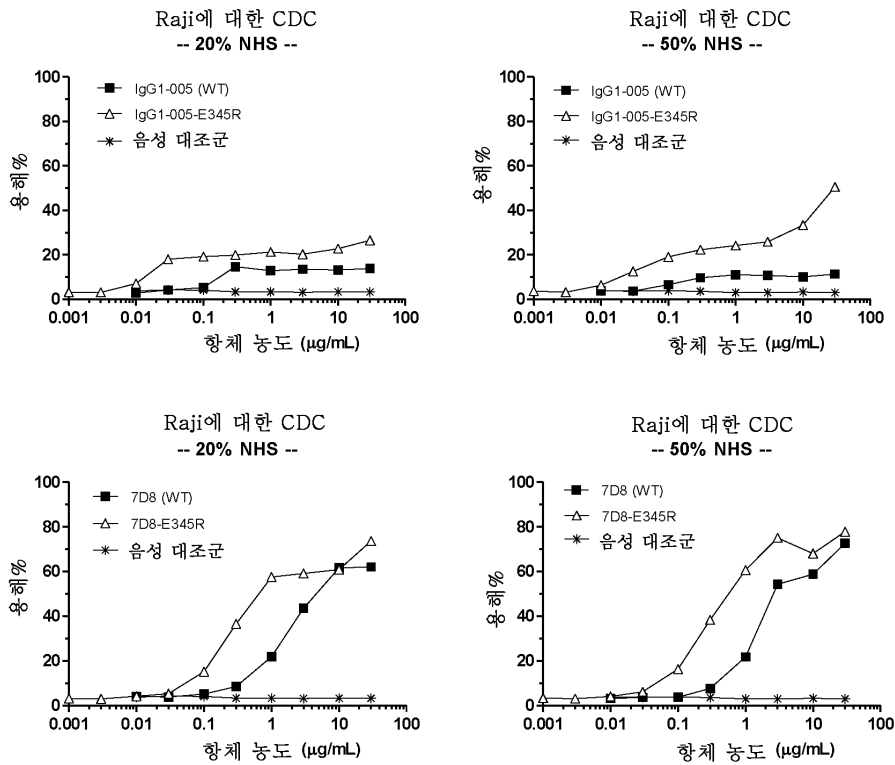
도면9b



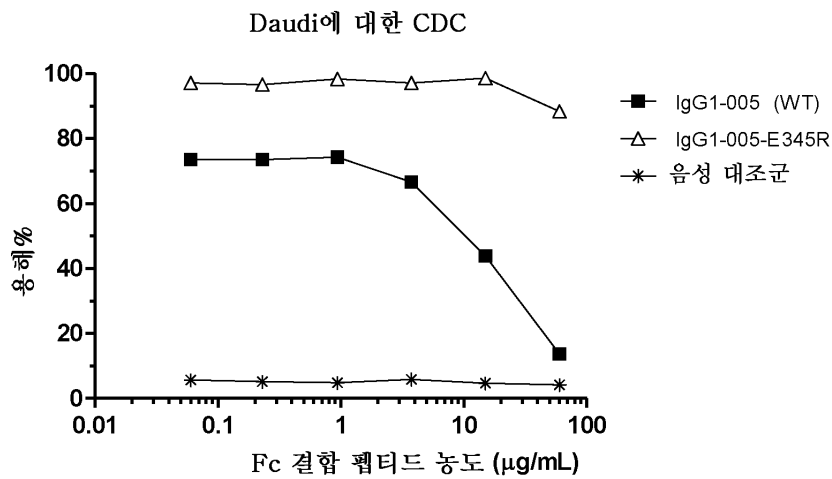
도면9c



도면9d

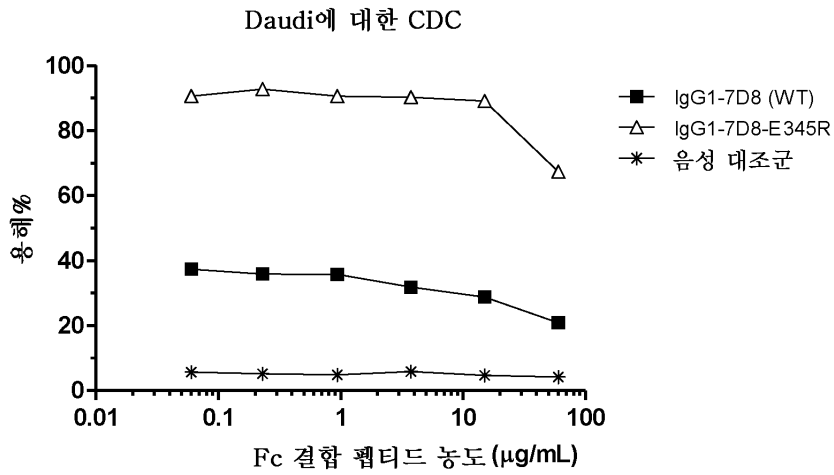


도면10a

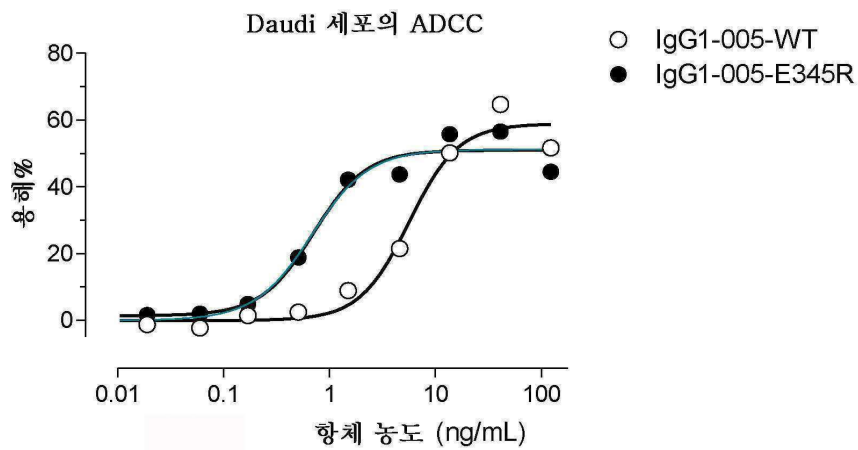




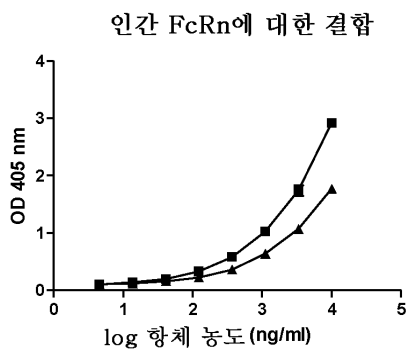
도면10b



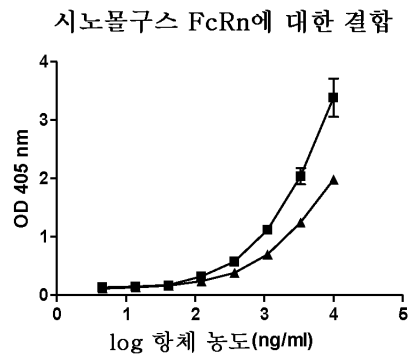
도면11



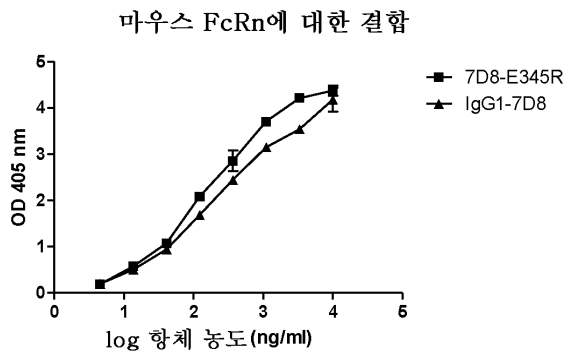
도면12a



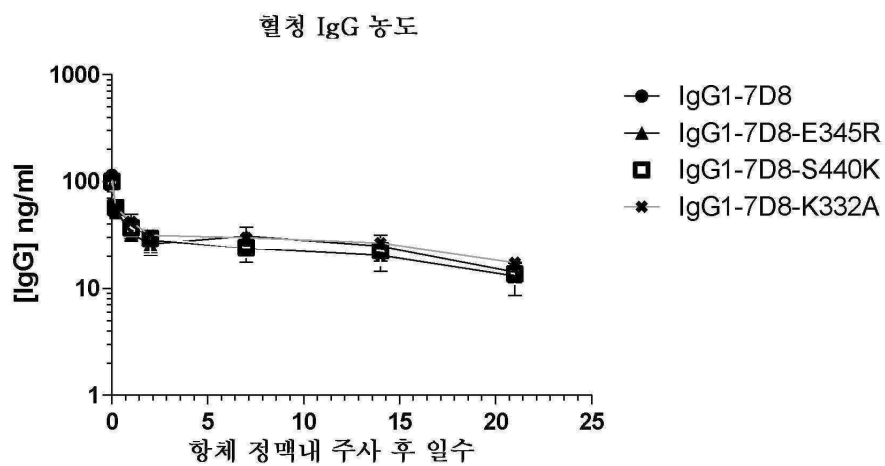
도면12b



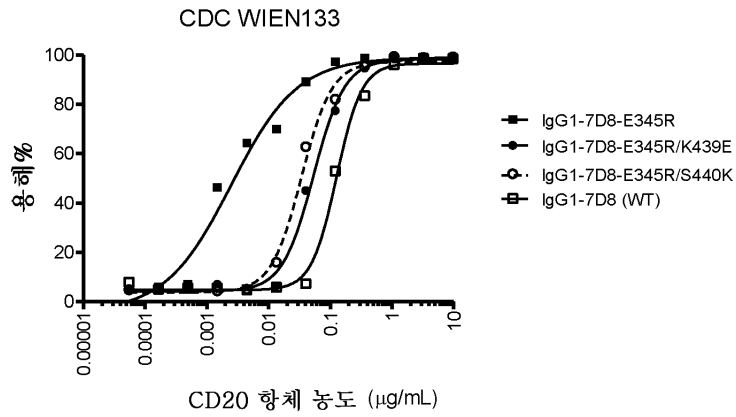
도면12c



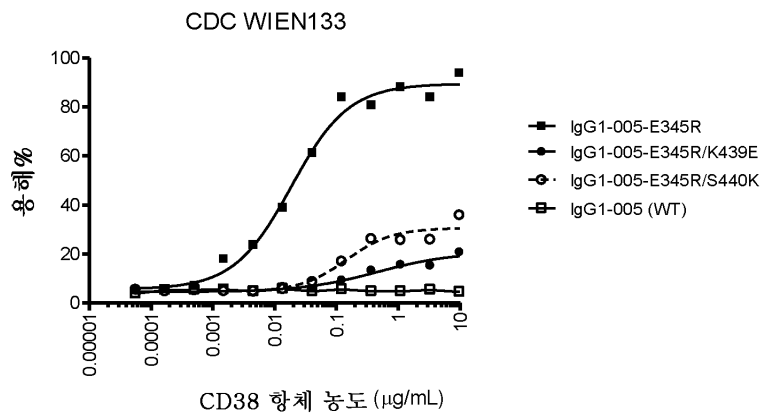
도면13



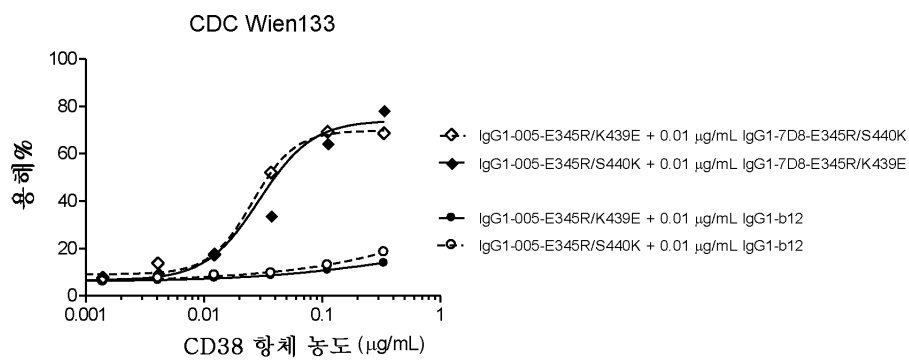
도면14a



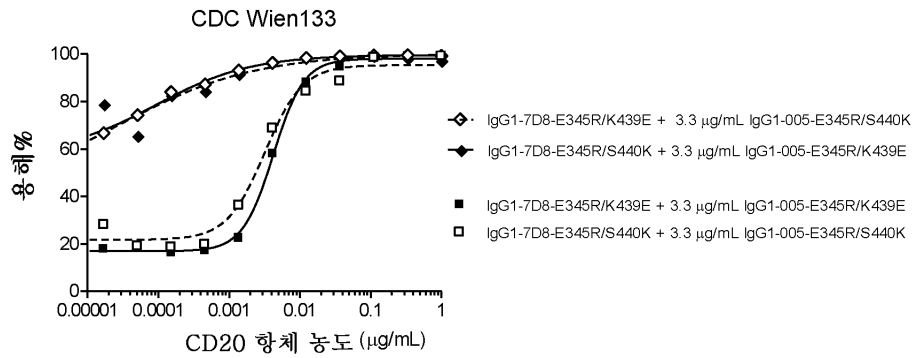
도면14b



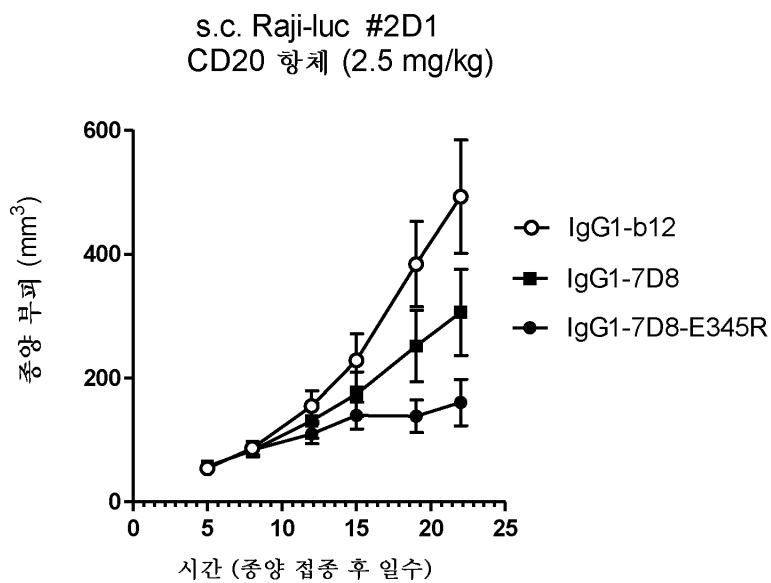
도면14c



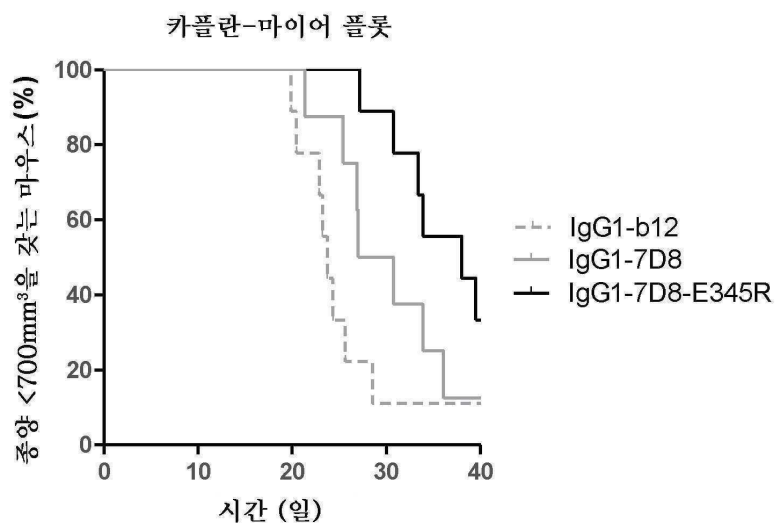
도면14d



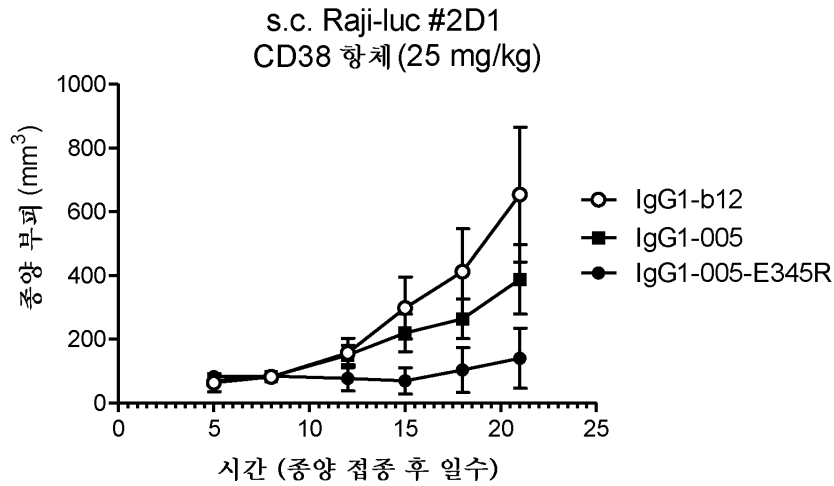
도면15a



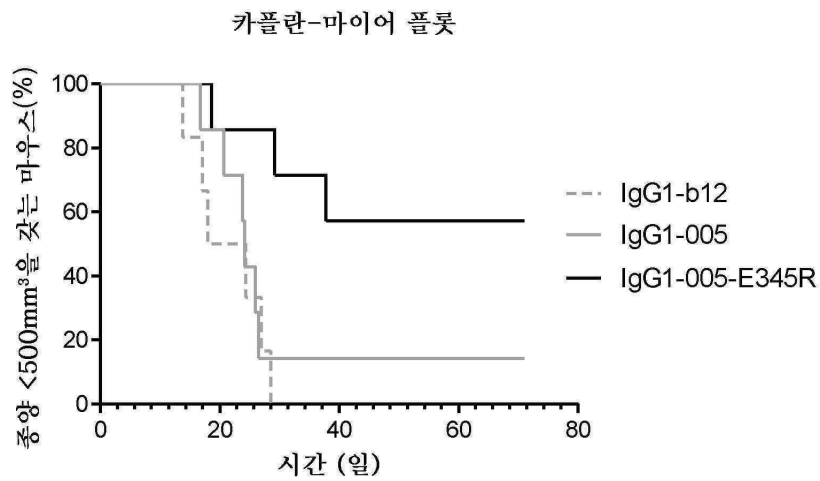
도면15b



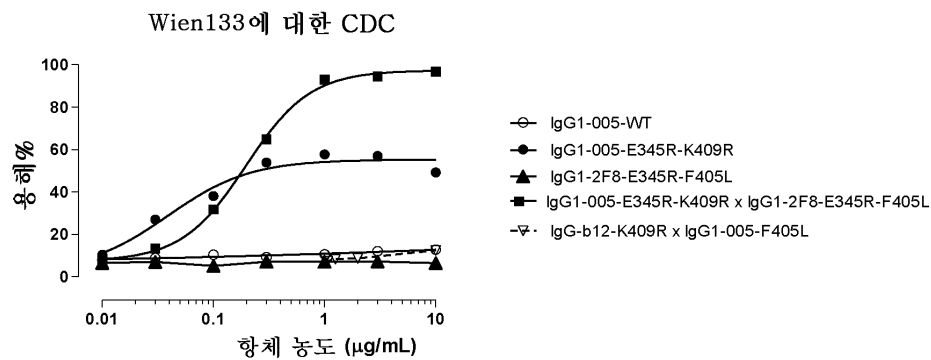
도면16a



도면16b

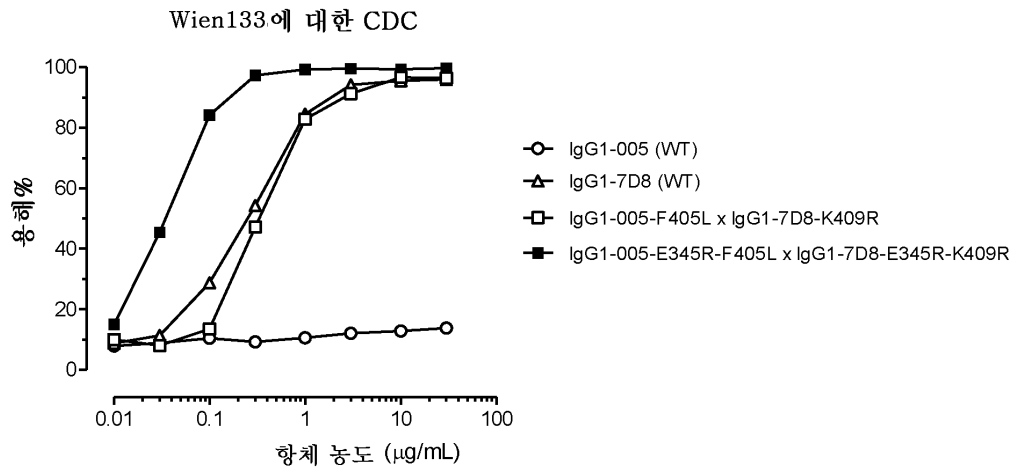


도면17

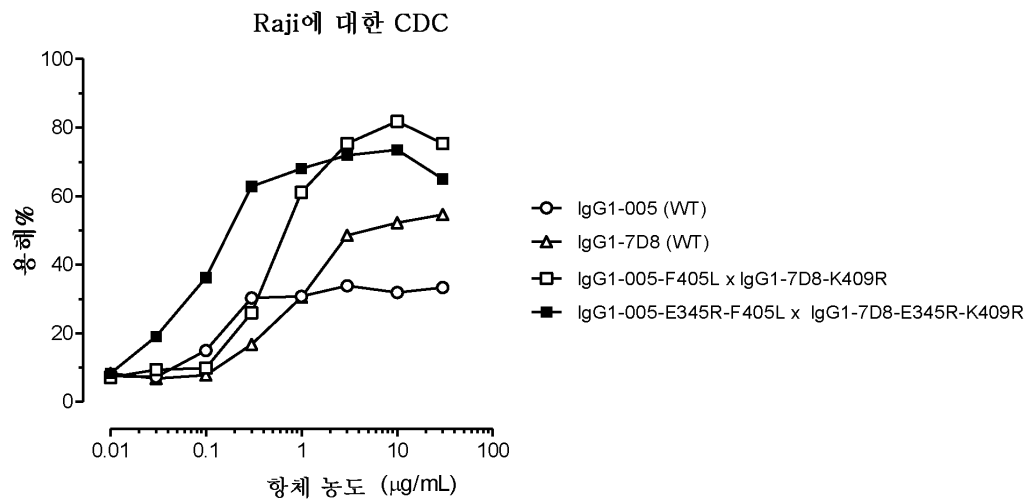




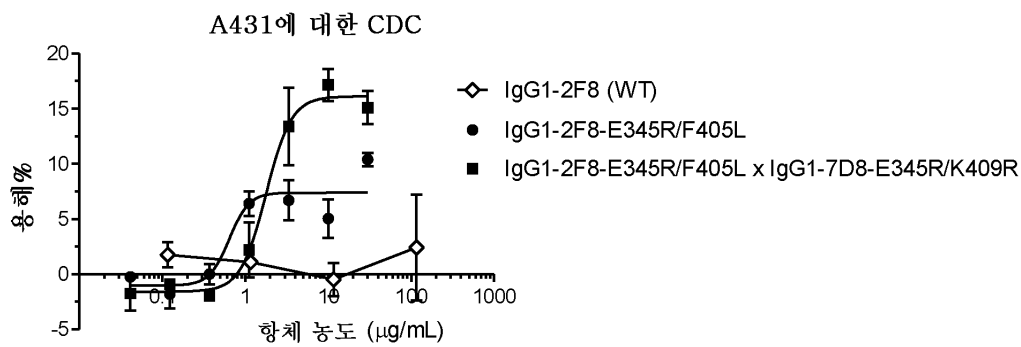
도면18a



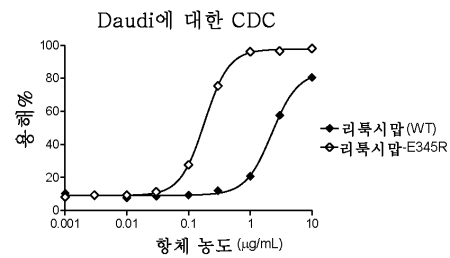
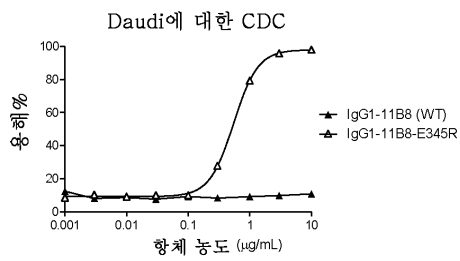
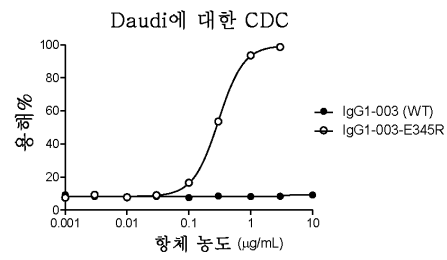
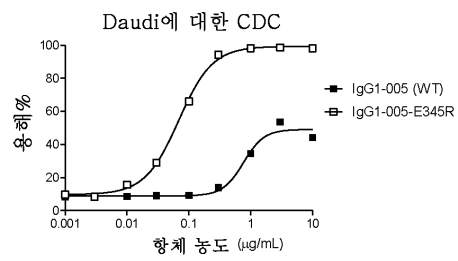
도면18b



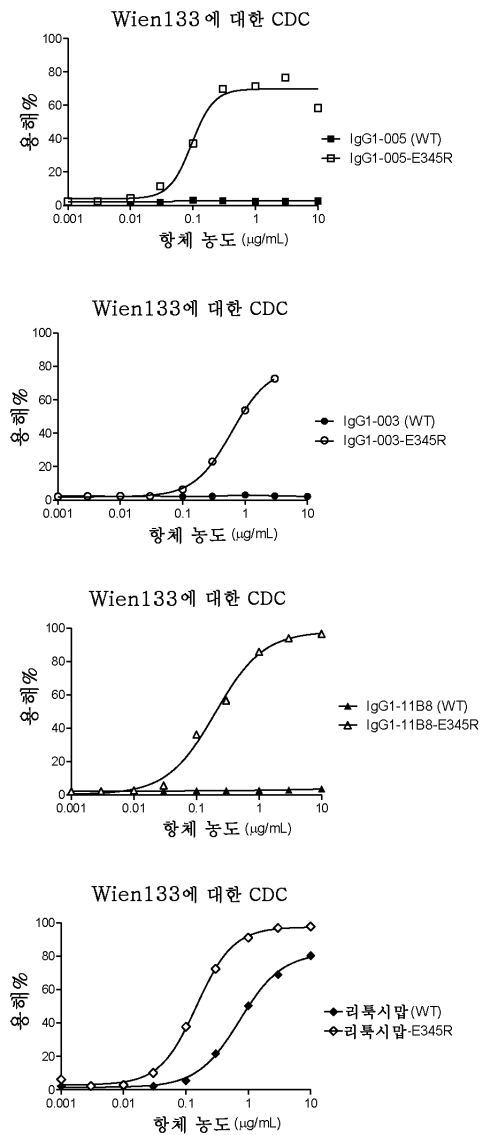
도면19



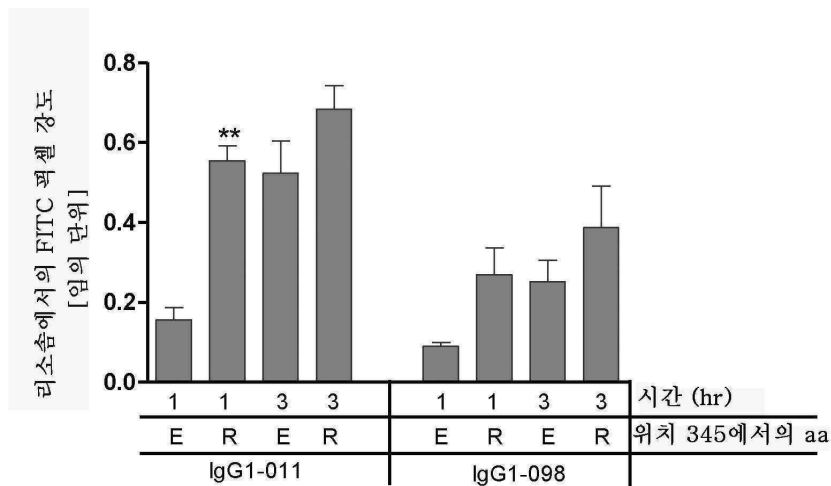
도면20a



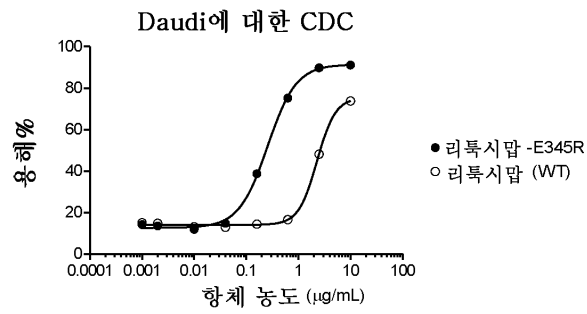
도면20b



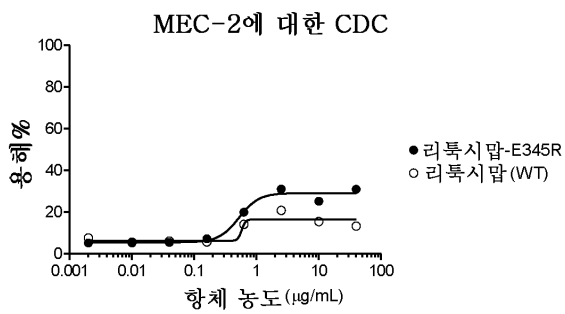
도면21



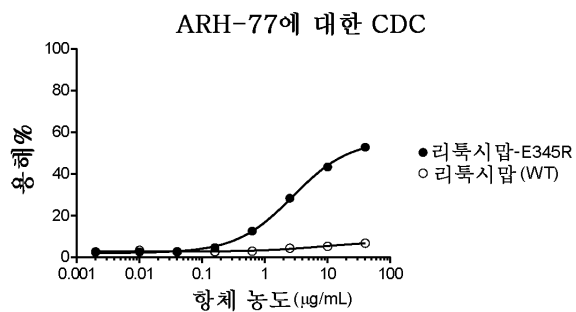
도면22a



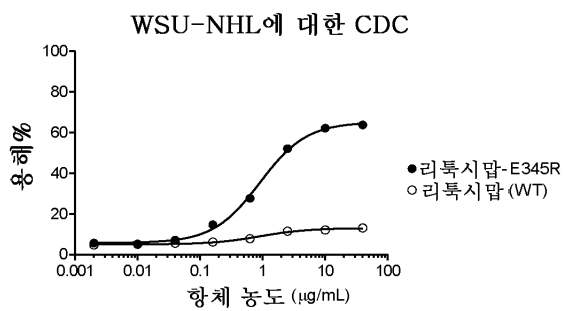
도면22b



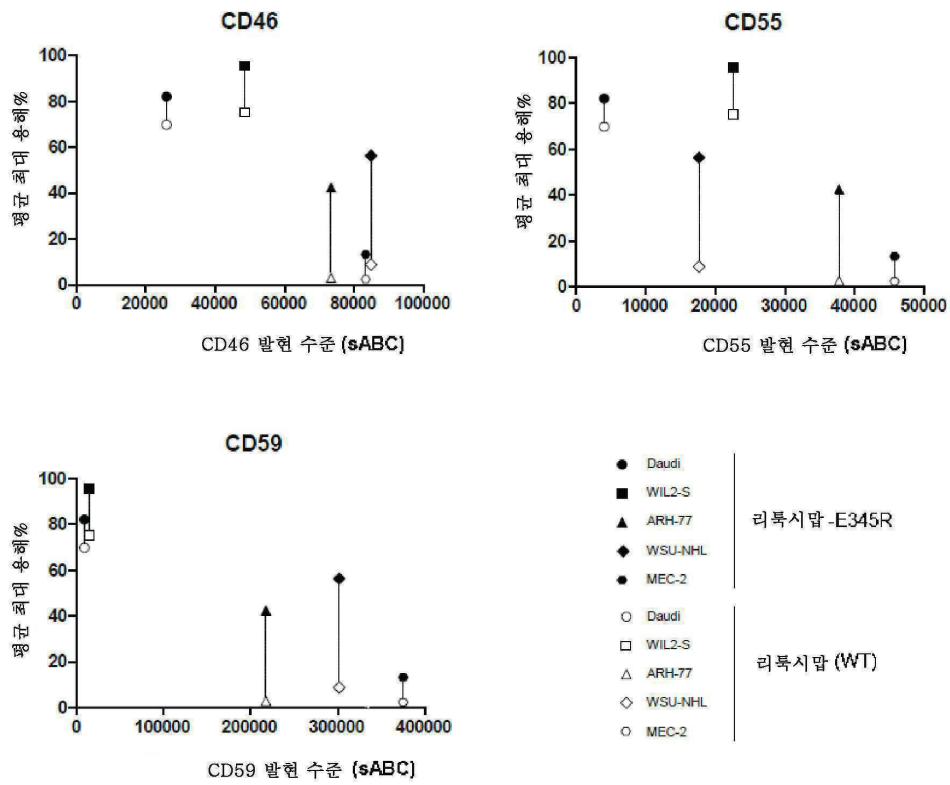
도면22c



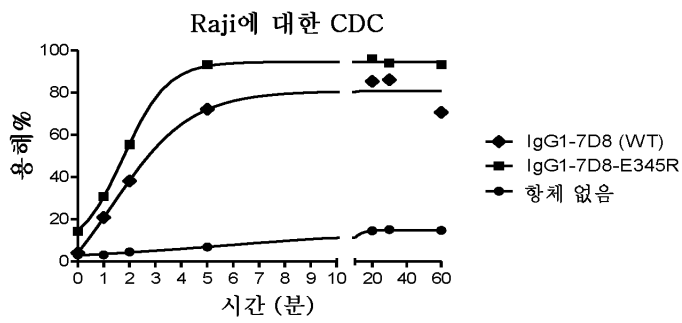
도면22d



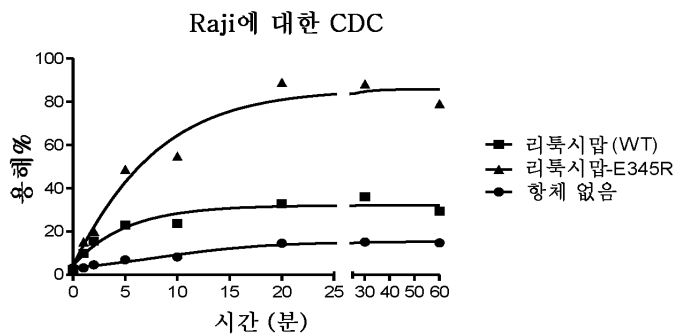
도면22e



도면23a

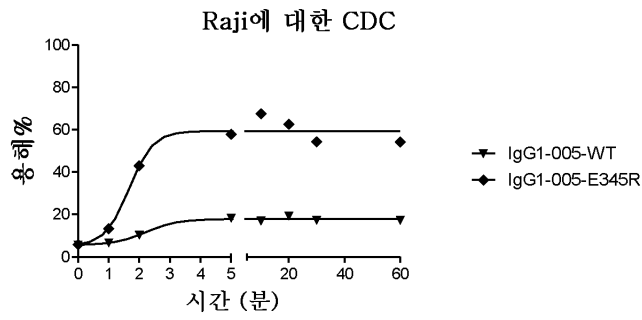


도면23b

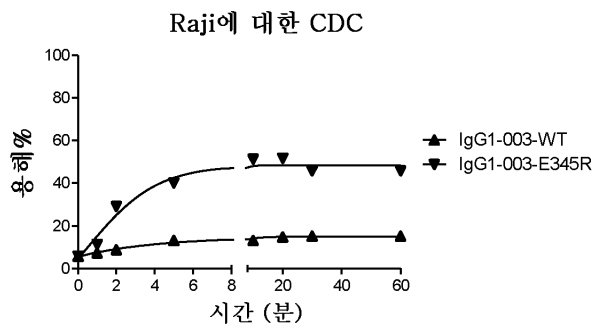




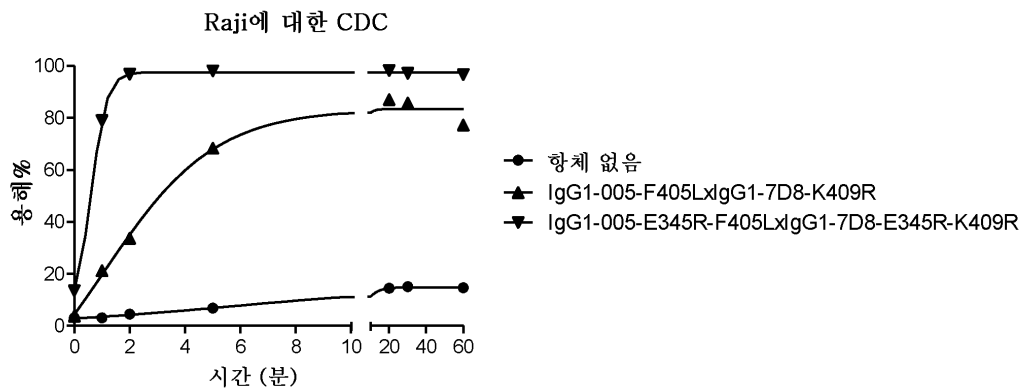
도면23c



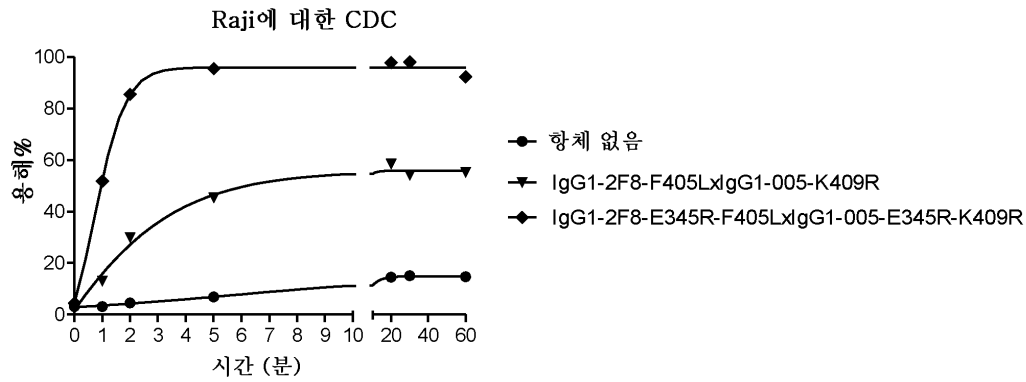
도면23d



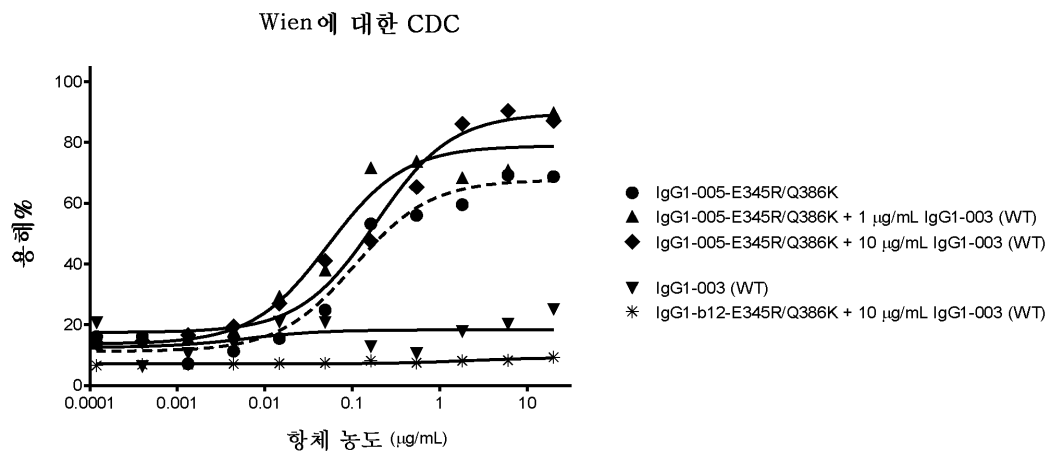
도면24



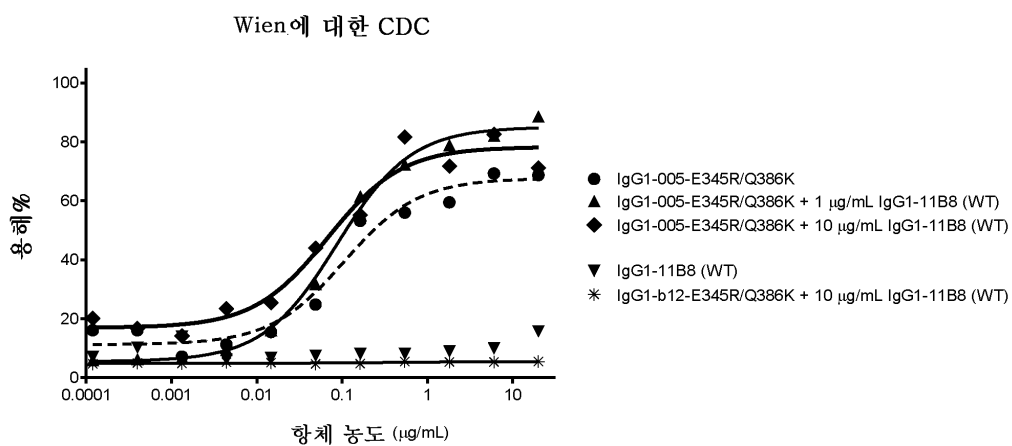
도면25



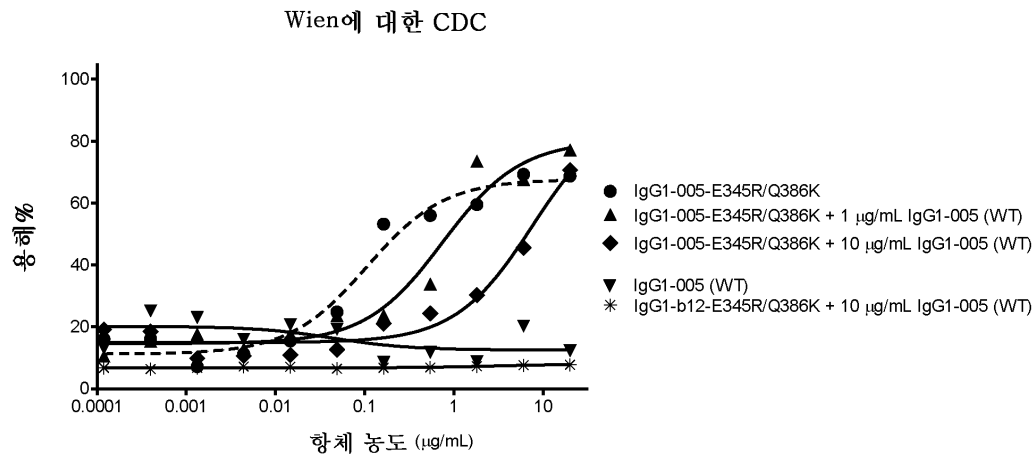
도면26a



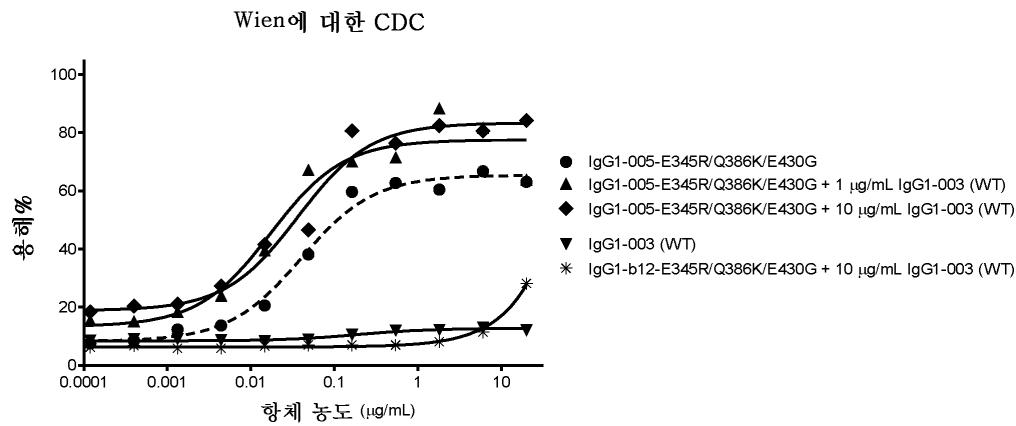
도면26b



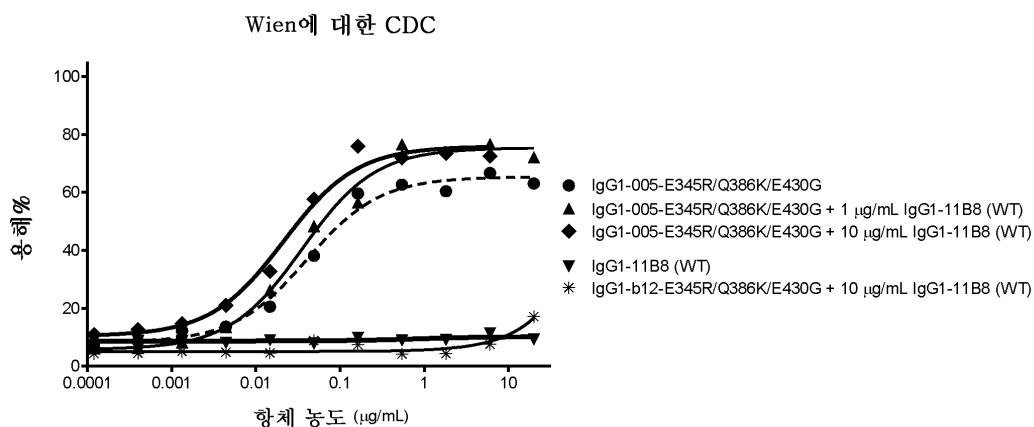
도면26c



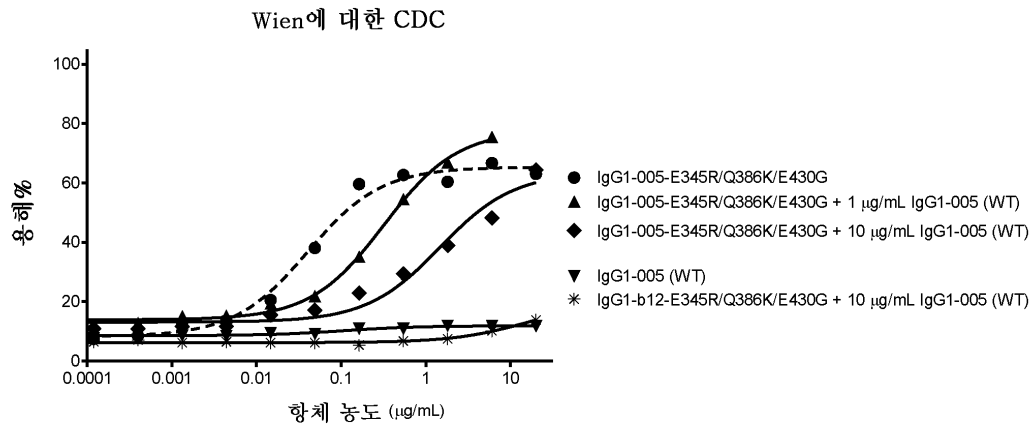
도면26d



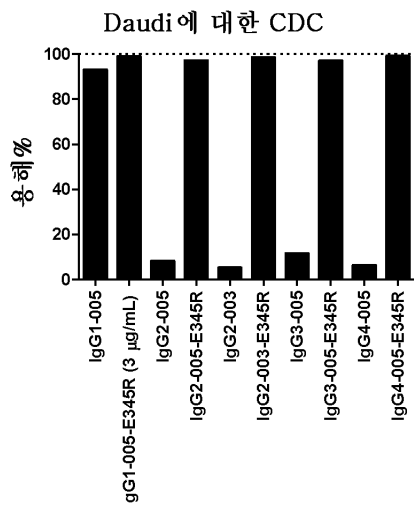
도면26e



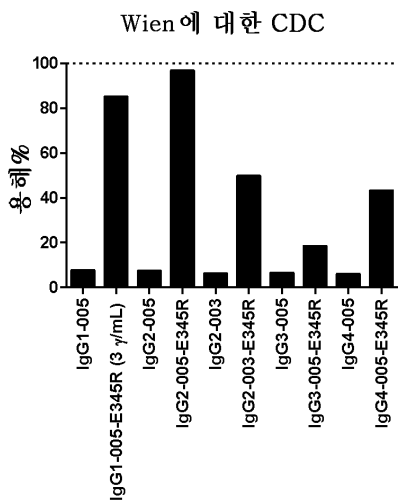
도면26f



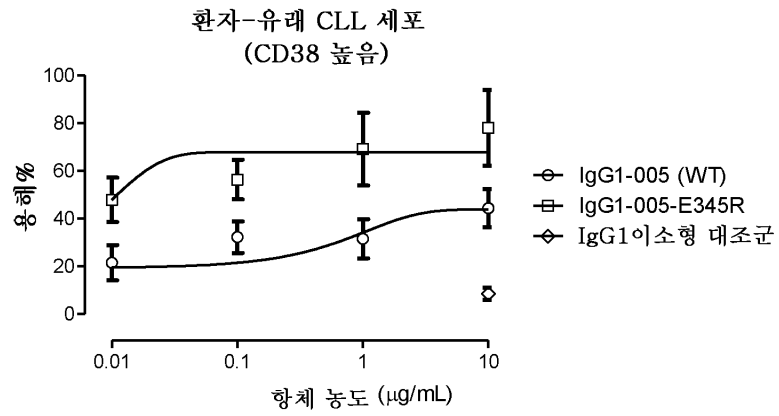
도면27a



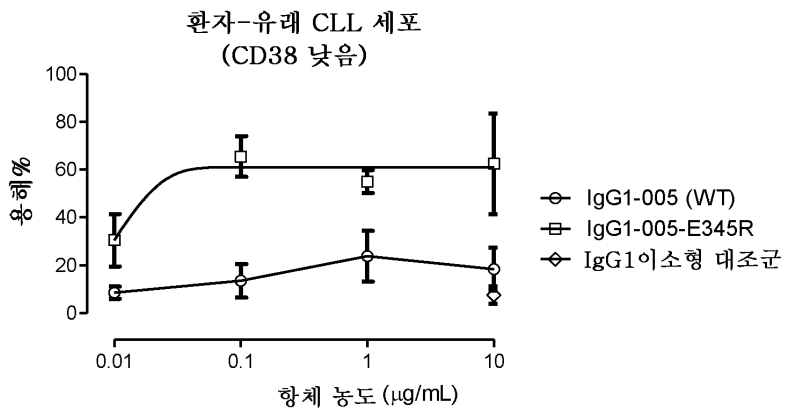
도면27b



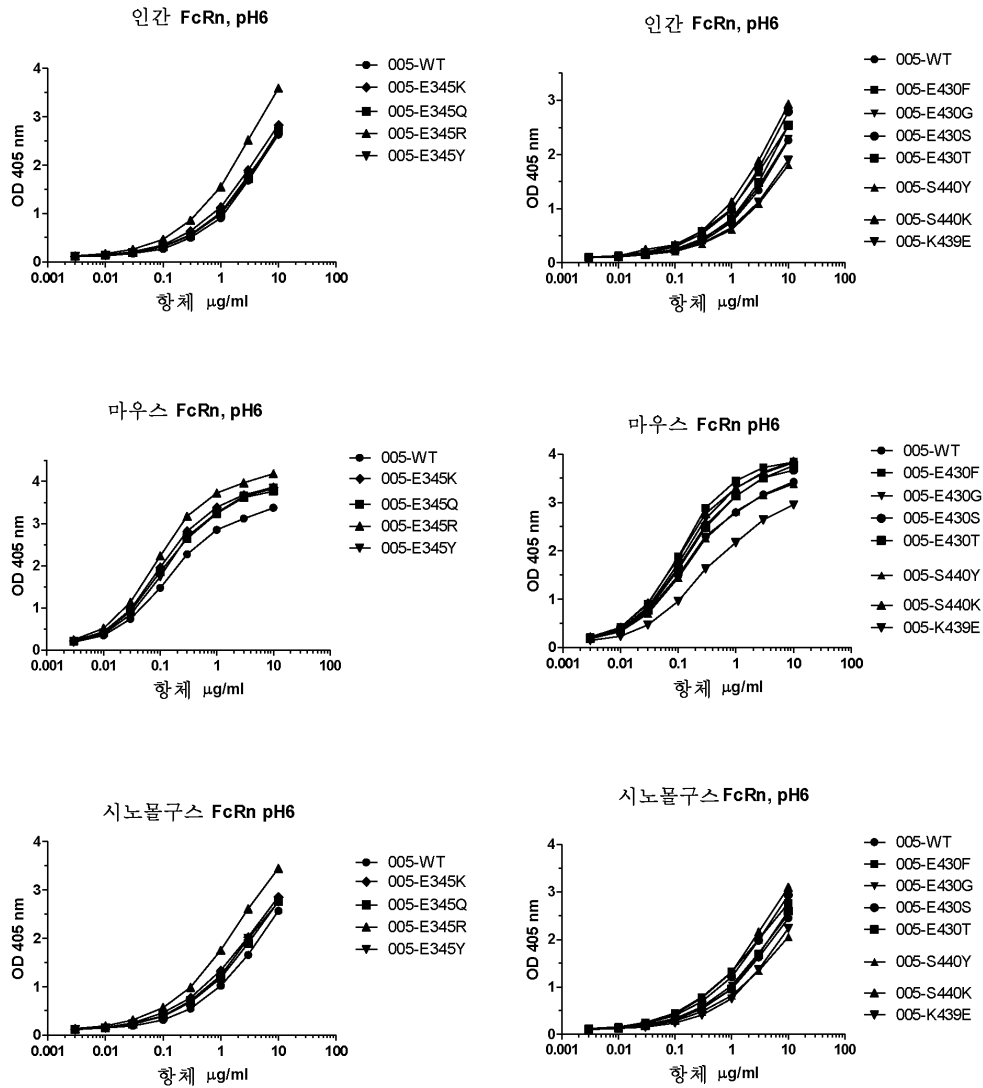
도면28a



도면28b

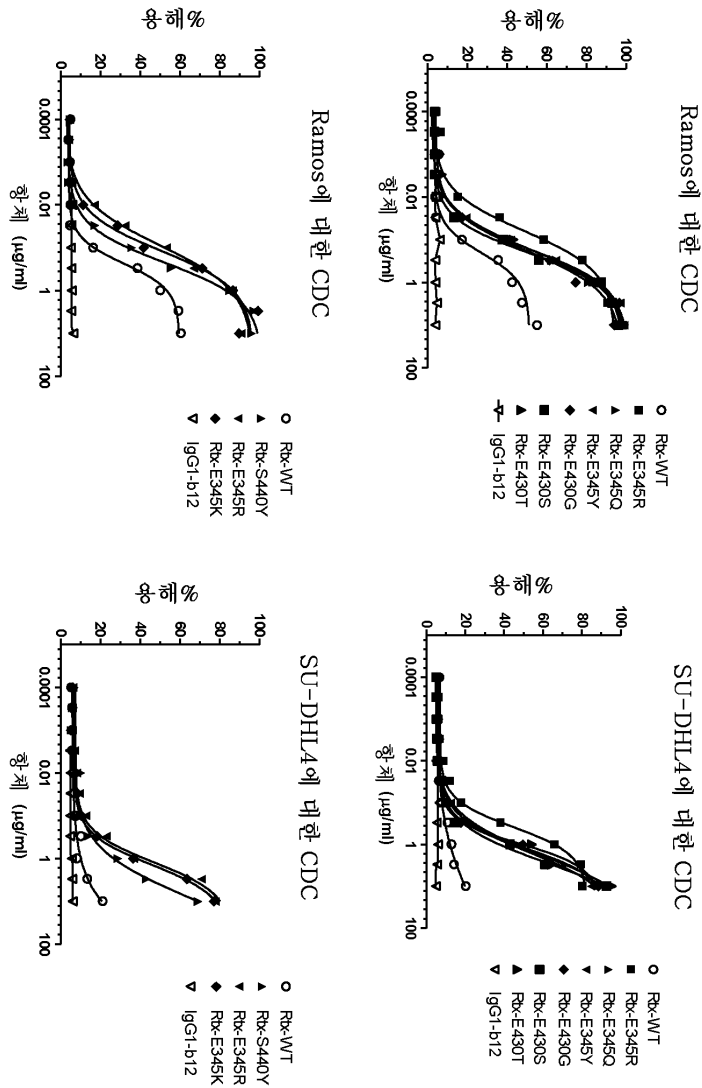


도면29

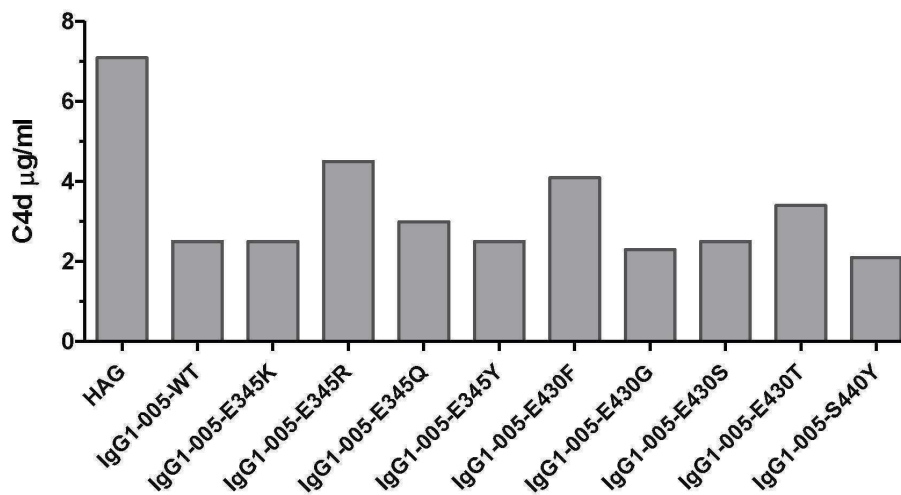




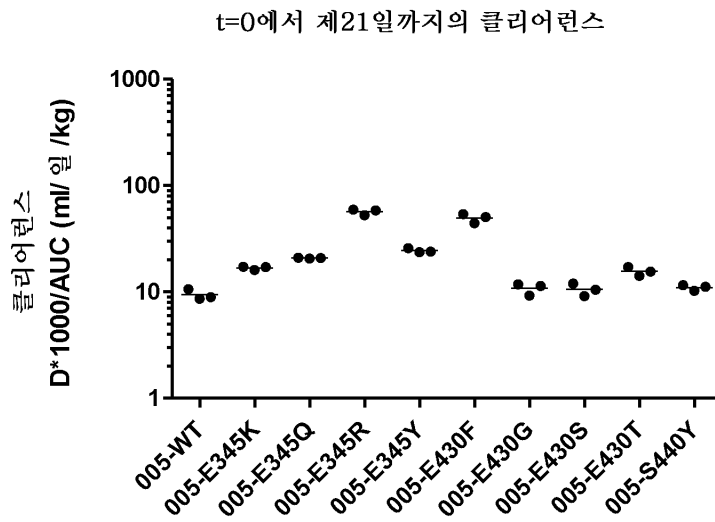
도면30



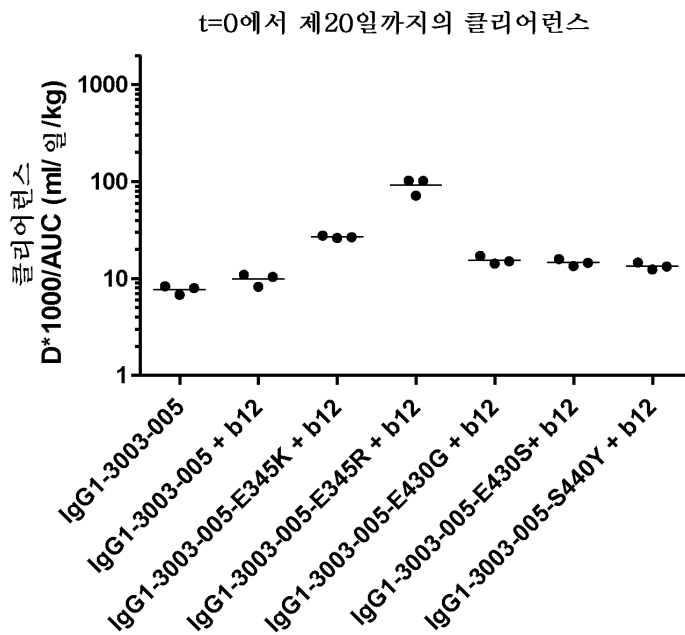
도면31



도면32a



도면32b



## 서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Polypeptide Variants and Uses Thereof

<130> P/0077-WO

<140> PC//EP2013/050429

<141> 2013-01-10

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

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

Lys 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 Asp 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> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Val | Glu | Arg | Lys | Cys | Cys | Val | Glu | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Phe | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Val | His | Gln | Asp | Trp |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Pro | Pro | Met | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400

> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys

130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

180 185 190



Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
370 375

<210> 4

<211> 327

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

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> 6

<211> 201

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
1                      5                      10                      15  
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

|                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|                    |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |  |  |
| Val                | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |  |  |
| 35                 |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Gln                | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |  |  |
| 50                 |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |  |  |
| Gln                | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |  |  |
| 65                 |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     | 80  |  |  |
| Ala                | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln |  |  |
|                    |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |  |  |
|                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Pro                | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu |  |  |
| 100                |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |  |  |
| Thr                | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro |  |  |
| 115                |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Ser                | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn |  |  |
| 130                |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |  |
| Tyr                | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu |  |  |
| 145                |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     | 160 |  |  |
|                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Tyr                | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val |  |  |
|                    |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |
| Phe                | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln |  |  |
|                    |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |  |  |
| Lys                | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 195                |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <210> 7            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <211> 201          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <212> PRT          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <213> homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| <400> 7            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Pro                | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |  |  |
| 1                  |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |  |  |
|                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Val                | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr |  |  |

20 25 30  
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
35 40 45  
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
50 55 60  
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
65 70 75 80

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
85 90 95  
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
100 105 110  
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
115 120 125  
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
130 135 140

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
145 150 155 160  
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
165 170 175  
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
180 185 190  
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
195 200

<210> 8

<211> 201

<212> PRT

<

213> homo sapiens

<400> 8

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
1 5 10 15  
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
20 25 30



Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
35 40 45

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His  
50 55 60

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
65 70 75 80

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
85 90 95

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
100 105 110

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
115 120 125

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
130 135 140

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
145 150 155 160

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
165 170 175

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
180 185 190

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
195 200

<210> 9

<211> 201

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
1 5 10 15

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
20 25 30

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

35                                      40                                      45  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 50                                      55                                      60  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
 85                                      90                                      95  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 100                                      105                                      110  
  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 115                                      120                                      125  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 130                                      135                                      140  
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
 165                                      170                                      175  
  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
 180                                      185                                      190  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 195                                      200  
 <210> 10  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 10  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 20                                      25                                      30  
  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

35 40 45  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 50 55 60  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 85 90 95  
  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 100 105 110  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 115 120 125  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 130 135 140  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 145 150 155 160  
  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 165 170 175  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 180 185 190  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 195 200  
 <210> 11  
 <211> 204  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 11  
 Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu  
 1 5 10 15  
  
 Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser  
 20 25 30  
 Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys  
 35 40 45

Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr  
50 55 60

Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro  
65 70 75 80

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro  
85 90 95

Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly  
100 105 110

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro  
115 120 125

Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp  
130 135 140

Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe  
145 150 155 160

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys  
165 170 175

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln  
180 185 190

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys  
195 200

<210> 12

<211

> 221

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro  
20 25 30

Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys  
35 40 45

Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp

50

55

60

Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys

65

70

75

80

Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro

85

90

95

Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu

100

105

110

Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val

115

120

125

Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr

130

135

140

Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe

145

150

155

160

Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly

165

170

175

Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe

180

185

190

Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn

195

200

205

Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr

210

215

220

<210> 13

<211> 221

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr

1

5

10

15

Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro

20

25

30

Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys  
35 40 45

Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp  
50 55 60

Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys  
65 70 75 80

Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro  
85 90 95

Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu  
100 105 110

Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val  
115 120 125

Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr  
130 135 140

Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe  
145 150 155 160

Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly  
165 170 175

Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe  
180 185 190

Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn  
195 200 205

Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr  
210 215 220

<210> 14

<211> 223

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu  
1 5 10 15

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg



20 25 30  
Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His

35 40 45  
Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp

50 55 60  
Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp

65 70 75 80  
Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala

85 90 95  
Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu

100 105 110  
Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser

115 120 125  
Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser

130 135 140  
Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro

145 150 155 160  
Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp

165 170 175  
Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn

180 185 190  
Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu

195 200 205  
Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

210 215 220  
<210> 15

<211> 209

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

Ala Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe

1                    5                    10                    15  
Val Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala  
                    20                    25                    30  
Gly Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His  
                    35                    40                    45  
Ser Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser  
                    50                    55                    60

Leu Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser  
65                    70                    75                    80  
Leu Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala  
                    85                    90                    95  
Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu  
                    100                    105                    110  
Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn  
                    115                    120                    125

Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly  
130                    135                    140  
Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp  
145                    150                    155                    160  
Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala  
                    165                    170                    175  
Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn  
                    180                    185                    190

Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met  
195                    200                    205

Lys

<210> 16

<211> 454

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
1 5 10 15  
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly  
20 25 30  
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
35 40 45  
Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
50 55 60  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80  
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125  
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
130 135 140  
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160  
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175  
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190  
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
195 200 205  
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
210 215 220  
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
225 230 235 240  
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 275 280 285  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 305 310 315 320  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 325 330 335  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 340 345 350  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 370 375 380  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 385 390 395 400  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 405 410 415  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 17

<211> 451

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser  
1 5 10 15  
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly  
20 25 30  
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
35 40 45  
Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
50 55 60  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80  
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
115 120 125  
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
130 135 140  
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
145 150 155 160  
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
165 170 175  
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
180 185 190  
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn  
195 200 205  
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
210 215 220  
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly  
225 230 235 240  
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255  
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln

260 265 270  
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285  
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

290 295 300  
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320  
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

325 330 335  
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350  
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365  
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380  
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400  
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

405 410 415  
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430  
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445  
Leu Gly Lys

450

<210> 18

<211> 97

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 18

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

1 5 10 15

Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro

20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

50 55 60

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu

65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

85 90 95

Thr