



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0088655
(43) 공개일자 2025년06월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7018726(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년06월20일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2024-7009294
원출원일자(국제) 2017년06월20일
심사청구일자 2024년04월17일
- (85) 번역문제출일자 2025년06월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/038377
- (87) 국제공개번호 WO 2018/052503
국제공개일자 2018년03월22일
- (30) 우선권주장
62/394,360 2016년09월14일 미국(US)
62/491,908 2017년04월28일 미국(US)

- (71) 출원인
테네오원, 인코포레이티드
미국, 일리노이주 60064, 노스 시카고, 노스 위키건 로드 1
- (72) 발명자
트린크레인, 나단
미국, 캘리포니아 94062, 레드우드 시티, 홉킨스 에비뉴 2302
반 스토텐, 워
미국, 캘리포니아 94087, 서니베일, 플로이드 에비뉴 1444
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장덕순, 류현경

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 CD3 결합 항체

(57) 요약

본 발명은 신규한 인간 CD3 항원 결합 폴리펩타이드 및 이들의 제제 및 다양한 질환의 치료 및/또는 진단에서의 용도에 관한 것이며, 또한, 면역 효과기 세포를 활성화시킬 수 있는 이중특이성 항체 분자 및 다양한 질환의 진단 및/또는 치료에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

대표도

내부 ID	서열번호	CDR1	CDR2	CDR3
312557	서열번호 1	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	서열번호 2	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	서열번호 3	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
308160	서열번호 4	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308256	서열번호 5	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312585	서열번호 6	GFTFANYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312614	서열번호 7	GFTFNNTYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312583	서열번호 8	GFTFADYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312586	서열번호 9	GFTFDNTYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312624	서열번호 10	GFTFDNTYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312578	서열번호 11	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312620	서열번호 12	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGSYSRGGAY
312634	서열번호 13	GFTFHNTYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312579	서열번호 14	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312630	서열번호 15	GFTFDNTYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312570	서열번호 16	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	서열번호 17	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312558	서열번호 18	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

(52) CPC특허분류

C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

알드레드, 셸리 포스

미국, 캘리포니아 94541, 헤이워드, 트윈 크릭스
코트 23860

해리스, 캐서린

미국, 캘리포니아 94536, 트리몬트, 키플링 플레이
스 3305

팜, 두이

미국, 캘리포니아 95123, 산호세, 릴리 앤 웨이
550

클라크, 스탈린

미국 91320 캘리포니아주 사우전드 오크스 원 암젠
센터 드라이브 로 디파트먼트-패턴트 오퍼레이션스
메일 스태프 28-5-에이 암젠 인크 내

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 인간 CD3에 대해 특이적인 제 1 결합 모이어티; 및
- (b) 인간 BCMA에 대해 특이적인 제 2 결합 모이어티를 포함하는 이중특이적 항체의 용도.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 출원은 2016년 9월 14일자로 제출된 미국 가출원 특허 제62/394,360호, 그리고 2017년 4월 28일자로 제출된 미국 가출원 특허 제62/491,908호에 대한 우선권을 주장하고, 이들 출원은 본 명세서에서 전문이 참고로 편입된다.

배경기술

[0002] 신체의 면역계는 감염, 손상 및 암에 대하여 방어물로서 역할을 한다. 2가지 별개의, 하지만 상호관계된 시스템, 체액성 및 세포성 면역계는 신체를 보호하는데 공조한다. 체액성 시스템은 항체로 명명된 가용성 인자에 의해 매개되는데, 이들은 신체에 의해 외래로서 인식되는 산물을 중화시킨다. 대조적으로, 세포성 시스템은 외래 침입자를 제거하고 중화시키는 세포, 예를 들면, T 세포 및 대식세포를 필요로 한다.

[0003] T 세포의 활성화는 면역 반응의 자극을 위해 결정적이다. T 세포는 면역학적 특이성을 전시하고, 그리고 세포성 면역 반응 중에서 대부분을 주동한다. 비록 T 세포가 항체를 분비하진 않지만, 이들은 B 림프구에 의한 항체의 분비를 위해 필요하다. T 세포 활성화는 다수의 세포 표면 분자, 예를 들면, T 세포 수용체 복합체 및 CD4 또는 CD8 분자의 참여를 필요로 한다. 항원 특이적 T 세포 수용체(TcR)는 사슬, 알파 및 베타(α 및 β) 또는 감마 및 델타(γ 및 δ)를 갖는 이황화 연결된 이형이합체, 막 당단백질로 구성된다. TcR은 CD3으로서 지정된 불변 단백질의 복합체와 비공유적으로 연결된다.

[0004] T 세포는 다양한 실험적 세팅에서 강력한 항종양 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 종양 세포에 대하여 T 세포를 효과적으로 증원할 수 있는 항체는 예로서, 종양-연관된 항원(TAA) 및 효현성 T-세포막 단백질, 예를 들면, TCR/CD3 복합체와 CD28을 향해 지향된 이중특이성 항체로서 가용하였다. 이들 이중특이성 항체는 그들의 TCR 특이성과 상관없이 T 세포를 활성화시켜, 개별 TAA를 보유하는 세포의 특이적 용해를 유발할 수 있다.

[0005] 하지만, 항-CD3 이중특이성 항체가 T-세포-매개된 용해를 악성 세포로 향해 전향시킬 수 있긴 하지만, CD3-기초된 bsAb로 임상 시험은 환자에서 높은 독성을 보여주었다. bsAb로부터 비특이적 T-세포 활성화는 Fc/Fc 수용체 (FcR) 상호작용에 기인한 항원-독립된 방식으로, 또는 항원이 정상 세포 및 종양 세포 둘 모두에서 발현될 때 항원-의존성 방식으로 일어날 수 있다. 양쪽 기전은 이전 임상 연구에서 관찰된 독성에 책임이 있었을 수 있다. (가령, Link et al. (1998) *Int. J. Cancer* 77(2):251-6; Durben et al. *Molecular Therapy* (2015); **23** 4, 648-655를 참조한다). 결과의 사이토카인 방출 증후군 때문에, 치료적 목적을 위한 이들 항체의 개발에는 유의미한 장애물이 있었다.

[0006] T 세포 수용체(TCR)와 그의 펩타이드-MHC 리간드의 상호작용은 T 세포의 활성을 결정한다. 이 상호작용의 결합 특징은 더 상세하게 연구되었고, T 세포 기능을 제어하는 것으로 나타났다. TCR-펩타이드/MHC 상호작용의 강도 및 특성은 T 세포가 효과기 기능을 발휘하거나 또는 비활성화되고 결실되는지의 여부를 결정한다. CD3에 대한 항체는 CD3 ϵ 사슬의 입체배치를 변화시킴으로써 T 세포를 활성화시키고, 에피토프에 따라서 T 세포 상의 작용적 또는 길항적 효과 중 하나를 가질 수 있다(Yoon et al., 1994 *Immunity* 1:563-569). 다수의 T 세포 작용제의 상당한 부작용에 비추어, 강력한 항종양 효과를 유지하는 한편, 전염증 사이토카인의 방출을 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 부분적 작용제 항-CD3 항체는 CD3 ϵ 사슬을 변경시켜 차선으로 비효과적인 신호 전달을 초래하며, 대부분의 항-CD3 항체는 경로 둘 다에 대해 완전한 작용제이다. 이들 효과기 기능이 분리될 수 있는지의 여부는 불분명하다. 다수의 존재하는 항-CD3 항체(예를 들어, SP-34, UCHT1, OKT3)는 1 내지 50nM KD 범위에서 친화도를 갖지만, 그러나, 이는 치료적 용도에 대해 최선이 아닐 수도 있다.

[0007] CD3 특이적 항체, 그리고 그것으로부터 유래된 이중특이성 항체가 본 발명에 의해 제공된다.

[0008] 간행물

[0009] CD3 항체는 가령, 미국 특허 번호 5,585,097; 5,929,212; 5,968,509; 6,706,265; 6,750,325; 7,381,803; 7,728,114에서 개시된다. CD3 결합 특이성을 갖는 이중특이성 항체는 가령, 미국 특허 번호 7,262,276; 7,635,472; 7,862,813; 및 8,236,308에서 개시되고, 이들은 각각 본원에서 특정적으로 참조로서 편입된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 실시 예는 CD3에 결합하고 이를 통한 신호전달을 활성화시키는, 예를 들면, CD3⁺ T 세포를 활성화시키는 밀접하게 관련된 항체의 패밀리에 대한 조성물 및 이들의 이용 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 항체 패밀리는 본원에서 규정된 바와 같은 한 세트의 CDR 서열을 포함한다. 항체의 패밀리는 임상적으로 치료적 작용제(들)로서 유용성에 기여하는 다수의 유익성을 제공한다. 상기 패밀리에 항체는 다양한 결합 친화도를 갖는 구성원을 포함하고, 원하는 친화도를 갖는 특정한 서열의 선별을 허용한다. 친화도를 미세 조정하는 능력은 치료되는 개체에서 CD3 활성화의 수준을 관리하여, 독성을 감소시키는데 특히 중요하다.

[0012] 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 대략 10⁻⁶ 내지 대략 10⁻¹¹ M 범위로 CD3에 대해 친화도(KD)를 가진다. 50 nM 또는 그 이상, 100 nM 또는 그 이상, 500 nM 또는 그 이상, 또는 1 μM 또는 그 이상의 친화도(KD)를 갖는 항-CD3 항체가 TCR/MHC 상호작용을 더욱 가깝게 모의하고, 그리고 효과적인 종양 세포 용해를 유지하면서 독성 사이토카인 방출을 최소화하기 위해 바람직할 수 있다. 일부 구체예에서, 항-CD3 항체는 적격성 T 세포에 결합 시에 사이토카인 방출을 유도하는 감소된 성향, 예를 들면, IL-2 및 IFN γ 의 방출에 대해 특징되거나 또는 선별된다. 종양 세포의 사멸 및 사이토카인의 감소된 방출을 최적화하는 항체, 예를 들면, 본원에서 설명된 항체 서열의 패밀리에 있어서, 상대적인 검정에서 패밀리에 구성원에 대해 관찰된 최대의 거의 절반보다 적고, 그리고 상대적인 검정에서 패밀리에 구성원에 대해 관찰된 최대보다 적은, 예를 들면, 최대보다 적고 약 25%일 수 있는 사이토카인 방출을 유도하는 항체가 치료적 용도를 위해 선별될 수 있다. 일부 구체예에서, 이중특이성 또는 다중특이적 항체가 제공되는데, 이들은 항체 패밀리에로부터의 중쇄 가변 영역을 적어도 포함하고, 그리고 본원에서 제공된 중쇄와 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 이중특이성 항체는 적어도, CD3 이외의 단백질에 특이적인 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 그리고 중쇄와 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 이런 구체예에서, 제2 항체는 종양 연관된 항원, 표적화 항원, 예를 들면, 인테그린 등, 병원체 항원, 체크포인트 단백질, 기타 등등에 특이적으로 결합한다. 단일 사슬 폴리펩타이드, 2개 사슬 폴리펩타이드, 3개 사슬 폴리펩타이드, 4개 사슬 폴리펩타이드, 그리고 이들의 복합을 제한 없이 포함하는 다양한 형식의 이중특이성 항체가 본 발명의 범위 안에 있다.

[0013] 각각의 CD3 특이적 항체는 인간 VH 프레임워크에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 패밀리에 2 CDR 서열은 예로서, CDR1, CDR2 및 CDR3에 대해 각각 서열 번호 1 내지 18에 제시된, 제공된 예시적인 가변 영역 서열의 아미노산 잔기 26 내지 33; 51 내지 58; 및 97 내지 112 주변의 영역에 위치될 수 있다. 비록 일반적으로 서열의 순서가 동일하게 남아있을 것이지만, 만약 상이한 프레임워크 서열이 선별되면, 이들 CDR 서열은 상이한 위치에 있을 수 있는 것으로 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0014] 패밀리에 2 항체에 대한 CDR 서열은 다음의 서열식을 가질 수 있다. X는 가변적 아미노산을 나타내는데, 이것은 이하에 나타내는 바와 같은 특정한 아미노산일 수 있다.

[0015] CDR1

[0016] G₁F₂T₃F₄X₅X₆Y₇A₈

[0017] 식 중,

[0018] X₅는 임의의 아미노산일 수 있고; 일부 실시형태에서, X₅는 D, A 또는 H이며; 일부 실시형태에서 X₅는 D이다.

- [0019] X₆은 임의의 아미노산일 수 있고; 일부 실시형태에서 X₆은 D 또는 N이며; 일부 실시형태에서 D₆은 D이다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR1 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18, 잔기 26 내지 33에 제시된 서열을 포함한다.
- [0021] CDR2
- [0022] I₁ S₂ W₃ N₄ S₅ G₆ S₇ I₈
- [0023] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR2 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18에 제시된 서열, 잔기 51 내지 58을 포함한다.
- [0024] CDR3
- [0025] A₁ K₂ D₃ S₄ R₅ G₆ Y₇ G₈ X₉ Y₁₀ X₁₁ X₁₂ G₁₃ G₁₂ A₁₅ Y₁₆
- [0026] 식 중,
- [0027] X₉는 임의의 아미노산일 수 있고, 일부 실시형태에서, X₉는 D 또는 S이며; 일부 실시형태에서, X₉는 D이고;
- [0028] X₁₁는 임의의 아미노산일 수 있으며, 일부 실시형태에서 X₁₁는 R 또는 S이고;
- [0029] X₁₂는 임의의 아미노산일 수 있으며, 일부 실시형태에서 X₁₂는 L 또는 R이다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CD3 서열은 식 A K D S R G Y G D Y X₁₁ X₁₂ G G A Y를 갖되, 여기서 X₁₁ 및 X₁₂는 상기 정의한 바와 같다. 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR3 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18에 제시된 서열, 잔기 97 내지 112를 포함한다. 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항체의 CD3-결합 VH 도메인은 경쇄 가변 영역 도메인과 짝지어진다. 일부 이러한 실시형태에서, 경쇄는 고정된 경쇄이다.
- [0031] 일부 구체예에서 경쇄는 인간 VL 프레임워크에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다. CDR 서열은 서열 번호 19를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1 서열은 CDR1, CDR2, CDR3에 대해 각각 아미노산 잔기 27-32; 50-52; 89-97을 포함한다.
- [0032] 일부 구체예에서 본 발명의 항체의 CDR 서열은 서열 번호 1 내지 18에서 CDR 서열 또는 CDR 서열의 세트에 대해 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 99% 동일성을 갖는 서열이다. 일부 구체예에서 본 발명의 CDR 서열은 서열 번호 1 내지 18 중 임의의 하나에서 CDR 서열 또는 CDR 서열의 세트에 대해 1 개, 2개, 3개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예에서 상기 아미노산 치환(들)은 앞서 제공된 패밀리 2 서열식에 대해, CDR1의 위치 5 또는 10, CDR2의 위치 2, 6 또는 7, CDR3의 위치 1, 8, 9 또는 10 중의 하나 이상이다.
- [0033] 일부 구체예에서, 본 발명의 이종특이성 항체는 경쇄와 대함된, 본원에서 설명된 CD3-결합 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서 경쇄는 서열 번호 19에 제시된 가변 영역 서열, 또는 서열 번호 19에서 CDR 서열의 세트 및 프레임워크 서열을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 다양한 Fc 서열은 제한 없이, 인간 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 등에서 용도를 발견한다. 일부 구체예에서, 이종특이성 항체의 제2 아암(arm)은 종양-연관된 항원에 특이적으로 결합하는 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 이종특이성 항체의 제2 아암은 BCMA에 특이적으로 결합하는 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서 항-BCMA 아암은 예로서, 도 2B에 도시된 바와 같은 단일 사슬 가변 영역이다. 일부 구체예에서 항-BCMA 아암은 서열 번호 20에 제시된 가변 영역 서열; 또는 서열 번호 21에 제시된 탠덤 가변 영역 서열을 포함한다. 항-BCMA 아암의 Fc 서열은 제한 없이, 인간 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 등일 수 있다. CDR 서열은 서열 번호 20에서 내포된 것들일 수 있다. 일부 구체예에서, CDR 서열은 CDR1, CDR2, CDR3 각각에 대해 아미노산 잔기 26-33; 51-58; 97-108을 포함한다.
- [0034] 다른 구체예에서, 적어도 본 발명의 CD3-결합 VH 도메인, 예를 들면, 적어도 본 발명의 CD3-결합 VH 도메인을 포함하는 단일특이적, 이종특이성, 기타 등등의 항체 또는 항체-유사 단백질; 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 조성물은 동결건조되거나, 용액에서 현탁되거나, 기타 등등일 수 있고, 그리고 단위 용량 제제에서 제공될 수 있다.
- [0035] 일부 구체예에서, 암의 치료를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 본 발명의 단일특이적, 이종특이성, 기타 등등의 항체의 유효 용량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 항체가 이종특이성인 경우에, 두

번째 항원 결합 부위는 종양 항원, 체크포인트 단백질 등에 특이적으로 결합할 수 있다. 다양한 구체예에서, 암은 난소암, 유방암, 위장관암, 뇌암, 두경부암, 전립선암, 결장암, 폐암, 백혈병, 림프종, 육종, 암종, 신경 세포 종양, 편평상피 세포 암종, 생식 세포 종양, 전이, 미분화된 종양, 정상피종, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 혼합된 세포 종양, 그리고 감염체에 의해 유발된 신생물로 구성된 군에서 선택된다.

[0036] 일부 구체예에서, 감염성 질환의 치료를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 본 발명의 단일특이성, 이중특이성, 기타 등등의 항체의 유효 용량을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 항체가 이중특이성인 경우에, 두 번째 항원 결합 부위는 병원체 항원, 예를 들면, 세균, 바이러스 또는 기생충에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0037] 다른 구체예에서, 본 발명의 이중특이성 항체의 생산을 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 항체 서열, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 경쇄 인코딩 서열, 하나 또는 그 이상의 중쇄 인코딩 서열을 단일 숙주 세포에서 발현하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포, 예를 들면, 포유류 세포일 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 실시 예에 따른 CD3 결합 항체는 치료적 작용제(들)로서 유용성에 기여하는 다수의 유익성을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 본 발명은 첨부된 도면과 공동으로 읽혀질 때, 하기 상세한 설명으로부터 최적으로 이해된다. 특허 또는 출원 파일은 유색으로 작성된 적어도 하나의 도면을 내포한다. 유색 도면(들)을 갖는 이러한 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요구 및 수수료의 납부 시에 사무국에 의해 제공될 것이다. 통상의 관례에 따라, 이들 도면의 다양한 특질은 일정한 비율이 아닌 것으로 강조된다. 이에 반하여, 다양한 특질의 치수는 명료성을 위해 임의적으로 확대되거나 축소된다. 이들 도면에는 하기 도면이 포함된다.

도 1a 내지 도 1c. 도 1a는 잔기 26-33; 51-58; 및 97-112에 대응하는 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 내지 18의 항체 패밀리 2 구성원의 CDR1, 2 및 3 영역의 정렬을 도시한 도면. **도 1b**는 고정된 경쇄의 CDR1, 2 및 3 영역(서열번호 19); 및 예시적인 항-BCMA 서열(서열번호 20 및 서열번호 21)을 나타낸다. **도 1c**는 기준 항-CD3 항체의 CDR 서열(서열번호 22), ID 304704를 제공한다.

도 2a 내지 도 2e. 이중특이성 인간 항체의 계통도 모형을 도시한 도면. **도 2a** 통상적인 경쇄를 갖는 항-CD3:항-종양-항원 이중특이성 항체(총 3개의 독특한 사슬). **도 2b** 2개의 독특한 경쇄를 갖는 항-CD3:항-종양-항원 이중특이성 항체(총 4개의 독특한 사슬). **도 2c** 중쇄 단독 종양 항원 결합 도메인 사슬을 갖는 항-CD3:항-종양-항원 이중특이성 항체(3개의 독특한 사슬). **도 2d** scFv 종양 항원 결합 도메인을 갖는 항-CD3:항-종양-항원 이중특이성 항체(총 3개의 독특한 사슬). **도 2e** scFv 항-CD3 결합 도메인을 갖는 항-CD3:항-종양-항원 이중특이성 항체(총 3개의 독특한 사슬).

도 3. 항-CD3 패밀리 2 데이터 표가 단일특이성 및 이중특이성 형식에서 항-CD3 항체의 거동을 요약하는 도면. 칼럼 1은 항-CD3 VH 서열에 대한 서열 ID를 보여준다. 칼럼 2는 부모 단일특이성 항-CD3의 Jurkat 세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다. 칼럼 3은 부모 단일특이성 항-CD3의 cyno T-세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다. 칼럼 4는 aCD3:aBCMA 이중특이성 항체의 명칭을 보여준다. 칼럼 5는 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-2를 보여준다. 칼럼 6은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-6을 보여준다. 칼럼 7은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-10을 보여준다. 칼럼 8은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IFN- γ 를 보여준다. 칼럼 9는 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 TNF α 를 보여준다. 칼럼 10은 인간 범 T-세포의 존재에서 이중특이성 항체-매개된 U266 종양 세포 용해의 EC50을 보여준다. 칼럼 11은 333ng/mL의 용량의 이중특이성 항체에서 이중특이성 항체 및 인간 범 T-세포의 존재에서 U266 종양 세포의 용해 퍼센트를 보여준다. 칼럼 12는 Octet에 의해 측정된 이중특이성 항체의 항-CD3 아암의 단백질 결합 친화도를 보여준다. 칼럼 13은 이중특이성 항체의 Jurkat 세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다.

도 4. 이중특이성 항체-매개된 종양 세포 용해. 각각 독특한 항-CD3 아암 및 통상적인 항-BCMA 아암을 갖는 7가지 α CD3_{fam2}:aBCMA 이중특이성 항체는 활성화된 일차 T 세포의 전향을 통해 U266 BCMA+ 종양 세포를 사멸시키는 능력에 대해 검사되었다. 이러한 실험에서 BCMA를 발현하는 U266 세포는 이중특이성 항체의 첨가와 함께 10:1 E:T 비율에서, 활성화된 범 T-세포와 혼합되었다. x 축은 이용된 항체의 농도를 보여주었고, 그리고 y 축은 항체의 첨가 후 6 시간에 종양 세포의 용해 %를 보여준다.

도 5. 이중특이성 U266 사멸 활성은 IL-2 방출과 상관하였다. 이중특이성 항체-매개된 종양 세포 용해 활성의 IL-2 사이토카인 방출과의 비교는 산점도에서 도시된다. IL-2 생산 및 U266 종양 세포 용해 사이에 상관은 $R^2 = 0.37$ 이다.

도 6. 이중특이성 U266 사멸 활성은 IFN- γ 방출과 상관하였다. 이중특이성 항체-매개된 종양 세포 용해 활성의 IFN- γ 사이토카인 방출과의 비교는 산점도에서 도시된다. IFN-g 생산 및 U266 종양 세포 용해 사이에 상관은 $R^2 = 0.53$ 이다.

도 7. 이중특이성 U266 사멸 활성은 항-CD3 결합 친화도와 상관 관계가 있었다. 이중특이성 항체-매개된 U266 종양 세포 용해 활성의 항-CD3 결합 친화도와의 비교는 산점도에서 도시된다. U266 사멸 EC50 및 단백질 결합 친화도 사이의 상관은 $R^2 = 0.93$ 이다.

도 8a 내지 도 8d. 이중특이성 항체-매개된 종양 세포 용해. α CD3_{F1F}:aBCMA 이중특이성 항체는 활성화된 일차 T 세포의 전향을 통해 3가지 상이한 BCMA+ 종양 세포 및 1가지 BCMA-음성 세포주를 사멸시키는 능력에 대해 검증되었다. 이러한 실험에서, 종양 세포는 이중특이성 항체의 첨가와 함께 10:1 E:T 비율에서, 활성화된 범 T-세포와 혼합되었다. **도 8a**는 RPMI-8226 세포의 사멸을 보여주고, **도 8b**는 NCI-H929 세포의 사멸을 보여주고, **도 8c**는 U-266 세포의 사멸을 보여주고, 그리고 **도 8d**는 음성 대조군인 K562 세포의 사멸을 보여준다. x 축은 이용된 항체의 농도를 보여주고, 그리고 y 축은 항체의 첨가 후 6 시간에 종양 세포의 용해 %를 보여준다.

도 9a 내지 도 9d. 이중특이성 항체-매개된 IL-2 방출. IL-2 사이토카인 방출의 수준은 휴지기 인간 T 세포가 다양한 종양 세포주 및 증가하는 용량의 α CD3_{F1F}:aBCMA 이중특이성 항체와 함께 배양된 후 측정되었다. **도 9a**는 RPMI-8226 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, **도 9b**는 NCI-H929 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, **도 9c**는 U-266 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, 그리고 **도 9d**는 음성 대조군인 K562 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여준다.

도 10a 내지 도 10d. 이중특이성 항체-매개된 IFN- γ 방출. IFN- γ 사이토카인 방출의 수준은 휴지기 인간 T 세포가 다양한 종양 세포주 및 증가하는 용량의 α CD3_{F1F}:aBCMA 이중특이성 항체와 함께 배양된 후 측정되었다. **도 10a**는 RPMI-8226 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, **도 10b**는 NCI-H929 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, **도 10c**는 U-266 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, 그리고 **도 10d**는 음성 대조군인 K562 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 아래에 규정된다.
- [0041] 본 발명의 활성제 및 방법이 설명되기에 앞서, 본 발명은 설명된 특정 방법, 산물, 기구 및 인자에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이런 방법, 기구 및 제제가 당연히, 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본원에서 이용된 용어는 단지 특정 구체예를 설명하는 것을 목적으로 하고 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는 것으로 이해되고, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 한정될 것이다.
- [0042] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 이용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥에서 달리 지시되지 않으면, 복수 지시 대상을 포함하는 것으로 유의되어야 한다. 따라서 가령, "약물 후보"에 대한 지시는 이런 후보 중에서 한 가지 또는 혼합물을 지시하고, 그리고 "방법"에 대한 지시는 당업자에게 공지된 동등한 단계와 방법에 대한 지시를 포함하고, 기타 등등이다.
- [0043] 달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 언급된 모든 간행물은 상기 간행물에서 설명되고 본원에서 설명된 발명과 관련하여 이용될 수 있을 지도 모르는 장치, 제제 및 방법을 설명하고 개시하는 목적으로 본원에서 참조로서 편입된다.

- [0044] 값의 범위가 제공되는 경우에, 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 상기 범위의 상한선과 하한선 사이에서 하한선의 단위의 1/10까지의 각 사이에 있는 값, 그리고 언급된 범위 내에 임의의 다른 언급된 또는 개재값은 본 발명의 범위 안에 포괄되는 것으로 이해된다. 이들 더욱 작은 범위의 상한선과 하한선은 더욱 작은 범위 내에 독립적으로 포함될 수 있고, 그리고 또한, 본 발명의 범위 안에 포괄되고 언급된 범위 내에 임의의 특정적으로 배제된 한계에 종속된다. 언급된 범위가 한계 중에서 한쪽 또는 양쪽을 포함하는 경우에, 이들 포함된 한계의 한쪽 또는 양쪽을 배제하는 범위 역시 본 발명에서 포함된다.
- [0045] 다음 설명에서, 본 발명의 더욱 철저한 이해를 제공하기 위해 다양한 특정한 상세가 진술된다. 하지만, 이들 특정한 상세 중에서 하나 또는 그 이상이 없어도, 본 발명이 실시될 수 있다는 것은 당업자에게 명확할 것이다. 다른 경우에, 당업자에게 널리 공지된 특질 및 절차는 본 발명을 모호하게 하는 것을 방지하기 위해 설명되지 않았다.
- [0046] 일반적으로, 당해 분야의 기술 내에 단백질 합성, 재조합 세포 배양 및 단백질 단리, 그리고 재조합 DNA 기술의 전통적인 방법이 본 발명에서 이용된다. 이런 기술은 기존 문헌에서 충분히 설명된다, 가령, 문헌[Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Sambrook, Russell and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); 및 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)]을 참조한다.
- [0047] 정의
- [0048] "포괄하는"은 언급된 요소가 조성물/방법/키트에서 필요하지만, 조성물/방법/키트 등을 형성하기 위해 다른 요소가 청구항의 범위 내에 포함될 수 있는 것으로 의미된다.
- [0049] "본질적으로 구성되는"은 설명된 조성물 또는 방법의 범위를, 본 발명의 기본적인 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 주지 않는 특정된 물질 또는 단계로 제한하는 것으로 의미된다.
- [0050] "구성되는"은 청구범위에서 특정되지 않은 임의의 원소, 단계 또는 성분을 조성물, 방법 또는 키트로부터 배제하는 것으로 의미된다.
- [0051] 본원에서 용어 "치료", "치료하는" 등은 일반적으로, 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 의미하는데 이용된다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방적 및/또는 질환 및/또는 질환에 기인한 부작용에 대한 부분적인 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, "치료"는 포유동물에서 질환의 임의의 치료를 포괄하고, 그리고 (a) 질환에 대한 소인이 있지만 이를 앓는 것으로 아직 진단되지 않은 개체에서 질환이 발생하는 것을 예방하는; (b) 질환을 저해하는, 다시 말하면, 이의 발달을 중지시키는; 또는 (c) 질환을 경감하는, 다시 말하면, 질환의 관해를 유발하는 것을 포함한다. 치료적 작용제는 질환 또는 손상의 발생 이전에, 동안 또는 이후에 투여될 수 있다. 치료가 환자의 원치 않는 임상 증상을 안정시키거나 또는 감소시키는 진행성 질환의 치료가 특히 관심된다. 이런 치료는 바람직하게는, 영향을 받은 조직에서 기능의 완전한 상실에 앞서 수행된다. 대상 요법은 질환의 증상 단계 동안, 그리고 일부 경우에 질환의 증상 단계 이후에 투여될 수 있다.
- [0052] "치료 효과량"은 치료적 유익성을 개체에게 부여하는데 필요한 활성제의 양인 것으로 의도된다. 가령, "치료 효과량"은 질환과 연관된 병리학적 증상, 질환 진행 또는 생리학적 상태에서 향상을 유도하거나, 개선하거나 또는 만약 그렇지 않으면 유발하는, 또는 장애에 대한 저항을 향상시키는 양이다.
- [0053] 용어 "피험자", "개체" 및 "환자"는 치료를 위해 사정되는 및/또는 치료되는 포유동물을 지칭하기 위해 본원에서 상호 호환 가능하게 이용된다. 한 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 용어 "피험자", "개체" 및 "환자"는 제한 없이, 암을 앓는 개체, 자가면역 질환을 앓는 개체, 병원체 감염을 앓는 개체, 기타 등등을 포괄한다. 개체는 인간일 수 있지만, 다른 포유동물, 특히 인간 질환에 대한 실험실 모형으로서 유용한 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 쥐 등을 또한 포함한다.
- [0054] 용어 "암", "신생물" 및 "종양"은 세포 증식에 대한 제어의 유의미한 상실에 의해 특징되는 일탈적 성장 표현형을 전시하도록, 자율적인 조절되지 않은 성장을 전시하는 세포를 지칭하기 위해 본원에서 상호 호환 가능하게 이용된다. 본 출원에서 검출, 분석 또는 치료를 위한 관심되는 세포는 전암성(가령, 양성), 악성, 전전이성, 전이성 및 비전이성 세포를 포함한다. 사실상 모든 조직의 암이 알려져 있다. 관용구 "암 부담"은 개체에서 암 세포의 쿼터 또는 암 부피를 지칭한다. 암 부담을 감소시키는 것은 따라서, 개체에서 암 세포의 숫자 또는 암 부

피를 감소시키는 것을 지칭한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "암 세포"는 암 세포이거나, 또는 암 세포로부터 유래되는 임의의 세포, 예를 들면, 암 세포의 클론을 지칭한다. 고형 종양, 예를 들면, 암종, 육종, 교모 세포종, 흑색종, 림프종, 골수종 등, 그리고 순환하는 암, 예를 들면, 특징적으로 B 세포 백혈병, T 세포 백혈병 등을 비롯한 백혈병을 포함하는 많은 유형의 암이 당업자에게 공지되어 있다. 암의 실례는 난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 전립선암, 간세포암, 위암, 췌장암, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로의 암, 갑상선암, 신장암, 암종, 흑색종, 두경부암 및 뇌암을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0055] "항체 의존성 세포 매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체를 발현하는 비특이적 세포독성 세포, 예를 들면, 자연 살해 세포, 호중구 및 대식세포가 표적 세포 상에서 결합된 항체를 인식하고 표적 세포의 용해를 유발하는 세포 매개 반응을 지칭한다. ADCC 활성화는 미국 특허 번호 5,821,337에서 설명된 것들과 같은 방법을 이용하여 사정될 수 있다. ADCP는 항체 의존성 세포-매개된 식균작용을 지칭한다.

[0056] "효과기 세포"는 하나 또는 그 이상의 불변 영역 수용체를 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다.

[0057] "사이토카인"은 한 세포에 의해 방출되고 다른 세포에서 세포간 매개체로서 작용하는 단백질이다. 관심 대상의 사이토카인은 활성화된 T 세포로부터 방출된 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IFN γ 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0058] "비면역원성"은 면역 반응을 개시하거나, 유발하거나 또는 증강하지 않는 물질을 지칭하는데, 여기서 면역 반응은 적응성 및/또는 선천성 면역 반응을 포함한다.

[0059] 용어 "단리된"은 물질이 본래 환경(가령, 만약 이것이 자연발생하면, 자연 환경)으로부터 이전된다는 것을 의미한다. 가령, 살아있는 동물에서 존재하는 자연발생 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리되지 않지만, 자연 시스템 내에 공존하는 물질 중에서 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리된다. 이런 폴리뉴클레오타이드는 백터의 일부일 수 있고 및/또는 이런 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 조성물의 일부일 수 있고, 그리고 이런 백터 또는 조성물이 이의 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리될 수 있다.

[0060] "약제학적으로 허용되는 부형제"는 일반적으로 안전하고, 비-독성이고, 그리고 바람직한 약제학적 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하고, 그리고 수의학적 용도뿐만 아니라 인간 약제학적 용도를 위해 허용되는 부형제를 포함한다. 이런 부형제는 고체, 액체, 반고체, 또는 에어로졸 조성물의 경우에, 가스일 수 있다.

[0061] "약제학적으로 허용되는 염 및 에스테르"는 약제학적으로 허용되고 원하는 약리학적 성질을 갖는 염 및 에스테르를 의미한다. 이런 염은 화합물 내에 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있는 경우에 형성될 수 있는 염을 포함한다. 적합한 무기 염은 알칼리 금속, 예를 들면, 나트륨 및 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 그리고 알루미늄으로 형성된 것들을 포함한다. 적합한 유기 염은 유기 염기, 예를 들면, 아민 염기, 예를 들면, 에탄올아민, 다이에탄올아민, 트라이에탄올아민, 트로메타민, N 메틸글루카민 등으로 형성된 것들을 포함한다. 이런 염은 또한, 무기 산(가령, 염화수소산 및 브롬화수소산) 및 유기 산(가령, 아세트산, 구연산, 말레산, 그리고 알칸- 및 아렌-설폰산, 예를 들면, 메탄설폰산 및 벤젠설폰산)으로 형성된 산 부가염을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 에스테르는 화합물, 예를 들면, C₁₋₆ 알킬 에스테르 내에 존재하는 카복시, 술폰일옥시 및 포스포노옥시 기로부터 형성된 에스테르를 포함한다. 2개의 산성 기가 존재할 때, 약제학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 모노-산-모노-염 또는 에스테르 또는 다이-염 또는 에스테르일 수 있으며; 그리고 유사하게, 2개 이상의 산성 기가 존재하는 경우에, 이런 기 중에서 일부 또는 전부는 염화 또는 에스테르화될 수 있다. 본 발명에서 명명된 화합물은 비염화 또는 비에스테르화 형태, 또는 염화 및/또는 에스테르화 형태에서 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 본래 (비염화와 비에스테르화) 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염과 에스테르 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명에서 명명된 일정한 화합물은 하나 이상의 입체이성질체 형태에서 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 모든 단일 입체이성질체 및 이런 입체이성질체의 모든 혼합물(라세미체인지 또는 다른 것인지에 상관없이)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0062] 용어 "약제학적으로 허용되는", "생리학적으로 내약성" 및 이들의 문법적 변이는 이들이 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 지칭할 때 상호 호환 가능하게 이용되고, 그리고 이들 물질이 조성물의 투여를 금지시킬 정도까지 바람직하지 않은 생리학적 효과의 발생 없이 인간에게 투여될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0063] 두 서열 사이에 "상동성"은 서열 동일성에 의해 결정된다. 만약 서로 비교되는 두 서열이 길이에서 서로 다르다면, 서열 동일성은 바람직하게는, 더욱 긴 서열의 뉴클레오타이드 잔기와 동일한 더욱 짧은 서열의 뉴클레오타이드 잔기의 백분율에 관계한다. 서열 동일성은 전통적으로, 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, Bestfit 프로그램

램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix용 버전 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711)의 이용으로 결정될 수 있다. Bestfit는 두 서열 사이에 가장 높은 서열 동일성을 갖는 분절을 찾기 위해, Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489의 국부 상동성 알고리즘을 활용한다. 특정 서열이 본 발명의 참고 서열과 예로서 95% 동일성을 갖는 지를 결정하기 위해 Bestfit 또는 다른 서열 정렬 프로그램을 이용할 때, 파라미터는 바람직하게는, 동일성의 백분율이 참고 서열의 전장에 걸쳐 계산되고, 그리고 참고 서열 내에 뉴클레오타이드의 총수의 5%까지의 상동성 갭이 허용되도록 조정된다. Bestfit를 이용할 때, 이른바 임의선택적 파라미터는 바람직하게는, 그들의 미리 설정된 ("디폴트") 값에 남아있다. 소정의 서열 및 본 발명의 전술한 서열 사이에 비교에서 나타나는 편차는 예로서, 부가, 결실, 치환, 삽입 또는 재조합에 의해 유발될 수 있다. 이런 서열 비교는 바람직하게는, 프로그램 "fasta20u66" (1998년 9월 William R. Pearson 및 University of Virginia에 의한 버전 2.0u66; W. R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, 첨부된 실례 및 <http://workbench.sdsc.edu/>를 또한 참조한다)으로 또한 실행될 수 있다. 이런 목적으로, "디폴트" 파라미터 세팅이 이용될 수 있다.

[0064] "변이체"는 선천적 서열 폴리펩타이드로부터 얼마간 다른 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 통상적으로, 아미노산 서열 변이체는 서열에 의해 적어도 약 80% 서열 동일성, 더욱 바람직하게는, 적어도 약 90% 상동성을 소유할 것이다. 아미노산 서열 변이체는 참고 아미노산 서열 내에 일정한 위치에서 치환, 결실 및/또는 삽입을 소유할 수 있다.

[0065] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 자신에게 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 가지 유형은 "플라스미드"인데, 이것은 추가 DNA 분절이 결합될 수 있는 환상 이중가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 벡터인데, 여기서 추가 DNA 분절이 바이러스 유전체 내로 결합될 수 있다. 일정한 벡터(가령, 세균 복제 기점 및 에피솜 포유류 벡터를 갖는 세균 벡터)는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자동 복제할 수 있다. 다른 벡터(가령, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 유전체 내로 통합될 수 있고, 그리고 따라서, 숙주 유전체와 함께 복제된다. 게다가, 일정한 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 주도할 수 있다. 이런 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히, "재조합 벡터")로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성의 발현 벡터는 종종, 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호 호환 가능하게 이용될 수 있는데, 그 이유는 플라스미드가 벡터의 가장 흔히 이용되는 형태이기 때문이다.

[0066] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"(또는 "재조합 숙주 세포")는 외인성 폴리뉴클레오타이드, 예를 들면, 재조합 플라스미드 또는 벡터의 도입에 의해 유전적으로 변경되었거나, 또는 유전적으로 변경될 수 있는 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이런 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이런 세포의 자손을 지칭하는 것으로 의도되는 것으로 이해되어야 한다. 일정한 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 일어날 수 있기 때문에, 이런 자손은 실제로, 부모 세포와 동일하지 않을 수도 있지만, 여전히 본원에서 이용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다.

[0067] "결합 친화도"는 일반적으로, 분자(가령, 항체 또는 다른 결합 분자)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 상대(가령, 항원 또는 수용체) 사이에 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 상대 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로, 해리 상수 (Kd)에 의해 표현될 수 있다. 친화도는 본원에서 설명된 것들을 비롯한 당해 분야에서 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 낮은 친화도 항체는 항원(또는 수용체)에 약하게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있고, 반면 높은 친화도 항체는 항원(또는 수용체)에 더욱 단단하게 결합하고 더욱 길게 결합된 상태로 남아있다.

[0068] 반대로 특정적으로 지시되지 않으면, 본원에서 설명되고 청구된 바와 같은 용어 "접합체"는 하나 또는 그 이상의 중합체 분자(들)에 하나 또는 그 이상의 항체 단편(들)의 공유 부착에 의해 형성된 이질성 분자로서 규정되는데, 여기서 상기 이질성 분자는 수용성이다, 다시 말하면, 생리학적 유체, 예를 들면, 혈액에서 가용성이고, 그리고 여기서 상기 이질성 분자는 임의의 구조화된 응집체가 없다. 관심되는 접합체는 PEG이다. 전술한 정의의 맥락에서, 용어 "구조화된 응집체"는 (1) 이질성 분자가 미셀 또는 다른 유체 구조 내에 있지 않고 지질 이중층, 소포 또는 리포솜에 고정되지 않도록 회전타원체 또는 회전타원체 껍질 구조를 갖는, 수성 용액에서 분자의 임의의 응집체; 및 (2) 수성 상과의 접촉 시에 이질성 분자를 용액 내로 방출하지 않는 고체 또는 불용화 형태, 예를 들면, 크로마토그래피 비드 매트릭스에서 분자의 임의의 응집체를 지칭한다. 따라서, 본원에서 규정된 바와 같이, 용어 "접합체"는 고체의 수화 시에 이질성 분자를 수성 용액 내로 방출할 수 있는 침전물, 침강물, 생물부식성 매트릭스 또는 다른 고체 내에 전술한 이질성 분자를 포괄한다.

- [0069] 단어 "표지"는 본원에서 이용될 때, 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합되는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체로 검출 가능할 수 있거나 (가령, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소적 표지의 경우에, 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매작용할 수 있다.
- [0070] "고체상"은 본 발명의 항체가 부착할 수 있는 비수성 매트릭스인 것으로 의미된다. 본원에서 포괄된 고체상의 실례는 유리(가령, 제어된 다공성 유리), 다당류(가령, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알코올 및 실리콘으로 부분적으로 또는 완전하게 형성된 것들을 포함한다. 일정한 구체예에서, 문맥에 따라, 고체상은 검정 평판의 웰을 포함할 수 있다; 다른 것들에서 이것은 정제 칼럼(가령, 친화도 크로마토그래피 칼럼)이다. 이러한 용어는 또한, 구별된 입자의 불연속적 고체상, 예를 들면, 미국 특허 번호 4,275,149에서 설명된 것들을 포함한다.
- [0071] 면역글로불린으로서 또한 지칭되는 항체는 전통적으로, 적어도 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 포함하는데, 여기서 중쇄와 경쇄의 아미노 말단 도메인은 서열에서 가변적이고, 따라서 가변 영역 도메인, 또는 가변 중쇄(VH) 또는 가변 경쇄(VH) 도메인으로서 통상적으로 지칭된다. 비록 여기에서 논의된 바와 같이, 특이적 결합이 중쇄 단독 가변 서열로도 획득될 수 있고, 그리고 항체의 다양한 비자연 형상이 당해 분야에서 알려져 있고 이용되긴 하지만, 이들 두 도메인은 전통적으로 연관하여 특이적 결합 영역을 형성한다.
- [0072] "기능적" 또는 "생물학적으로 활성" 항체 또는 항원 결합 분자(본원에서 중쇄 단독 항체 및 이중특이성 3-사슬 항체-유사 분자(TCA) 포함)는 구조적, 조절적, 생화학적 또는 생물물리학적 사건에서 자연 활성 중에서 하나 또는 그 이상을 발휘할 수 있는 것이다. 가령, 기능적 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들면, TCA는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 가질 수 있고, 그리고 이러한 결합은 차례로, 세포 또는 분자 사건, 예를 들면, 신호 전달 또는 효소 활성을 이끌어내거나 또는 변경할 수 있다. 기능적 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들면, TCA는 또한, 수용체의 리간드 활성화를 차단하거나, 또는 효현제 또는 길항제로서 행동할 수 있다. 자연 활성 중에서 하나 또는 그 이상을 발휘하는 항체 또는 다른 결합 분자, 예를 들면, TCA의 능력은 폴리펩타이드 사슬의 적절한 접힘과 어셈블리를 비롯한 여러 인자에 의존한다.
- [0073] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 이용되고, 그리고 단일클론 항체, 다중클론 항체, 단위체, 이합체, 다합체, 다중특이적 항체(가령, 이중특이성 항체), 중쇄 단독 항체, 3개 사슬 항체, 단일 사슬 Fv, 나노바디 등을 특징적으로 커버하고, 그리고 또한, 원하는 생물학적 활성을 전시하기만 하면, 항체 단편을 포함한다(Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). 항체는 무린, 인간, 인간화, 키메라, 또는 다른 종으로부터 유래된 항체일 수 있다.
- [0074] 용어 항체는 전장 중쇄, 전장 경쇄, 무손상 면역글로불린 분자; 또는 이들 폴리펩타이드 중에서 어느 것의 면역학적으로 활성 부분, 다시 말하면, 관심되는 표적의 항원 또는 이의 부분에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩타이드를 지칭할 수 있고, 이런 표적은 자가면역 질환과 연관된 자가면역 항체를 생산하는 암 세포 또는 세포들을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본원에서 개시된 면역글로불린은 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2), 또는 감소된 또는 증강된 효과기 세포 활성을 제공하는 변경된 Fc 부분을 갖는 가공된 하위부류를 포함하는 면역글로불린 분자의 하위부류를 가질 수 있다. 면역글로불린은 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 한 양상에서, 면역글로불린은 주로 인간 기원이다.
- [0075] 용어 "가변"은 가변 도메인의 일정한 부분이 항체 사이에서 서열에서 광범위하게 상이하고, 그리고 특정 항원에 대한 각 특정 항체의 결합 및 특이성에 이용된다는 사실을 지칭한다. 하지만, 가변성은 항체의 가변 도메인의 전역에서 균등하게 분포되지 않는다. 이것은 경쇄와 중쇄 가변 도메인 둘 모두에서 초가변 영역으로 불리는 3개의 분절에서 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역(FR)으로 불린다. 선천적 중쇄와 경쇄의 가변 도메인은 각각, 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 베타-시트 형상을 주로 채택하는 4개의 FR을 포함하고, 이들은 루프 연결을 형성하고, 그리고 일부 경우에, 베타-시트 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬에서 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하여 결합되고, 그리고 다른 사슬로부터 초가변 영역과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접적으로 관련되지 않지만, 다양한 효과기 기능, 예를 들면, 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)에서 항체의 참여를 전시한다.
- [0076] 본원에서 이용될 때, 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 책임지는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터 아미노산 잔기 및/또는 "초가변 루프"로부터 잔기를 포함할 수

있다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외에 가변 도메인 잔기이다.

[0077] 관심되는 가변 영역은 본원에서 제공된 패밀리 2 가변 영역으로부터 적어도 하나의 CDR 서열, 통상적으로 적어도 2개의 CDR 서열, 그리고 더욱 통상적으로 3개의 CDR 서열을 포함한다. 예시적인 CDR 지정이 본원에서 도시되지만, 당업자는 서열 가변성에 근거되고 가장 흔히 이용되는 Kabat 정의를 비롯하여, CDR의 다양한 정의가 통상적으로 이용되고 있다는 것을 이해할 것이다("Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010;47:694-700을 참조한다). Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 근거된다(Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989;342:877-883). 관심되는 대안적 CDR 정의는 제한 없이, 문헌[Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes." *J Immunol.* 2008;181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004;17:132-143; 및 Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995;9:133-139]에 의해 개시된 것들을 포함하는데, 이들은 각각 본원에서 특정적으로 참조로서 편입된다.

[0078] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "단일클론 항체"는 실제로 균질한 항체의 개체군으로부터 획득된 항체를 지칭한다. 다시 말하면, 상기 개체군을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이고 단일 항원성 부위에 대해 지향된다. 게다가, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제조물과 대조적으로, 각 단일클론 항체는 항원 상에서 단일 결정인자에 대해 지향된다. 단일클론 항체는 그들의 특이성에 더하여, 다른 항체에 의해 오염되지 않게 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "단일클론"은 항체의 실제로 균질한 개체군으로부터 획득되는 것으로서 항체의 특징을 지시하고, 그리고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다.

[0079] 본원에서 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 또는 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 또는 이들 서열에 상동하고, 반면 사슬(들)의 나머지 부분이 다른 종으로부터 유래되거나 또는 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 또는 이들 서열에 상동한 "키메라" 항체뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 전시하기만 하면, 이런 항체의 단편을 특정적으로 포함한다(미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌[Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855]). 본원에서 관심되는 키메라 항체는 비인간 영장류(가령, 긴꼬리원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0080] 본원에서 이용된 바와 같이, "무손상 항체 사슬"은 전장 가변 영역 및 전장 불변 영역(Fc)을 포함하는 것이다. 무손상의 "전통적인" 항체는 분비된 IgG에 대한 무손상 경쇄 및 무손상 중쇄뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, 힌지, CH2 및 CH3을 포함한다. 다른 아이소타입, 예를 들면, IgM 또는 IgA는 상이한 CH 도메인을 가질 수 있다. 불변 도메인은 선천적 서열 불변 도메인 (가령, 인간 선천적 서열 불변 도메인) 또는 이들의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 하나 또는 그 이상의 "효과기 기능"을 가질 수 있는데, 이들은 항체의 Fc 불변 영역(선천적 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 실례는 다음을 포함한다: C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(ADCC); 식균작용; 및 세포 표면 수용체의 하향조절. 불변 영역 변이체는 효과기 프로파일, Fc 수용체에 결합, 기타 등등을 변경하는 것들을 포함한다.

[0081] 중쇄의 Fc(불변 도메인)의 아미노산 서열에 따라, 항체 및 다양한 항원-결합 단백질은 상이한 부류로서 제공될 수 있다. 중쇄 Fc 영역의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 그리고 이들 중에서 몇몇은 "하위부류"(아이소타입), 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 더욱 세분될 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 Fc 불변 도메인은 각각, α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 면역글로불린의 상이한 부류의 이들 아단위 구조 및 3차원 형상은 널리 알려져 있다. Ig 형태는 힌지-변형 또는 힌지 없는 형태를 포함한다(Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). 임의의 척추동물 종으로부터 항체의 경쇄는 그들의 불변 도메인의 아미노산

서열에 근거하여, κ 와 λ 로 불리는 2가지 유형 중에서 한 가지에 배정될 수 있다.

- [0082] "기능적 Fc 영역"은 선천적 서열 Fc 영역의 "효과기 기능"을 소유한다. 예시적인 효과기 기능은 C1q 결합; CDC; Fc-수용체 결합; ADCC; ADPC; 세포 표면 수용체(가령, B-세포 수용체)의 하향조절 등을 포함한다. 이런 효과기 기능은 일반적으로, Fc 영역이 수용체, 예를 들면, Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB 수용체, 그리고 낮은 친화도 FcRn 수용체와 상호작용하는 것을 필요로 하고; 그리고 가령, 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 이용하여 사정될 수 있다. "죽은" Fc는 예로서, 혈청 반감기를 연장하는 것에 대한 활성을 유지하도록 돌연변이화되지만, 높은 친화도 Fc 수용체를 활성화시키지 못하는 것이다.
- [0083] "선천적 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 선천적-서열 인간 Fc 영역은, 예를 들어, 선천적-서열 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 동종이형); 선천적-서열 인간 IgG2 Fc 영역; 선천적-서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 선천적-서열 인간 IgG4 Fc 영역뿐만 아니라 이들의 자연발생 변이체를 포함한다.
- [0084] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(들)에 의해서 선천적 서열 Fc 영역의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 선천적 서열 Fc 영역 또는 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 비교하여 선천적 서열 Fc 영역 내에 또는 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역 내에 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들면, 약 1개 내지 약 10개 아미노산 치환, 그리고 바람직하게는 약 1개 내지 약 5개 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는, 선천적 서열 Fc 영역 및/또는 부모 폴리펩타이드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 그리고 가장 바람직하게는 그것과 적어도 약 90% 상동성, 더욱 바람직하게는 그것과 적어도 약 95% 상동성을 소유할 것이다.
- [0085] 변이체 Fc 서열은 EU 색인 위치 234, 235 및 237에서 Fc γ RI 결합을 감소시키기 위해 CH2 영역 내에 3개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다(Duncan et al., (1988) Nature 332:563을 참조한다). 보체 C1q 결합 부위 내에 EU 색인 위치 330 및 331에서 2개의 아미노산 치환은 보체 고정을 감소시킨다(Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993) 및 Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)을 참조한다). 위치 233-236에서 IgG2 잔기, 그리고 위치 327, 330 및 331에서 IgG4 잔기의 인간 IgG1 내로 치환은 ADCC 및 CDC를 크게 감소시킨다(가령, Armour KL. et al., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; 및 Shields RL. et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604를 참조한다). 이황화 결합을 형성할 수 있는 영역이 결실된 것, 또는 일정한 아미노산 잔기가 선천적 Fc 형태의 N 말단 단부에서 제거된 또는 메티오닌 잔기가 거기에 부가된 것을 제한 없이 포함하는 다른 Fc 변이체가 가능하다. 따라서, 본 발명의 한 구체예에서, scFc 분자의 하나 또는 그 이상의 Fc 부분은 이황화 결합을 제거하기 위해, 힌지 영역 내에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, Fc의 힌지 영역은 완전하게 제거될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 분자는 Fc 변이체를 포함할 수 있다.
- [0086] 게다가, Fc 변이체는 보체 결합 또는 Fc 수용체 결합을 야기하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 결실시키거나 또는 부가함으로써, 효과기 기능이 제거되거나 또는 실제적으로 감소되도록 작제될 수 있다. 가령, 그리고 제한 없이, 결실이 보체-결합 부위, 예를 들면, C1q-결합 부위에서 일어날 수 있다. 번역글로불린 Fc 단편의 이런 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제 특허 공개 번호 WO 97/34631 및 WO 96/32478에서 개시된다. 이에 더하여, Fc 도메인은 인산화, 황산화, 아실화, 글리코실화, 메틸화, 파르네실화, 아세틸화, 아미드화 등에 의해 변형될 수 있다.
- [0087] Fc는 선천적 당 사슬, 선천적 형태와 비교하여 증가된 당 사슬 또는 선천적 형태와 비교하여 감소된 당 사슬을 갖는 형태일 수 있거나, 또는 비글리코실화 또는 데글리코실화 형태일 수 있다. 당 사슬의 증가, 감소, 제거 또는 다른 변형은 당해 분야에서 통상적인 방법, 예를 들면, 화학적 방법, 효소적 방법에 의해, 또는 이것을 유전적으로 가공된 생산 세포주에서 발현함으로써 달성될 수 있다. 이런 세포주는 글리코실화 효소를 자연적으로 발현하는 미생물, 예를 들면, 피치아 파스토리스 (*Pichia Pastoris*), 그리고 포유류 세포주, 예를 들면, CHO 세포를 포함할 수 있다. 게다가, 미생물 또는 세포는 글리코실화 효소를 발현하도록 가공될 수 있거나, 또는 글리코실화 효소를 발현할 수 없도록 만들어질 수 있다(가령, Hamilton, et al., Science, 313:1441 (2006); Kanda, et al, J. Biotechnology, 130:300 (2007); Kitagawa, et al., J. Biol. Chem., 269 (27): 17872 (1994); Ujita-Lee et al., J. Biol. Chem., 264(23): 13848 (1989); Imai-Nishiya, et al, BMC Biotechnology 7:84(2007); 및 WO 07/055916을 참조한다). 변경된 시알화 활성을 갖도록 가공된 세포의 한 가지 실패로서, 알파-2,6-시알릴전달효소 1 유전자가 중국 햄스터 난소 세포 내로 및 sf9 세포 내로 가공되었다. 이들 가공된 세포에 의해 발현된 항체는 따라서, 외인성 유전자 산물에 의해 시알화된다. 복수의 선천적 분자와 비교하여 변경된 양의 당 잔기를 갖는 Fc 분자를 획득하기 위한 추가 방법은 예로서, 렉틴 친화도 크로마토그래피를 이용하여

상기 복수의 분자를 글리코실화된 및 비글리코실화된 분획물로 분리하는 것을 포함한다(가령, WO 07/117505를 참조한다). 특정 글리코실화 모이어티의 존재는 면역글로불린의 기능을 변경하는 것으로 밝혀졌다. 가령, Fc 분자로부터 당 사슬의 제거는 첫 번째 보체 성분 C1의 C1q 부분에 대한 결합 친화도에서 급격한 감소 및 항체의 존성 세포 매개된 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)에서 감소 또는 상실을 유발하고, 따라서 생체내에서 불필요한 면역 반응을 유도하지 않는다. 추가 중요한 변형은 시알화 및 푸코실화를 포함한다: IgG 내에 시알산의 존재는 항염증성 활성과 상관되었고 (가령, Kaneko, et al, Science 313:760 (2006)을 참조한다), 반면 IgG로부터 푸코스의 제거는 증강된 ADCC 활성을 야기한다(가령, Shoj-Hosaka, et al, J. Biochem., 140:777 (2006)을 참조한다).

[0088] 대안적 구체예에서, 본 발명의 항체는 예로서, Fc γ RIIIA에 대한 이들의 결합능을 증가시키고 ADCC 활성을 증가시키으로써, 증강된 효과기 기능을 갖는 Fc 서열을 가질 수 있다. 가령, Fc의 Asn-297에서 N-연결된 글리칸에 부착된 푸코스는 Fc의 Fc γ RIIIA와의 상호작용을 입체적으로 방해하고, 그리고 당가공에 의한 푸코스의 제거는 Fc γ RIIIA에 결합을 증가시킬 수 있는데, 이것은 야생형 IgG1 대조와 비교하여 50-배 초과로 높은 ADCC 활성으로 변환된다. IgG1의 Fc 부분에서 아미노산 돌연변이를 통한 단백질 가공은 Fc γ RIIIA에 Fc 결합의 친화도를 증가시키는 복수 변이체를 산출하였다. 특히, 삼중 알라닌 돌연변이체 S298A/E333A/K334A는 Fc γ RIIIA에 2-배 증가된 결합 및 ADCC 기능을 전시한다. S239D/I332E (2X) 및 S239D/I332E/A330L (3X) 변이체는 Fc γ RIIIA에 대한 결합 친화도에서 유의미한 증가, 그리고 시험관내 및 생체내에서 ADCC 능력의 증가를 갖는다. 효모 전시에 의해 확인된 다른 Fc 변이체 역시 생쥐 이중이식 모형에서 Fc γ RIIIA에 향상된 결합 및 증강된 종양 세포 죽음을 보여주었다. 가령, 본원에서 특정적으로 참조로서 편집되는 Liu et al. (2014) JBC 289(6):3571-90을 참조한다.

[0089] 용어 "Fc-영역-포함 항체"는 Fc 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. Fc 영역의 C 말단 리신(EU 넘버링 시스템에 따라 잔기 447)은 예로서, 항체의 정제 동안, 또는 항체를 인코딩하는 핵산을 재조합적으로 가공함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체는 K447이 있거나 또는 없는 항체를 포함할 수 있다.

[0090] "Fv"는 완전 항원-인식 및 항원-결합 부위를 내포하는 최소 항체 단편이다. 본 발명의 CD3 결합 항체는 단단한, 비공유 연관에서 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이합체를 포함한다; 하지만 예로서, 다중특이적 형상에서 이용을 위한 추가 항체는 VL 서열의 부재에서 VH를 포함할 수 있다. 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특정한 단지 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)도 비록 2개 도메인 결합 부위의 것보다 친화도가 낮을 수도 하지만, 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0091] Fab 단편은 또한, 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫 번째 불변 도메인 (CH1)을 내포한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 또는 그 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 소수 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서, 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 Fab' 단편의 쌍으로서 최초 생산되었는데, 이들은 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는다. 항체 단편의 다른 화학적 연계 역시 알려져 있다.

[0092] 단일 사슬 항체를 비롯한 비인간 (가령, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 내포하는 키메라 항체(단일 사슬 항체 포함)이다. 가령, Jones et al, (1986) Nature 321:522-525; Chothia et al (1989) Nature 342:877; Riechmann et al (1992) J. Mol. Biol. 224, 487-499; Foote and Winter, (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; Presta et al (1993) J. Immunol. 151, 2623-2632; Werther et al (1996) J. Immunol. Methods 157:4986-4995; 및 Presta et al (2001) Thromb. Haemost. 85:379-389를 참조한다. 추가 상세를 위해, 미국 특허 번호 5,225,539; 6,548,640; 6,982,321; 5,585,089; 5,693,761; 6,407,213; Jones et al (1986) Nature, 321:522-525; 및 Riechmann et al (1988) Nature 332:323-329를 참조한다.

[0093] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "단일 사슬 항체"는 항원의 에피토프에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항원 결합 도메인을 내포하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 의미하는데, 여기서 이런 도메인은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역으로부터 유래되거나 또는 이들 영역과 서열 동일성을 갖는다. 이런 가변 영역의 부분은 V_H 또는 V_L 유전자 분절, D 및 J_H 유전자 분절, 또는 J_L 유전자 분절에 의해 인코딩될 수 있다. 가변 영역은 재배열된 V_HDJ_H, V_LDJ_H, V_HJ_L, 또는 V_LJ_L 유전자 분절에 의해 인코딩될 수 있다. V-, D- 및 J-유전자 분절은 인간, 그리고 조류, 어류, 상어, 포유동물, 설치류, 비인간 영장류, 낙타, 라마, 토끼 등을 비롯한 다양한 동물로부터 유래될 수 있다.

- [0094] 본 발명의 CD3-결합 항체는 이중특이성 항체, 삼중기능성 항체 등을 제한 없이 포함하는 다중특이적 형상에서 특정한 유용성을 발견한다. 매우 다양한 방법 및 단백질 형상이 알려져 있고 이중특이성 단일클론 항체(BsMAB), 삼중특이적 항체 등에서 이용된다.
- [0095] 1-세대 BsMAB는 2개의 상이한 항체로부터 각각 하나씩 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성되었다. 이들 2개의 Fab 영역은 2개의 항원에 대해 지향된다. Fc 영역은 2개 중쇄로부터 구성되고, 그리고 면역 세포 상에서 Fc 수용체와 세 번째 결합 부위를 형성한다(가령, 문헌[Lindhofer et al., The Journal of Immunology, Vol 155, p 219-225, 1995]을 참조한다). 항체는 동일한 또는 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 가령, 쥐 및 생쥐 항체를 발현하는 세포주는 선호적 종-한정된 중쇄와 경쇄 대합으로 인해 기능적인 이중특이성 Ab를 분비한다. 다른 구체예에서 Fc 영역은 특정한 방식으로만 들어맞도록 설계된다.
- [0096] 다른 유형의 이중특이성 항체는 Fab 영역으로만 구성되는 화학적으로 연결된 Fab를 포함한다. 2개의 화학적으로 연결된 Fab 또는 Fab2 단편은 2개의 상이한 항원에 결합하는 인공 항체를 형성하고 이중특이성 항체의 한 가지 유형이 된다. 2개의 상이한 단일클론 항체의 항원 결합 단편(Fab 또는 Fab2)이 생산되고 티오에테르와 같은 화학적 수단에 의해 연결된다(Glennie, M J et al., Journal of immunology 139, p 2367-75, 1987; Peter Borchmann et al., Blood, Vol. 100, No. 9, p 3101-3107, 2002를 참조한다).
- [0097] 다가 인공 항체의 생산을 위한 다양한 다른 방법이 2개 항체의 가변 도메인을 재조합적으로 융합함으로써 개발되었다. 단일 사슬 가변 단편(scFv)은 10 내지 약 25개 아미노산의 짧은 링커 펩타이드로 연결된, 면역글로불린의 중쇄(VH)와 경쇄(VL)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 링커는 통상적으로, 유연성을 위한 글리신뿐만 아니라 용해도를 위한 세린 또는 트레오닌이 풍부하고, 그리고 VH의 N 말단을 VL의 C 말단과, 또는 그 반대로 연결할 수 있다. 이중특이성 단일 사슬 가변 단편(다이-scFv, 비-scFv)은 상이한 특이성을 갖는 2개의 scFv를 연결함으로써 가공될 수 있다. 2개 VH 및 2개 VL 영역을 갖는 단일 펩타이드 사슬이 생산되고, 이가 scFv가 산출된다.
- [0098] 이중특이성 탠덤 scFv는 이중특이성 T-세포 인계이저 (BiTE)로서 또한 알려져 있다. 이중특이성 scFv는 2개의 가변 영역이 함께 접히기에는 너무 짧아 (약 5개 아미노산), scFv가 이합체화하도록 강제하는 링커 펩타이드로 창출될 수 있다. 이러한 유형은 디아바디로서 알려져 있다(Adams et al., British journal of cancer 77, p 1405-12, 1998). 이중-친화도 재표적화(DART) 플랫폼 기술 (Macrogenics, Rockville, Md.). 이러한 융합 단백질 기술은 약 55 킬로달톤의 단일 펩타이드 사슬 상에서 상이한 항체의 2개 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 이용한다. SCORPION Therapeutics (Emergent Biosolutions, Inc., Seattle, Wash.)는 2개의 항원 결합 도메인을 단일 사슬 단백질 내에서 조합한다. 면역글로불린 Fc 영역에 근거하여, 하나의 결합 도메인은 C 말단 상에 있고, 그리고 두 번째 결합 도메인은 효과기 도메인의 N 말단 상에 있다.
- [0099] 사가 및 이중특이성 항체-유사 단백질은 또한, 2개의 단일클론 항체로부터 가공되는 DVD-Ig을 포함한다(Wu, C. et al., Nature Biotechnology, 25, p 1290-1297, 2007). DVD-Ig 분자를 작제하기 위해, 2개의 mAb의 V 도메인이 짧은 링커(TVAAP)에 의해, N 말단에서 첫 번째 항체 중쇄(VL)의 가변 도메인, 그 이후에 다른 항체 VL 및 Ck와 탠덤으로 융합되어 DVD-Ig 단백질 경쇄를 형성한다. 유사하게, 2개의 mAb의 중쇄(VH)의 가변 영역이 짧은 링커(ASTKGP)에 의해, N 말단에서 첫 번째 항체, 그 이후에 다른 항체 및 중쇄 불변 도메인과 탠덤으로 융합되어 DVD-Ig 단백질 중쇄(VH1/VL1)를 형성한다. 모든 경쇄와 중쇄 불변 도메인은 DVD-Ig 설계에서 보존되는데, 그 이유는 이들이 이화화 연결된 완전 IgG-유사 분자의 형성에 결정적이기 때문이다. DVD-Ig 경쇄와 중쇄를 인코딩하는 발현 벡터로 포유류 세포의 동시형질감염은 거의 200kDa의 분자량을 갖는 IgG-유사 분자의 단일 종의 분비를 야기한다. 이러한 분자는 여기에서 각 mAb로부터 2개씩 4개의 결합 부위를 갖는다.
- [0100] 용어 "이중특이성 3-사슬 항체 유사 분자" 또는 "TCA"는 3개의 폴리펩타이드 아단위를 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 또는 이들로 구성되는 항체-유사 분자를 지칭하기 위해 본원에서 이용되는데, 이들 아단위 중에서 2개는 단일클론 항체의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄, 또는 항원 결합 영역 및 적어도 하나의 CH 도메인을 포함하는, 이런 항체 사슬의 기능적 항원-결합 단편을 포함하거나, 이들로 본질적으로 구성되거나, 또는 이들로 구성된다. 이러한 중쇄/경쇄 쌍은 첫 번째 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다. 세 번째 폴리펩타이드 아단위는 CH1 도메인의 부재에서 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부분, 그리고 두 번째 항원의 에피토프 또는 첫 번째 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄 단독 항체를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 구성되거나, 또는 이것으로 구성되고, 여기서 이런 결합 도메인은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역으로부터 유래되거나 또는 상기 영역과 서열 동일성을 갖는다. 이런 가변 영역의 부분은 V_H 및/또는 V_L 유전자 분절, D 및 J_H 유전자 분절, 또는 J_L 유전자 분절에 의해 인코딩될 수 있다. 가변 영역은 재배

열린 V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , 또는 V_LJ_L 유전자 분절에 의해 인코딩될 수 있다.

[0101] TCA 단백질은 중쇄 단독 항체" 또는 "중쇄 항체" 또는 "중쇄 폴리펩타이드"를 이용하는데, 이것은 본원에서 이용된 바와 같이, CH1 도메인 없이 중쇄 불변 영역 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4를 포함하는 단일 사슬 항체를 의미한다. 한 구체예에서, 중쇄 항체는 항원 결합 도메인, 힌지 영역 중에서 적어도 일부, 그리고 CH2 및 CH3 도메인으로 구성된다. 다른 구체예에서, 중쇄 항체는 항원 결합 도메인, 힌지 영역 중에서 적어도 일부, 그리고 CH2 도메인으로 구성된다. 추가 구체예에서, 중쇄 항체는 항원 결합 도메인, 힌지 영역 중에서 적어도 일부, 그리고 CH3 도메인으로 구성된다. CH2 및/또는 CH3 도메인이 절두되는 중쇄 항체 역시 본원에서 포함된다. 추가 구체예에서 중쇄는 힌지 영역 없이, 항원 결합 도메인, 그리고 적어도 하나의 CH(CH1, CH2, CH3 또는 CH4) 도메인으로 구성된다. 중쇄 단독 항체는 이합체의 형태일 수 있는데, 여기서 2개의 중쇄는 이황화 결합되거나 만약 그렇지 않으면, 서로 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다. 중쇄 항체는 IgG 하위부류에 속할 수 있지만, 다른 하위부류, 예를 들면, IgM, IgA, IgD 및 IgE 하위부류에 속하는 항체 역시 본원에서 포함된다. 특정한 구체예에서, 중쇄 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아형, 특히 IgG1 아형이다.

[0102] 중쇄 항체는 낙타과, 예를 들면, 낙타 및 라마에 의해 생산되는 IgG 항체의 약 4분의 1을 구성한다(Hamers-Casterman C., et al. Nature. 363, 446-448 (1993)). 이들 항체는 2개 중쇄에 의해 형성되고 경쇄를 결합한다. 결과로서, 가변적 항원 결합 부분은 VHH 도메인으로서 지칭되고, 그리고 이것은 길이가 단지 대략 120개 아미노산인 가장 작은 자연발생, 무손상, 항원 결합 부위를 나타낸다(Desmyter, A., et al. J. Biol. Chem. 276, 26285-26290 (2001)). 높은 특이성 및 친화도를 갖는 중쇄 항체는 면역화를 통해 다양한 항원에 대하여 산출될 수 있고 (van der Linden, R. H., et al. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999)), 그리고 VHH 부분은 쉽게 클로닝되고 효모에서 발현될 수 있다(Frenken, L. G. J., et al. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000)). 이들의 발현 수준, 용해도 및 안정성은 고전적 F(ab) 또는 Fv 단편의 것들보다 훨씬 높다(Ghahroudi, M. A. et al. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997)). 상어 역시, VNAR로 명명된 그들의 항체에서 단일 VH-유사 도메인을 갖는 것으로 밝혀졌다. (Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554(2003); Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004); Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)).

[0103] 관심되는 항원에 "결합하는", 본원에서 중쇄 단독 항체 및 이중특이성 3-사슬 항체-유사 분자(TCA)를 비롯한 항체 또는 항원 결합 분자는 이러한 항체 또는 결합 분자가 항원을 표적으로 하는데 있어서 진단적 및/또는 치료적 작용체로서 유용하고, 그리고 다른 단백질과 유의미하게 교차 반응하지 않을 만큼 충분한 친화도로 항원에 결합하는 것이다. 이런 구체예에서, 비표적화된 항원에 항체 또는 다른 결합 분자의 결합의 정도는 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 분석 또는 방사면역침강(RIA)에 의해 결정될 때, 10% 이내일 것이다.

[0104] 단백질

[0105] 본 발명은 CD3에 결합하고 이를 통해 신호전달을 활성화시키는, 예를 들면, CD3⁺ T 세포를 활성화시키는 밀접하게 관련된 항체의 패밀리를 제공한다. 상기 패밀리 내에 항체는 본원에서 규정된 바와 같은 한 세트의 CDR 서열을 포함하고, 그리고 서열 번호 1 내지 18의 제공된 VH 서열에 의해 예시된다. 항체의 패밀리는 임상적으로 치료적 작용체(들)로서 유용성에 기여하는 다수의 유익성을 제공한다. 상기 패밀리 내에 항체는 다양한 결합 친화도를 갖는 구성원을 포함하고, 원하는 친화도를 갖는 특정한 서열의 선별을 허용한다. 친화도를 미세 조정하는 능력은 치료되는 개체에서 CD3 활성화의 수준을 관리하고, 그리고 따라서, 독성을 감소시키는데 특히 중요하다. 가령, 만약 낮은 존재비 중앙 항원(세포당 10,000개 분자 이하)이 표적화되면, 높은 친화도 CD3 결합체(<30nM)가 바람직한 것으로 예상된다. 만약 높은 존재비 중앙 항원(세포당 50,000개 분자 이상)이 표적화되면, 낮은 친화도(>50nM)를 갖는 CD3 결합체가 바람직하다. T 세포에 결합될 때, 사이토카인의 방출, 예를 들어, IL-2, IFN γ 등의 방출을 유도하는 항체의 경향이 친화도와 별개로 평가될 수 있으며, 여기서 감소된 사이토카인 방출이 바람직할 수 있다.

[0106] 적합한 항체는 제한 없이, 이중특이성 항체로서 이용을 비롯하여, 개발 및 이용을 위해 본 명세서에 제공된 것으로부터 선택될 수 있다. 후보 단백질에 대한 친화도의 결정은 당해 분야에서 공지된 방법, 예를 들면, Biacore 계측 등을 이용하여 수행될 수 있다. 항체 패밀리의 구성원은 제한 없이, 대략 10^{-6} 내지 대략 10^{-10} ; 대략 10^{-6} 내지 대략 10^{-9} ; 대략 10^{-6} 내지 대략 10^{-8} ; 대략 10^{-8} 내지 대략 10^{-11} ; 대략 10^{-8} 내지 대략 10^{-10} ; 대략 10^{-8} 내지 대략 10^{-9} ; 대략 10^{-9} 내지 대략 10^{-11} ; 대략 10^{-9} 내지 대략 10^{-10} ; 또는 이들 범위 내에 임의의 값을 포함하는 약 10^{-6} 내지 대략 10^{-11} 의 Kd로 CD3에 대한 친화도를 가질 수 있다. 친화도 선별은 예로서, 시험관내 또

는 전임상 모형에서 T 세포의 활성화에 대한 생물학적 사정 및 잠재적 독성의 사정으로 확증될 수 있다. 사이토카인 방출의 결정은 실시예에 기재하는 분석을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 편리한 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0107] MH-펩타이드 복합체 또는 항-TCR/CD3 항체에 결합함으로써 T 세포 수용체(TCR)의 포용은 T 세포 활성화를 개시한다. T 세포를 활성화시키는 항-TCR/CD3 항체의 실례는 OKT3 및 UCHT1이다. 이들 항-CD3 항체는 T 세포 상에서 CD3에 결합에 대해 교차경쟁하고, 그리고 T 세포 활성화 검정에서 일과적으로 이용된다. 본 발명의 항-CD3 항체는 인간 CD3에 결합에 대해 OKT3과 교차경쟁한다. CD3 및 CD3 상에서 에피토프에 대한 결합 친화도에 따라, 항-CD3 항체는 상이한 기능적 결과를 갖는 T 세포를 활성화시켰다. 낮은 친화도 항-CD3 항체와 함께 인간 T 세포의 시험관내 배양은 T 세포의 불완전 활성화, 낮은 IL-2 및 IL-10 생산을 유발하였다. 대조적으로, 높은 친화도 CD3 결합체는 T 세포를 활성화시켜 훨씬 많은 IL-2 및 다른 사이토카인을 생산하였다. 낮은 친화도 항-CD3 항체는 일부 효과기 기능, 강력한 종양 사멸 및 CD69 상향조절을 선별적으로 유도하지만, 다른 것들, 예를 들면, IL-2 및 IL-10 생산을 유도하지 못하는 부분 효현제인 것으로 고려된다. 본 발명의 높은 친화도 결합체는 T 세포의 많은 면역 효과기 기능을 활성화시키는 완전 효현제이다. CD3 및 인식된 에피토프와의 상호작용의 강도는 T 세포의 정성적으로 상이한 활성화를 유발하였다. 낮은 친화도 항-CD3 항체에 의해 활성화된 T 세포의 최대 사이토카인 생산은 높은 친화도 항-CD3 항체에 의한 최대 활성화보다 낮았다. 일부 구체예에서, 본 발명의 항체는 동일한 검정에서 기준 항-CD3 항체와 비교하여, 활성화 검정에서 T 세포와 조합될 때 IL-2 및 IL-10 중에서 어느 하나 또는 둘 모두의 더욱 낮은 방출을 유발하는데, 여기서 참고 항체는 ID 304703(서열번호 22) 또는 동등한 친화도의 항체일 수 있다. IL-2 및/또는 IL-10의 최대 방출은 참고 항체에 의한 방출의 약 75%보다 적고, 참고 항체에 의한 방출의 약 50%보다 적고, 참고 항체에 의한 방출의 약 25%보다 적고, 그리고 참고 항체에 의한 방출의 약 10%보다 적을 수 있다.

[0108] 본 발명의 일부 구체예에서, 이중특이성 또는 다중특이적 항체가 제공되는데, 이들은 3개 사슬 이중특이체를 제한 없이 포함하는, 본원에서 논의된 형상 중에서 어느 것을 가질 수 있다. 이중특이성 항체는 적어도, CD3 이외의 단백질에 특이적인 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 그리고 중쇄와 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 이런 구체예에서, 두 번째 항체 특이성은 종양 연관된 항원, 표적화 항원, 예를 들면, 인테그린 등, 병원체 항원, 체크포인트 단백질, 기타 등등에 결합한다. 단일 사슬 폴리펩타이드, 2개 사슬 폴리펩타이드, 3개 사슬 폴리펩타이드, 4개 사슬 폴리펩타이드, 그리고 이들의 복합을 제한 없이 포함하는 다양한 형식의 이중특이성 항체가 본 발명의 범위 안에 있다.

[0109] CD3 특이적 항체의 패밀리는 인간 VH 프레임워크에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. CDR 서열은 실례로서, CDR1, CDR2 및 CDR3 각각에 대해, 서열 번호 1-18에 제시된 제공된 예시적인 가변 영역 서열의 아미노산 잔기 26-33; 51-58; 및 97-112 주변의 영역 내에 위치될 수 있다. 비록 일반적으로 서열의 순서가 동일하게 남아있을 것이지만, 만약 상이한 프레임워크 서열이 선별되면, 이들 CDR 서열은 상이한 위치에 있을 수 있는 것으로 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0110] 패밀리 2 항체에 대한 CDR 서열은 다음의 서열식을 가질 수 있다. X는 가변적 아미노산을 지시하는데, 이것은 아래에 표시된 바와 같은 특정한 아미노산일 수 있다.

[0111] CDR1

[0112] $G_1F_2T_3F_4X_5X_6Y_7A_8$

[0113] 식 중,

[0114] X_5 는 임의의 아미노산일 수 있고; 일부 실시형태에서, X_5 는 D, A 또는 H이며; 일부 실시형태에서 X_5 는 D이다.

[0115] X_6 는 임의의 아미노산일 수 있고; 일부 실시형태에서 X_6 은 D 또는 N이며; 일부 실시형태에서 D_6 은 D이다.

[0116] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR1 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18, 잔기 26 내지 33에 제시된 서열을 포함한다.

[0117] CDR2

[0118] $I_1S_2W_3N_4S_5G_6S_7I_8$

[0119] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR2 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18에 제시된 서열, 잔기 51

내지 58을 포함한다.

- [0120] CDR3
- [0121] A₁" K₂" D₃" S₄" R₅" G₆" Y₇" G₈" X₉" Y₁₀" X₁₁" X₁₂" G₁₃" G₁₂" A₁₅" Y₁₆"
- [0122] 식 중,
- [0123] X₉"는 임의의 아미노산일 수 있고, 일부 실시형태에서, X₉"는 D 또는 S이며; 일부 실시형태에서, X₉"는 D이고;
- [0124] X₁₁"은 임의의 아미노산일 수 있으며, 일부 실시형태에서 X₁₁"은 R 또는 S이고;
- [0125] X₁₂"는 임의의 아미노산일 수 있으며, 일부 실시형태에서 X₁₂"는 L 또는 R이다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CD3 서열은 식 A K D S R G Y G D Y X₁₁" X₁₂" G G A Y를 갖되, 여기서 X₁₁" 및 X₁₂"는 상기 정의한 바와 같다. 일부 실시형태에서, 패밀리 2 항-CD3 항체의 CDR3 서열은 임의의 서열번호 1 내지 18에 제시된 서열, 잔기 97 내지 112를 포함한다.
- [0127] 일부 구체예에서 CD3-결합 VH 도메인은 경쇄 가변 영역 도메인과 대합된다. 일부 이런 구체예에서 경쇄는 고정된 경쇄이다. 일부 구체예에서 경쇄는 인간 VL 프레임워크에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 갖는 VL 도메인을 포함한다. CDR 서열은 서열 번호 19의 것들일 수 있다. 일부 구체예에서, CDR1 서열은 CDR1, CDR2, CDR3 각각에 대해 아미노산 잔기 27-32; 50-52; 89-97을 포함한다.
- [0128] 일부 구체예에서 패밀리 2 항체의 CDR 서열은 서열 번호 1 내지 18 중에서 한 가지에서 CDR 서열 또는 CDR 서열의 세트에 대해 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 가진다. 일부 구체예에서 본 발명의 CDR 서열은 서열 번호 1-18 중에서 한 가지에서 CDR 서열 또는 CDR 서열의 세트에 대해 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예에서 상기 아미노산 치환(들)은 앞서 제공된 서열식에 비해, CDR1의 위치 5 또는 10, CDR2의 위치 2, 6 또는 7, CDR3의 위치 1, 8, 9 또는 10 중에서 하나 또는 그 이상이다.
- [0129] 본 발명의 단백질이 이중특이성 항체인 경우에, 하나의 결합 모이어티, 다시 말하면, VH/VL 조합 또는 VH 단독은 인간 CD3에 대해 특이적이고, 반면 다른 아암은 암 세포, 예를 들면, 난소, 유방, 위장관, 뇌, 두경부, 전립선, 결장, 폐 암 등의 세포뿐만 아니라 혈액학적 종양, 예를 들면, 백혈병을 비롯한 B-세포 종양, 림프종, 육종, 암종, 신경 세포 종양, 편평상피 세포 암종, 생식 세포 종양, 전이, 미분화된 종양, 정상피종, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 혼합된 세포 종양, 감염체에 의해 유발된 신생물, 그리고 다른 악성종양, 병원체로 감염된 세포, 염증 및/또는 자가면역을 유발하는 자가반응성 세포를 비롯한 표적 세포에 대해 특이적일 수 있다. 비-CD3 모이어티는 또한, 본원에서 설명된 바와 같이, 면역 조절 단백질에 대해 특이적일 수 있다.
- [0130] 종양-연관된 항원(TAA)은 종양 세포에 상대적으로 한정되고, 반면 종양 특이적 항원(TSA)은 종양 세포에 독특하다. TSA 및 TAA는 전형적으로, 주요 조직적합성 복합체의 일부로서 세포 표면 상에서 발현된 세포내 분자의 일부이다.
- [0131] 조직 특이적 분화 항원은 종양 세포 및 이들의 정상적인 세포 대응물 상에 존재하는 분자이다. 치료적 mAb에 의해 인식되는 것으로 알려진 종양-연관된 항원은 여러 상이한 범주에 속한다. 조혈 분화 항원은 분화 클러스터(CD) 군화와 통상적으로 연관되고 CD20, CD30, CD33 및 CD52를 포함하는 당단백질이다. 세포 표면 분화 항원은 정상적인 세포 및 종양 세포 둘 모두의 표면에서 발견되는 당단백질 및 탄수화물의 다양한 군이다. 성장 및 분화 신호전달에 관련되는 항원은 종종, 성장 인자 및 성장 인자 수용체이다. 암 환자에서 항체에 대한 표적인 성장 인자는 CEA, 표피 성장 인자 수용체(EGFR; ERBB1로서 또한 알려져 있음), ERBB2(HER2로서 또한 알려져 있음), ERBB3, MET (HGFR로서 또한 알려져 있음), 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체(IGF1R), 에프린 수용체 A3(EPHA3), 종양 괴사 인자(TNF)-관련된 아포토시스-유도 리간드 수용체 1 (TRAILR1; TNFRSF10A로서 또한 알려져 있음), TRAILR2 (TNFRSF10B로서 또한 알려져 있음) 및 핵 인자-κB 리간드의 수용체 활성화인자(RANKL; TNFSF11로서 또한 알려져 있음)를 포함한다. 혈관형성에 관련된 항원은 통상적으로, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), VEGF 수용체(VEGFR), 인테그린 αVβ3 및 인테그린 α5β1을 비롯하여, 새로운 미세혈관계의 형성을 뒷받침하는 단백질 또는 성장 인자이다. 종양 간질 및 세포의 기질은 종양에 대한 필수적인 지지 구조물이다. 치료 표적인 간질 및 세포의 기질 항원은 섬유모세포 활성화 단백질 (FAP) 및 테나신을 포함한다.
- [0132] 이중특이성 형상에서 유용한 치료 항체의 실례는 제한 없이, 리톡시맙; 이브리투모맙; 티옥세탄; 토시투모맙;

브렌톡시맙; 베도틴; 겐투주맙; 오조가미신; 알렘투주맙; IGN101; 아데카투무맙; 라베투주맙; huA33; 켈투모맙; 오레고보맙; CC49(민레투모맙); cG250; J591; MOv18; MORAb-003(파클레투주맙); 3F8, ch14.18; KW-2871; hu3S193; IgN311; 베바시주맙; IM-2C6; CDP791; 에타라시주맙; 볼로식시맙; 세톡시맙, 파니투무맙, 니모투주맙; 806; 트라스투주맙; 페르투주맙; MM-121; AMG 102, METMAB; SCH 900105; AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507; CP 751871; KB004; I11A4; 마파투무맙(HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; 테노수맙; 시브로투주맙; F19; 및 81C6 을 포함한다.

- [0133] 임상적 암 면역요법의 맥락에서 가장 활발하게 연구된 면역-체크포인트 수용체, 세포독성 T-림프구-연관된 항원 4(CTLA4; CD152로서 또한 알려져 있음) 및 예정된 세포 사멸 단백질 1(PD1; CD279로서 또한 알려져 있음) -는 둘 모두 저해성 수용체이다. 이들 수용체 중에서 어느 하나를 차단하는 항체의 임상적 활성화는 항종양 면역성이 복수 수준에서 증강될 수 있고, 그리고 조합 전략이 지능적으로 설계되고 기계적인 고려 사항 및 전임상 모형에 의해 보도될 수 있다는 것을 암시한다.
- [0134] PD1에 대한 2개의 리간드는 PD1 리간드 1 (PDL1; B7-H1 및 CD274로서 또한 알려져 있음) 및 PDL2(B7-DC 및 CD273으로서 또한 알려져 있음)이다. PDL1은 암 세포에서 발현되고, 그리고 T 세포 상에서 수용체 PD1에 결합을 통해, 이것은 T 세포 활성화/기능을 저해한다.
- [0135] 림프구 활성화 유전자 3(LAG3; CD223으로서 또한 알려져 있음), 2B4(CD244로서 또한 알려져 있음), B 및 T 림프구 감약물 (BTLA; CD272로서 또한 알려져 있음), T 세포 막 단백질 3(TIM3; HAVcr2로서 또한 알려져 있음), 아데노신 A2a 수용체(A2aR) 및 킬러 저해성 수용체의 패밀리는 각각, 림프구 활성화의 저해 및 일부 경우에, 림프구 아네르기의 유도과 연관된다. 이들 수용체의 항체 표적화가 본 발명의 방법에서 이용될 수 있다.
- [0136] 면역 동시자극성 분자를 효현작용하는 작용제 역시 본 발명의 방법에서 유용하다. 이런 작용제는 효현제 또는 CD40 및 OX40을 포함한다. CD40은 항원 제시 세포(APC)에서 발견되는 동시자극성 단백질이고 이들의 활성화에 필요하다. 이들 APC는 식세포(대식세포 및 수지상 세포) 및 B 세포를 포함한다. CD40은 TNF 수용체 패밀리의 일부이다. CD40에 대한 일차 활성화 신호전달 분자는 IFN γ 및 CD40 리간드 (CD40L)이다. CD40을 통한 자극은 대식세포를 활성화시킨다.
- [0137] 관심되는 항 CCR4(CD194) 항체는 잠재적인 항염증성 및 항신생물 활성을 갖는, C-C 케모킨 수용체 4(CCR4)를 향해 지향된 인간화 단일클론 항체를 포함한다. CCR2는 다양한 염증성 병태, 예를 들면, 류마티스성 관절염에서 발견될 수 있는 염증성 대식세포에서 발현되고; 그리고 또한, 중앙 증진 대식세포에서 발현되는 것으로 확인되었다. CCR2는 또한, 조절 T 세포에서 발현되고, 그리고 CCR2 리간드, CCL2는 중앙 내로 조절 T 세포의 충원을 매개한다. 조절 T 세포는 항종양 T 세포에 대한 반응을 억제하고, 그리고 따라서, 이들의 저해 또는 고갈이 요망된다.
- [0138] 본 발명의 단백질 생산
- [0139] 비록 항체가 화학적 합성에 의해 제조될 수 있긴 하지만, 이들은 전형적으로, 재조합 DNA 기술의 방법, 예를 들면, 단일 재조합 숙주 세포에서 단백질을 구성하는 모든 사슬의 공동발현, 또는 중쇄 폴리펩타이드 및 항체, 예를 들면, 인간 항체의 공동발현에 의해 생산된다. 이에 더하여, 항체 중쇄와 경쇄는 또한, 단일 폴리시스트론성 발현 벡터를 이용하여 발현될 수 있다. 개별 폴리펩타이드의 정제는 표준 단백질 정제 기술, 예를 들면, 친화도 (단백질 A) 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용하여 달성된다. 이중특이체는 표준 절차를 이용하여 정제가 수행될 수 있을 만큼, 크기 및 소수성에서 충분히 상이하다.
- [0140] 단일 숙주 세포에서 생산되는 항체 및 중쇄 폴리펩타이드의 양은 예로서, 자가-상보성 상호작용을 도입함으로써, 동종이합체화가 이형이합체화보다 선호되도록 항체 및 중쇄의 불변 영역의 가공을 통해 최소화될 수 있다(가령, 가능성에 대해 WO 98/50431을 참조한다, 예를 들면 "공동 내로의 융기(protuberance-into-cavity)" 전략 (WO 96/27011을 참조한다)). 이런 이유로, 본 발명의 다른 양상은 재조합 숙주에서 이중특이체를 생산하기 위한 방법을 제공하는 것인데, 상기 방법은 적어도 2개의 중쇄 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 재조합 숙주 세포에서 발현하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 중쇄 폴리펩타이드는 동종이합체 형성을 감소시키거나 또는 예방하지만 이중특이체 형성을 증가시킬 만큼 충분히 그들의 불변 영역에서 서로 다르다.
- [0141] 단백질이 3개 사슬, 예를 들면, FlicAb를 포함하는 경우에, 이들은 단일 재조합 숙주 세포에서 상기 분자를 구성하는 3개의 사슬(2개의 중쇄 및 1개의 경쇄)의 공동발현에 의해 생산될 수 있다.
- [0142] 본원에서 단백질의 재조합 생산을 위해, 모든 사슬, 예를 들면, 2, 3, 4 등을 인코딩하는 하나 또는 그 이상의

핵산이 단리되고, 그리고 추가 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터 내로 삽입된다. 많은 벡터가 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로, 다음 중에서 하나 또는 그 이상을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 또는 그 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 그리고 전사 종결 서열.

[0143] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법에 따른 숙주 세포는 상기 숙주 세포에서 단일 사슬을 인코딩하는 핵산 분자의 증폭에 대한 필요 없이 인간 면역글로불린의 높은-수준 발현, 다시 말하면, 적어도 1 pg/세포/일, 바람직하게는 적어도 10 pg/세포/일, 이보다 더욱 바람직하게는 적어도 20 pg/세포/일 또는 그 이상의 발현을 할 수 있다.

[0144] 약제학적 조성물

[0145] 본 발명의 다른 양상은 적합한 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합으로 본 발명의 하나 또는 그 이상의 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 본원에서 이용된 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체는 예로서, 어쥘런트, 고체 담체, 물, 완충액, 또는 치료적 성분을 유지하기 위해 당해 분야에서 이용되는 다른 담체, 또는 이들의 조합이지만 이들에 한정되지 않는다.

[0146] 본 발명에 따라서 이용되는 단백질의 치료적 제제는 예로서, 동결건조된 제제 또는 수성 용액의 형태에서, 원하는 정도의 순도를 갖는 단백질을 약제학적으로 허용되는 임의선택적 담체, 부형제 또는 안정제(가령, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)를 참조한다)와 혼합함으로써 저장용으로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제는 이용된 용량 및 농도에서 수용자에 비독성이고, 그리고 완충액, 예를 들면, 인산염, 구연산염 및 다른 유기 산; 아스코르빈산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제(가령, 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 핵사메토늄 염화물; 벤잘코늄 염화물, 벤제토늄 염화물; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개보다 적은 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 그리고 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예를 들면, EDTA; 당, 예를 들면, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들면, 나트륨; 금속 착물(가령, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0147] 항-CD3 항체 제제는 가령, 미국 특허 공개 번호 20070065437에서 개시되는데, 이의 전체 공개는 본원에서 명시적으로 참조로서 편입된다. 유사한 제제가 본 발명의 단백질에 이용될 수 있다. 이런 제제의 주요 성분은 3.0 내지 6.2의 범위에서 효과적인 pH 완충제, 염, 계면활성제, 그리고 항-CD3 특이성을 갖는 이중특이체의 효과량이다.

[0148] 이용 방법

[0149] 표적화된 세포를 본 발명의 항원 결합 조성물, 특히 여기서 상기 항원 결합 조성물은 치료되는 질환에 적합한 다중특이적 항체이고, 가령 여기서 하나의 결합 모이어티는 유관한 암 세포의 치료를 위해 종양 연관된 항원에 특이적으로 결합하고; 유관한 감염의 치료를 위한 관심되는 병원체에 대해 특이적인 결합 모이어티, 기타 등등과 접촉시키는 것을 포함하는 섭생에서, 감염, 자가면역 질환, 원발성 또는 전이성 암 등을 제한 없이 포함하는 질환을 치료하거나 또는 감소시키기 위한 방법이 제공된다. 이런 방법은 시약의 화학요법 약물, 방사선요법 또는 수술과의 조합을 제한 없이 포함하는 본 발명의 작용제의 치료 효과량 또는 효과 용량을 치료가 필요한 개체에 투여하는 것을 포함한다.

[0150] 질환의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여된 다른 약제, 그리고 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부를 비롯한 많은 상이한 인자에 따라 변한다. 통상적으로, 환자는 인간이지만, 비인간 포유동물, 예를 들면, 반려 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 말 등, 실험실 포유동물, 예를 들면, 토끼, 생쥐, 쥐 등, 기타 등등 역시 치료될 수 있다. 치료 용량은 안전성 및 효력을 최적화하도록 적정될 수 있다.

[0151] 용량 수준은 통상적으로 숙련된 임상가에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 그리고 필요에 따라, 예를 들면, 요법에 대한 개체의 반응을 변화시키기 위해 필요에 따라 변경될 수 있다. 단일 약형을 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 호스트 및 특정 투여 방식에 따라 변한다. 단위 약형은 일반적으로, 약 1mg 내지 약 500mg 사이의 활성 성분을 내포한다.

[0152] 일부 구체예에서, 작용제의 치료적 용량은 호스트 체중의 약 0.0001 내지 100mg/kg, 더욱 통상적으로 0.01 내지

5mg/kg의 범위에서 변할 수 있다. 가령, 용량은 1mg/kg 체중 또는 10mg/kg 체중이거나 또는 1-10mg/kg의 범위 내에 있을 수 있다. 예시적인 치료 섭생은 2 주마다 1회 또는 월 1회 또는 3 내지 6 개월마다 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 치료적 실체는 통상적으로, 여러 번에 걸쳐 투여된다. 단일 용량 사이에 간격은 주 1회, 월 1회 또는 연 1회일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 치료적 실체의 혈액 수준을 예측함으로써 표시된 바와 같이 불규칙할 수 있다. 대안으로, 본 발명의 치료적 실체는 지속된 방출 제제로서 투여될 수 있는데, 이러한 사례에서는 덜 빈번한 투여가 필요하다. 용량 및 빈도는 환자에서 폴리펩타이드의 반감기에 따라 변한다.

[0153] 예방적 적용에서, 상대적으로 저용량이 긴 기간에 걸쳐 상대적으로 드문 간격에서 투여될 수 있다. 일부 환자는 그들의 여생 동안 치료를 계속 제공받는다. 다른 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 또는 종결될 때까지, 그리고 바람직하게는, 환자가 질환의 증상의 부분적인 또는 완전한 개선을 보여줄 때까지, 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 고용량이 때때로 필요하다. 그 후에, 환자는 예방적 섭생으로 투여될 수 있다.

[0154] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 암종, 혈액학적 암, 예를 들면, 백혈병 및 림프종, 흑색종, 육종, 신경교종 등을 비롯한 암의 종양 성장, 종양 전이 또는 종양 침습을 치료하거나, 감소시키거나 또는 예방하는 것을 포함한다. 방지적 적용을 위해, 약제학적 조성물 또는 약제는 질환, 이의 합병증 및 질환의 발달 동안 나타나는 중간 병리학적 표현형의 생화학적, 조직학적 및/또는 거동적 증상을 비롯하여, 질환의 위험을 제거하거나 또는 감소시키거나, 질환의 심각도를 줄이거나, 또는 질환의 작수를 지연시키는데 충분한 양으로, 질환에 감수성인 또는 만약 그렇지 않으면, 질환의 위험에 처해 있는 환자에게 투여된다.

[0155] 질환의 치료를 위한 조성물은 비경구, 국소, 정맥내, 종양내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 복막내, 비내 또는 근육내 수단에 의해 투여될 수 있다. 비록 다른 루트가 동등하게 효과적일 수 있긴 하지만, 전형적인 투여 루트는 정맥내 또는 종양내이다.

[0156] 전형적으로, 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사가능 조성물로서 제조된다; 주사에 앞서 액체 운반제에서 용해 또는 현탁에 적합한 고체 형태 역시 제조될 수 있다. 제조물은 또한, 앞서 논의된 바와 같이, 증강된 어췌먼트 효과를 위해 리포솜 또는 마이크로 입자, 예를 들면, 폴리락티드, 폴리글리콜리드 또는 공중합체에서 유화되거나 또는 캡슐화될 수 있다. 문헌[Langer, Science 249: 1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997]. 본 발명의 작용제는 활성 성분의 지속된 또는 박동성 방출을 허용하는 방식으로 조절될 수 있는 저장소 주사 또는 이식 제조물의 형태에서 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 무균이고, 실제적으로 등장성이고, 그리고 미국 식품의약국의 모든 의약품 제조 품질 관리 기준 (GMP) 규정을 완전히 준수하도록 조절된다.

[0157] 본원에서 설명된 단백질의 독성은 예로서, LD₅₀(개체군의 50%에 치명적인 용량) 또는 LD₁₀₀(개체군의 100%에 치명적인 용량)을 결정함으로써, 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료적 효과 사이에 용량 비율은 치료 지수이다. 이들 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에서 이용 시에 독성이 아닌 용량 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다. 본원에서 설명된 단백질의 용량은 바람직하게는, 독성이 거의 또는 전혀 없이 유효 용량을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 용량은 이용된 약형 및 활용된 투여 루트에 따라, 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 정확한 제제, 투여 루트 및 용량은 환자의 상태에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다.

[0158] 약제학적 조성물은 투여 방법에 따라 다양한 단위 약형에서 투여될 수 있다. 가령, 경구 투여에 적합한 단위 약형은 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 로젠지를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물은 경구 투여될 때, 소화로부터 보호되어야 하는 것으로 인식된다. 이것은 전형적으로, 분자를 조성물과 복합화하여 이들이 산성 및 효소적 가수분해에 저항하도록 만듦으로써, 또는 분자를 적절하게 내성인 담체, 예를 들면, 리포솜 또는 보호 장벽에서 포장함으로써 달성된다. 작용제를 소화로부터 보호하는 수단은 당해 분야에서 널리 공지된다.

[0159] 투여용 조성물은 통상적으로, 약제학적으로 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에서 용해되는 항체 또는 다른 절제 작용제를 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들면, 완충된 식염수 등이 이용될 수 있다. 이들 용액은 무균이고, 그리고 일반적으로, 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 전통적인, 널리 공지된 살균 기술에 의해 살균될 수 있다. 조성물은 생리학적 상태에 근접하기 위해 필요에 따라 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들면, pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제 등, 예를 들면, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 유산나트륨 등을 내포할 수 있다. 이들 제제에서 활성제의 농도는 폭넓게 변할 수 있고, 그리고 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 요구에 따라서, 유체 용적, 점성, 체중 등에 일차적으로 기초하여 선별될 것이다(가령, 문헌[Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) 및 Goodman & Gillman, The

Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)]).

- [0160] 본 발명의 활성제 및 이들의 제제, 그리고 사용설명서를 포함하는 키트 역시 발명의 범위 내에 있다. 키트는 적어도 하나의 추가 시약, 예를 들면, 화학요법 약물 등을 더욱 내포할 수 있다. 키트는 전형적으로, 키트의 내용물의 의도된 용도를 지시하는 표지를 포함한다. 용어 표지는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 또는 만약 그렇지 않으면, 키트에 동반되는 임의의 서면 또는 기록된 자료를 포함한다.
- [0161] 조성물은 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다. 조성물은 전술된 바와 같이, 표적화된 세포를 실제적으로 제거하는데 충분한 양으로 환자에게 투여된다. 이것을 달성하는데 적합한 양은 "치료적으로 유효 용량"으로서 규정되는데, 이것은 전체 생존율에서 향상을 제공할 수 있다. 조성물의 단일 또는 복수 투여는 필요에 따른 및 환자에 의해 용인된 용량 및 빈도에 따라 투여될 수 있다. 치료에 필요한 특정 용량은 포유동물의 의학적 상태 및 병력 뿐만 아니라 다른 인자, 예를 들면, 연령, 체중, 성별, 투여 루트, 효율 등에 의존할 것이다.
- [0162] 본 발명이 자세히 설명되긴 하지만, 다양한 변화와 변형이 본 발명의 사상 또는 범위로 부터 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0164] 실시예
- [0165] 실시예 1 중쇄-단독 항체를 발현하는 유전적으로 가공된 쥐
- [0166] 인간 IgH 좌위가 여러 부분에서 삭제되고 조립되었는데, 이들은 쥐 C 영역 유전자의 변형 및 연결을 수반하였고, 이들 유전자는 이후, 인간 V_H6-D-J_H 영역의 하류에 결합되었다. 인간 V_H 유전자의 별개의 클러스터를 갖는 2개의 BAC가 이후, 조립된(인간 V_H6-D-J_H-쥐 C) 단편을 인코딩하는 BAC와 동시 주입되었다.
- [0167] 재배열되지 않은 형상에서 인공 중쇄 면역글로불린 좌위를 보유하는 유전자도입 쥐가 산출되었다. 포함된 불변 영역 유전자는 IgM, IgD, IgG2b, IgE, IgA 및 3' 인핸서를 인코딩한다. 유전자도입 쥐의 RT-PCR 및 혈청 분석(ELISA)은 유전자도입 면역글로불린 좌위의 생산적 재배열 및 혈청에서 다양한 아이소타입의 중쇄 단독 항체의 발현을 드러냈다. 유전자도입 쥐는 미국 특허 공개 2009/0098134 A1에서 전술된 돌연변이된 내인성 중쇄와 경쇄 좌위를 갖는 쥐와 교배되었다. 이런 동물의 분석은 쥐 면역글로불린 중쇄와 경쇄 발현의 비활성화, 그리고 인간 V, D, 및 J 유전자에 의해 인코딩된 가변 영역을 갖는 중쇄 항체의 높은 수준 발현을 증명하였다. 유전자도입 쥐의 면역화는 항원 특이적 중쇄 항체의 높은 역가 혈청 반응의 생산을 유발하였다. 인간 VDJ 영역을 갖는 중쇄 항체를 발현하는 이들 유전자도입 쥐는 UniRats로 불렸다.
- [0168] 실시예 2 고정된 경쇄 항체를 발현하는 유전적으로 가공된 쥐
- [0169] 유전자도입 인간 항체 레퍼토리가 독특한 L-사슬과 조합으로 다양한 (V_H-D-J_H)_n 재배열을 갖는 H-사슬로부터 산출되었다. 이를 위해, 재배열된 L-사슬, 인간 Vk-Jk1-Ck가 DNA 미량주사에 의해 쥐 생식계열에서 통합되었고, 그리고 획득된 유전자도입 동물은 인간 H-사슬 레퍼토리를 자연적으로 발현하는 전술된 쥐 계통과 교배되었다(Osborn *et al.*, 2013). 이러한 새로운 쥐 계통은 OmniFlic로 명명되었다.
- [0170] 많은 상이한 항원을 이용한, OmniFlic 쥐의 면역화는 동일한 IgH 좌위를 보유하는 다른 유전자도입 쥐와 유사하게 높은 수준의 항원 특이적 IgG를 생산하였다. RT-PCR에 의한 레퍼토리 분석은 높은 전사체 및 단백질 수준에서 고도로 가변적인 V_H-유전자 재배열을 확인하였다. 이에 더하여, 높은 수준에서 또한 발현되는 단지 하나의 L-사슬 산물만 확인되었다.
- [0171] OmniFlic로부터 항원 특이적 결합체는 NGS 및 cDNA 라이브러리 (효모, 대장균 (*E. coli*), 파지)로부터 선별에 의해 획득되었는데, 이들은 염기서열 결정 시에 다양한 H-사슬 전사체를 확인하였다. 포유류 세포에서 발현을 위해, 초돌연변이된 H-사슬 구조체가 본래 유전자도입 Igκ 서열과 조합으로 형질감염되었다. 이러한 재배열된 Vk-Jk1-Ck에서는 어떤 돌연변이 변화도 허용되지 않았고, 그리고 항상 동일한 L-사슬이 다양한 H-사슬 산물과 함께 발현되어 단일클론 인간 IgG가 산출되었다.
- [0172] 실시예 3 유전자도입 쥐에서 항원 특이적 항체의 산출,
- [0173] 쥐에서 항원 특이적 중쇄 항체의 산출을 위해, 발현하는 유전적으로 가공된 쥐는 2가지 방식으로 면역화되었다.
- [0174] PD-L1 및 BCMA의 재조합 세포의 도메인으로 면역화. PD-L1 및 BCMA의 재조합 세포의 도메인은 R&D Systems로부

터 구입되고, 무균 식염수로 희석되고, 어쥬번트와 조합되었다. 면역원은 완전 프로인드 어쥬번트(CFA) 및 불완전 프로인드 어쥬번트(IFA), 또는 Titermax 및 Ribic 어쥬번트와 조합되었다. CFA 또는 Titermax에서 면역원으로 첫 번째 면역화(접화)가 왼쪽 및 오른쪽 다리에서 시행되었다. CFA에서 면역원으로 첫 번째 면역화 후, IFA에서 2회 추가 면역화(부스터), 또는 Ribic에서 4회 추가 면역화 및 Titermax에서 1회 추가 면역화가 각 다리에서 시행되었다. 면역화의 이러한 순서는 높은 친화도 항체를 생산하는 B 세포의 발달을 야기한다. 면역원 농도는 다리마다 10 마이크로그램이었다. 혈청 역가를 결정하기 위해, 최종 채혈에서 쥐로부터 혈청이 수집되었다.

[0175] 항인간 CD3 δ ϵ 항체의 산출을 위해, 유전적으로 가공된 쥐는 DNA-기초된 면역화 프로토콜을 이용하여 면역화되었다.

[0176] OmniFlic 쥐는 Aldevron, Inc. (Fargo, ND)에서 GENOVAC Antibody Technology를 이용하여 인간 및 시노물구스 CD3-엡실론/델타 구조체로 면역화되었다. 배수 림프절이 최종 추가 접종 후 수확되었고, 그리고 RNA가 단리되었다. cDNA 합성 이후에, IgH 중쇄 항체 레퍼토리가 차세대 염기서열결정 및 우리의 독점 인하우스 소프트웨어에 의해 특징화되었다. 항원 특이적 양성 선별의 증거를 보여주는 후보 항원 특이적 VH 서열이 선택되었다. FlicAb를 인코딩하는 수백 개의 VH 서열이 유전자 어셈블리를 위해 선택되고 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 차후에, 완전 인간 FlicAb IgG1 항체가 유동 및 ELISA에 의한 분석을 위해 HEK 세포에서 발현되었다. 인간 FlicAb는 유동에 의해 일차 인간 T 세포 및 Jurkat 세포에 결합에 대해 검사되었다. 이에 더하여, 인간 FlicAb는 ELISA에서 재조합 CD3 δ ϵ 단백질을 이용하여 검사되었다. 인간 T 세포에 대해 양성 결합을 갖는 모든 FlicAb는 도 1 및 2에서 열거된다. 선별된 서열은 T 세포 활성화 검정에서 더욱 특징화되었다.

[0177] 실시예 4 항체의 특성규명

[0178] 도 3의 데이터 표는 단일특이적 및 이중특이성 형식에서 패밀리 2의 항-CD3 항체의 거동을 요약한다. 칼럼 1은 항-CD3 VH 서열에 대한 서열 ID를 보여준다. 칼럼 2는 부모 단일특이적 항-CD3의 Jurkat 세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다. 칼럼 3은 부모 단일특이적 항-CD3의 cyno T-세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다. 칼럼 4는 CD3:aBCMA 이중특이성 항체의 명칭을 나타낸다. 칼럼 5는 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-2를 보여준다. 칼럼 6은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-6을 보여준다. 칼럼 7은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IL-10을 보여준다. 칼럼 8은 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 IFN- γ 을 보여준다. 칼럼 9는 지시된 용량에서 플라스틱 위에 코팅된 BCMA 단백질에 결합하는 이중특이성 항체에 의해 자극된 범 T-세포에 의해 방출된 피코그램의 TNF α 를 보여준다. 칼럼 10은 인간 범 T-세포의 존재에서 이중특이성 항체-매개된 U266 종양 세포 용해의 EC50을 보여준다. 칼럼 11은 333ng/mL의 용량의 이중특이성 항체에서 이중특이성 항체 및 인간 범 T-세포의 존재에서 U266 종양 세포의 용해 퍼센트를 보여준다. 칼럼 12는 Octet에 의해 측정된 이중특이성 항체의 항-CD3 아암의 단백질 결합 친화도를 보여준다. 칼럼 13은 이중특이성 항체의 Jurkat 세포 결합에 대한 MFI 값을 보여준다.

[0179] 실시예 5 이중특이성 항체 특성규명

[0180] 각각 독특한 항-CD3 아암(표시된 바와 같이) 및 통상적인 항-BCMA 아암을 갖는 7가지 α CD3_{fam2}:aBCMA 이중특이성 항체는 활성화된 일차 T 세포의 전향을 통해 U266 BCMA+ 종양 세포를 사멸시키는 능력에 대해 검사되었다. 이러한 실험에서 BCMA를 발현하는 U266 세포는 이중특이성 항체의 첨가와 함께 10:1 E:T 비율에서, 활성화된 범 T-세포와 혼합되었다. 도 4에 나타내는 바와 같이, x 축은 이용된 항체의 농도를 보여주고, 그리고 y 축은 항체의 첨가 후 6 시간에 종양 세포의 용해%를 보여준다.

[0181] 이중특이성 항체-매개 종양 세포 용해 활성과 IL-2 사이토카인 방출의 비교를 도 5의 산점도에 나타낸다. IL-2 생산 및 U266 종양 세포 용해 사이의 상관관계는 $R^2 = 0.37$ 이다. 이중특이성 항체-매개 종양 세포 용해 활성과 IFN- γ 사이토카인 방출의 비교를 도 6의 산점도에 나타낸다. IFN- γ 생산과 U266 종양 세포 용해 사이의 상관관계는 $R^2 = 0.53$ 이다. 이중특이성 항체-매개 U266 종양 세포 용해 활성과 항-CD3 결합 친화도의 비교를 도 7의 산점도에 나타낸다. U266 사멸 EC50 및 단백질 결합 친화도 사이의 상관관계는 $R^2 = 0.93$ 이다.

[0182] 실시예 6 종양 세포의 용해

[0183] α CD3_{F1F}:aBCMA 이중특이성 항체는 활성화된 일차 T 세포의 전향을 통해 3가지 상이한 BCMA+ 종양 세포 및 1

가지 BCMA-음성 세포주를 사멸시키는 능력에 대해 검정되었다. 이러한 실험에서, 종양 세포는 이중특이성 항체의 첨가와 함께 10:1 E:T 비율에서, 활성화된 범 T-세포와 혼합되었다. 결과를 도 8A 내지 8D에 나타낸다. 패널 A는 RPMI-8226 세포의 사멸을 나타내고, 패널 B는 NCI-H929 세포의 사멸을 보여주며, 패널 C는 U-266 세포의 사멸을 보여주고, 그리고 패널 D는 음성 대조군인 K562 세포의 사멸을 보여준다. x 축은 이용된 항체의 농도를 보여주고, 그리고 y 축은 항체의 첨가 후 6 시간에 종양 세포의 용해%를 보여준다.

[0184] IL-2 사이토카인 방출 수준은 휴지기 인간 T 세포가 다양한 종양 세포주 및 증가하는 용량의 α CD3_F1F: α BCMA 이중특이성 항체와 함께 배양된 후 측정되었다. 도 9A는 RPMI-8226 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, 도 9B는 NCI-H929 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, 도 9C는 U-266 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여주고, 그리고 도 9D는 음성 대조군인 K562 세포에 의해 자극된 IL-2 방출을 보여준다.

[0185] IFN- γ 사이토카인 방출 수준은 휴지기 인간 T 세포가 다양한 종양 세포주 및 증가하는 용량의 α CD3_F1F: α BCMA 이중특이성 항체와 함께 배양된 후 측정되었다. 도 10A는 RPMI-8226 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, 도 10B는 NCI-H929 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, 도 10C는 U-266 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여주고, 그리고 도 10D는 음성 대조군인 K562 세포에 의해 자극된 IFN- γ 방출을 보여준다.

[0186] 이들 실시예는 당업자에게 본 발명을 만들고 이용하는 방법에 관한 완전한 개시와 설명을 제공하기 위해 제안되고, 그리고 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않고, 또한 이들은 아래 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험이라는 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 이용된 숫자(가령, 양, 온도 등)에 대하여 정확도를 담보하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험 오차와 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않으면, 분율은 중량에 의한 분율이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도(°C)이고, 그리고 압력은 대기압이거나 또는 이에 가깝다.

[0187] 본 발명이 특정한 구체예에 관하여 설명되긴 했지만, 다양한 변화가 만들어질 수 있고, 그리고 등가물이 발명의 진정한 사상과 범위로부터 벗어남 없이 치환될 수 있는 것으로 당업자에 의해 이해되어야 한다. 이에 더하여, 특정 환경, 물질, 물질 조성물, 과정, 과정 단계 또는 단계들을 본 발명의 목적, 사상과 범위에 적합하게 하는 많은 변형이 만들어질 수 있다. 이런 모든 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

도면1a

내부 ID	서열번호	CDR1	CDR2	CDR3
312557	1	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	2	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	3	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
308160	4	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308256	5	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312585	6	GFTFANYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312614	7	GFTFNYYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312583	8	GFTFADYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312586	9	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312624	10	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312578	11	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312620	12	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGSYSRGGAY
312634	13	GFTFHNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312579	14	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312630	15	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312570	16	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	17	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312558	18	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

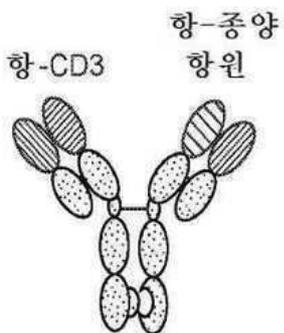
도면1b

312325	서열번호	19	QSVSSN	GAS	QYNNWPWT
308902- 2가	서열번호	20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPPDH
308902	서열번호	21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPPDH

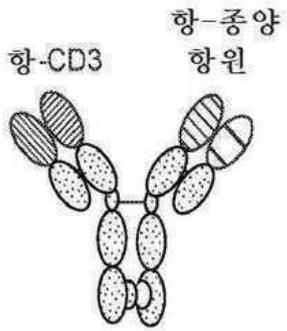
도면1c

304703
서열번호
22
GGSSISSGGHY
IHYSGST
ARWRHDIFAAYPPYYGMDV

도면2a



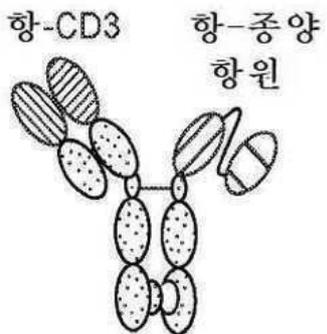
도면2b



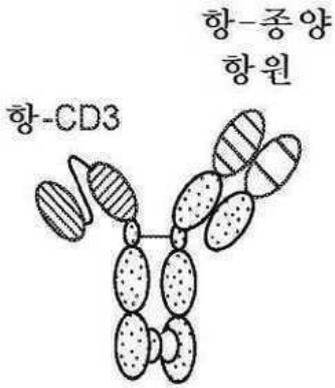
도면2c



도면2d



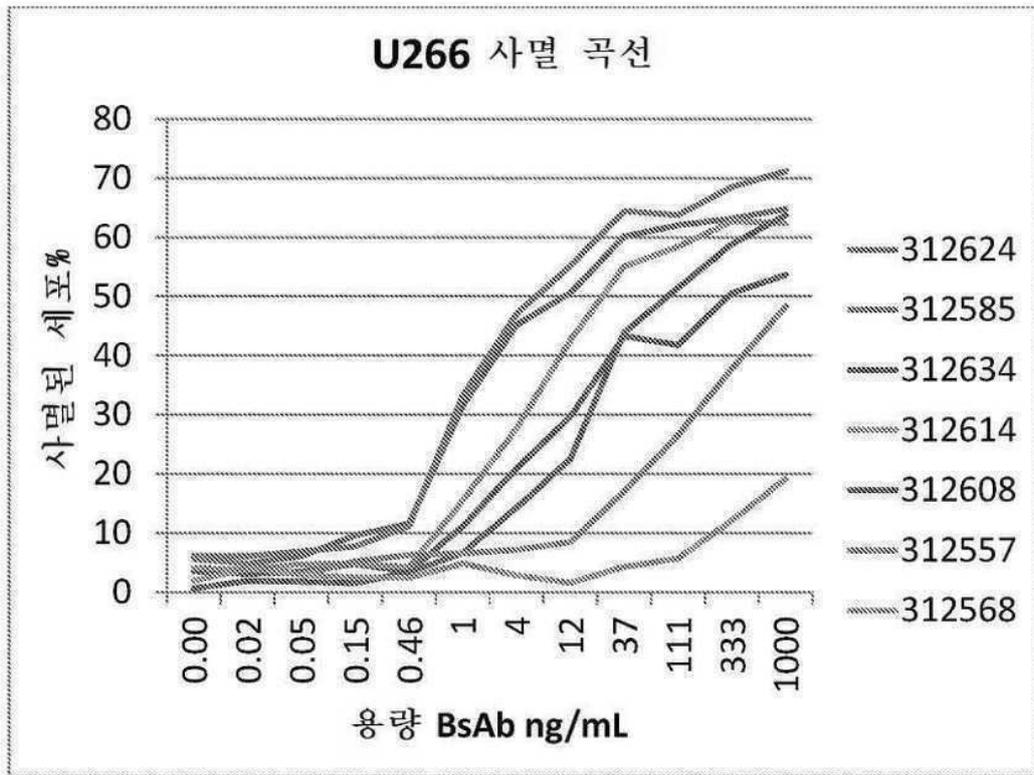
도면2e



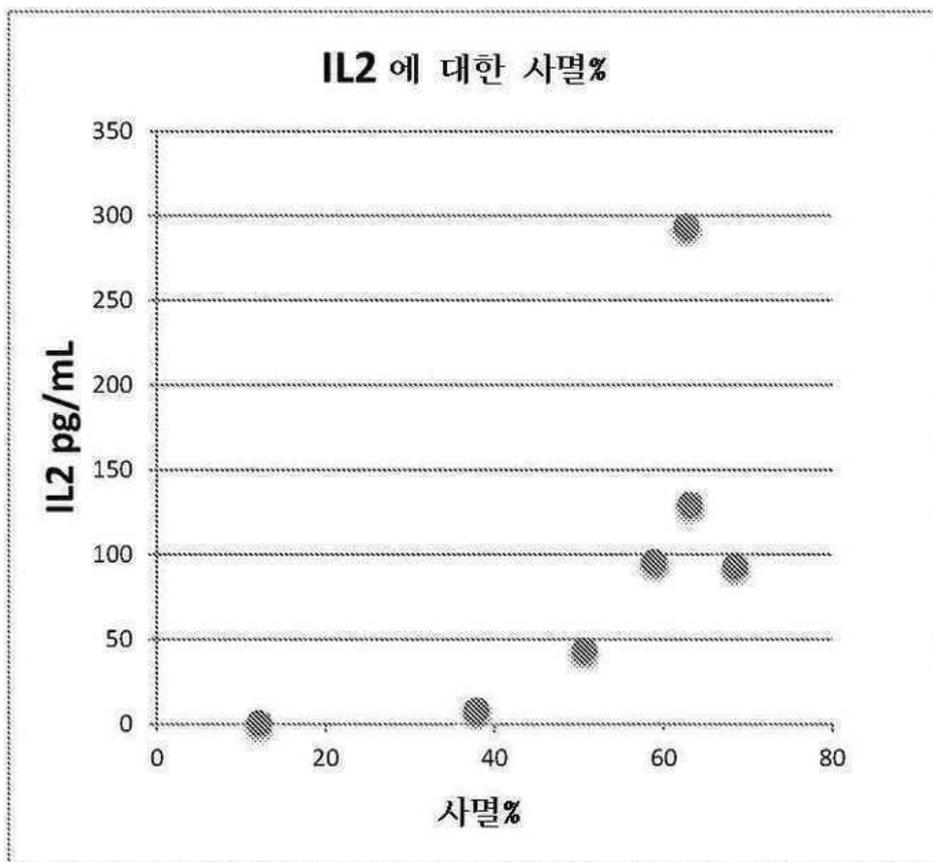
도면3

항-CD3 ID	도 항-CD3 형체			항-CD3:항-BCMA 이중특이성 형체	관람											
	1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Jurkat세포 결합 (MFI)	Cyno T세포 결합 (MFI)	BSAb 용량 ng/mL	IL-2	IL-6	IL-10	IFNγ	TNFα	사멸 EC50 (ng/mL)	사멸% (333ng/mL)	KD (nM)	Jurkat세포 결합 (MFI)					
312624	30.5	1.4	CD3_F2E-BCMA	130	110	2418	705	1787	2.0	83	227	296				
312585	32.7	0.9	CD3_F2C-BCMA	93	0.5	19.2	751	1821	2.1	68	44	513				
312614	32.4	0.9	CD3_F2D-BCMA	294	1.5	89.9	1185	2387	6.1	63	86	357				
312634	21.4	1.1	CD3_F2F-BCMA	44	0.5	2.4	333	485	9.8	51	714	67				
312608	25.9	1.0	CD3_F2A-BCMA	96	0.5	3.3	505	1161	22.2	59	199	110				
312557	6.1	1.0	CD3_F2B-BCMA	8	0.5	0.6	154	553	150.1	38	1000	31				
312568	4.1	1.2	CD3_F2G-BCMA	1	0.5	0.5	49	231	352.0	12	ND	9				
304703	15.9	26.2	CD3_F1A-BCMA	212	0.8	48.5	746	1844	6.4	71	98	149				

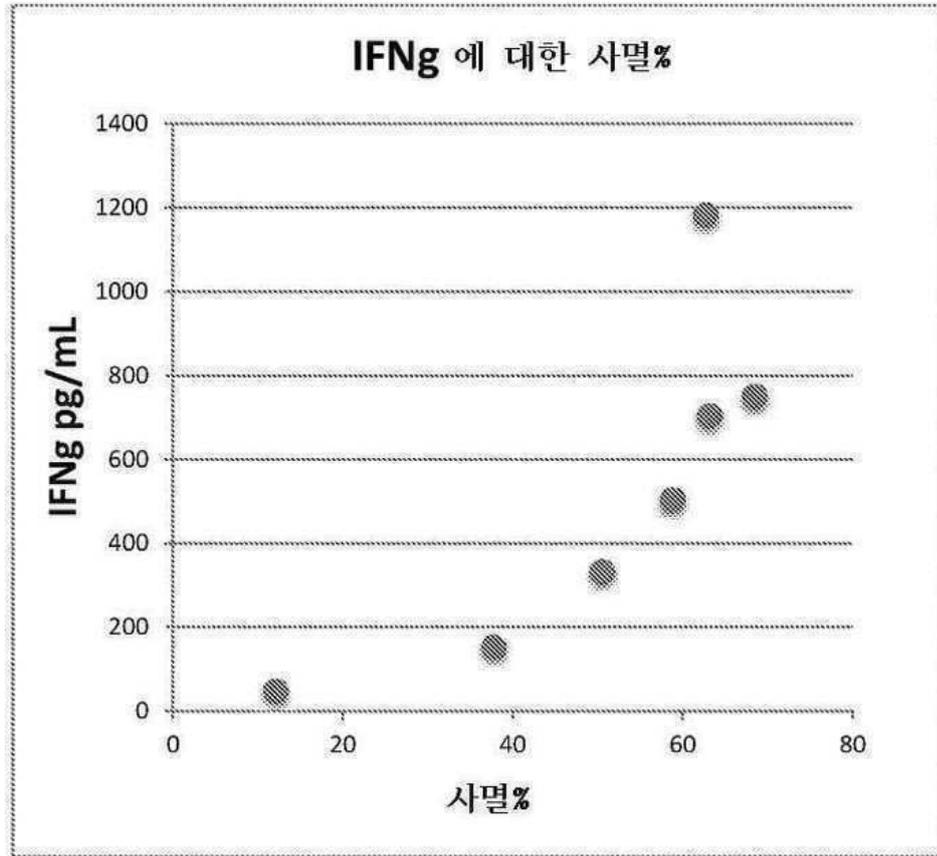
도면4



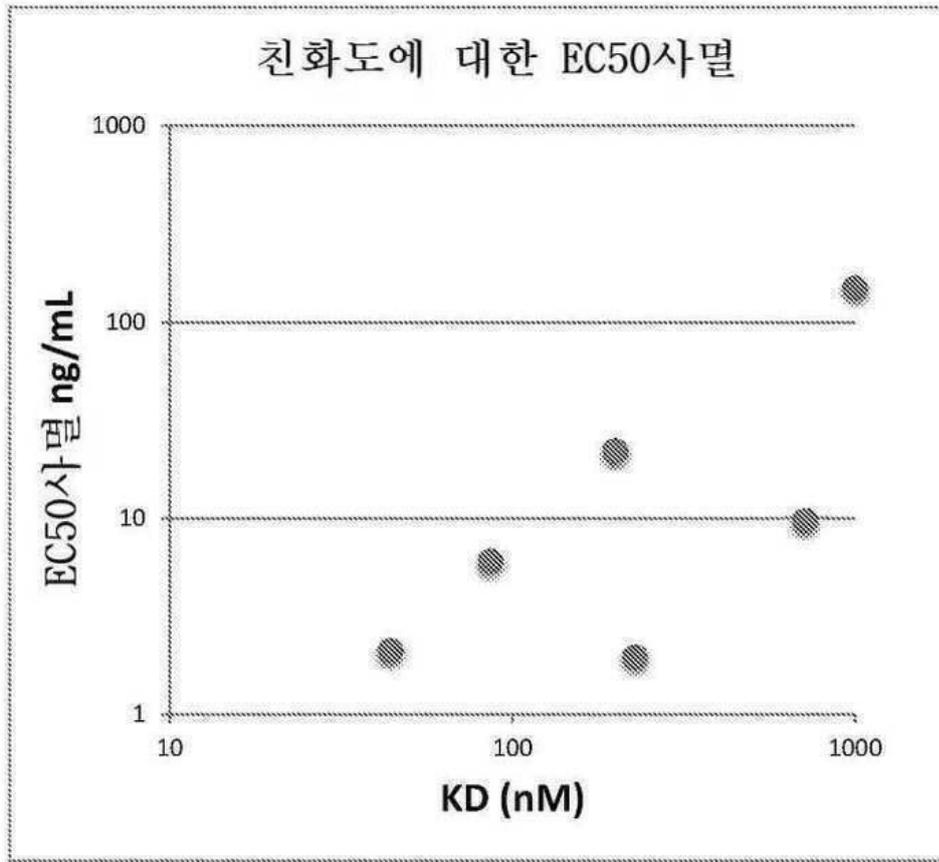
도면5



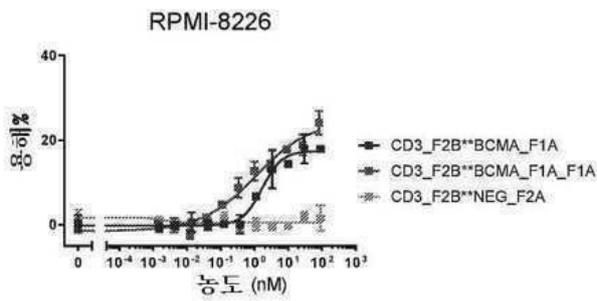
도면6



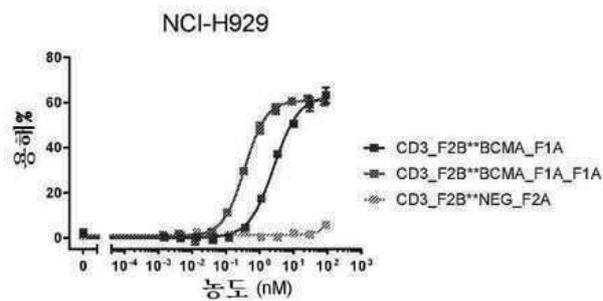
도면7



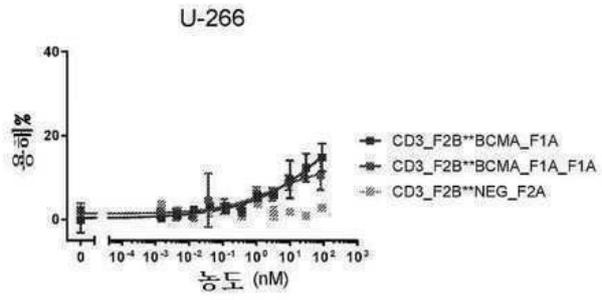
도면8a



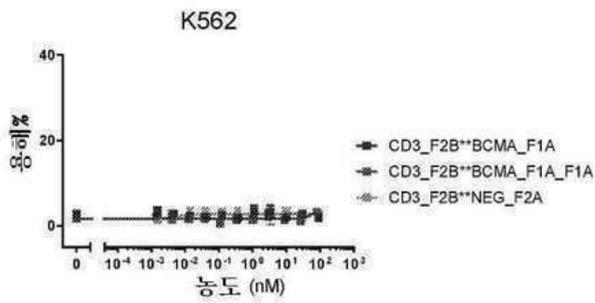
도면8b



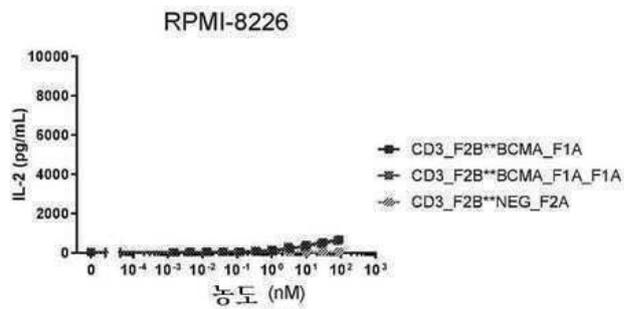
도면8c



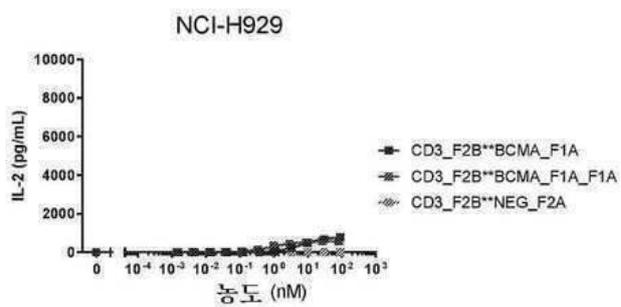
도면8d



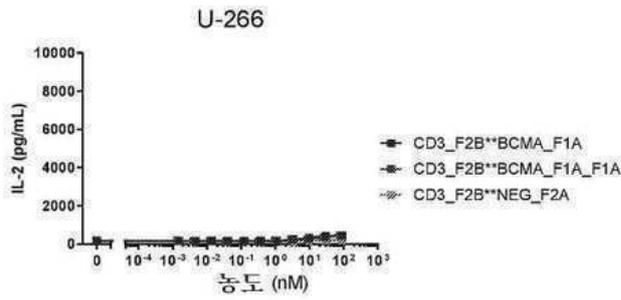
도면9a



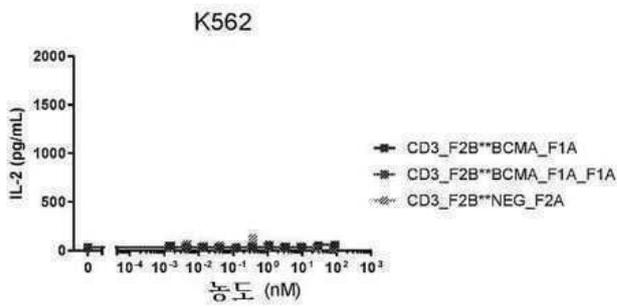
도면9b



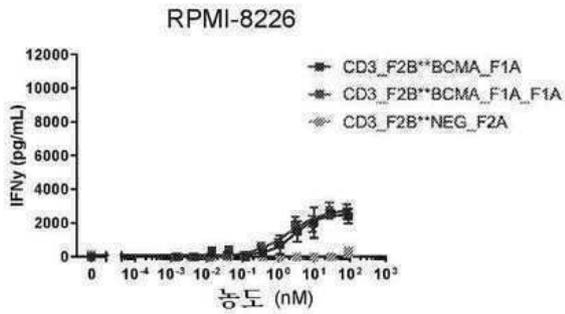
도면9c



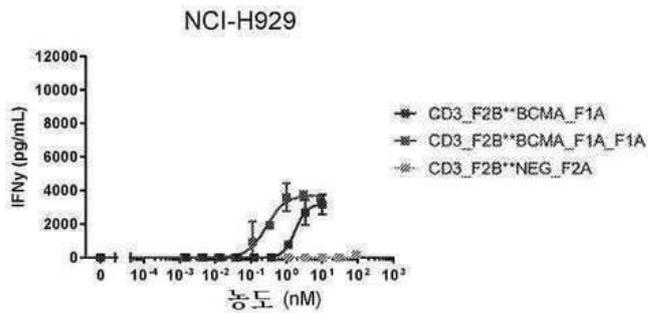
도면9d



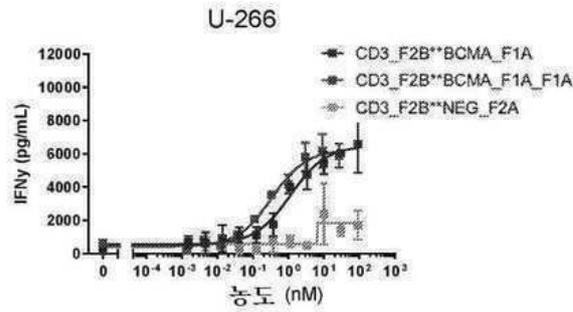
도면10a



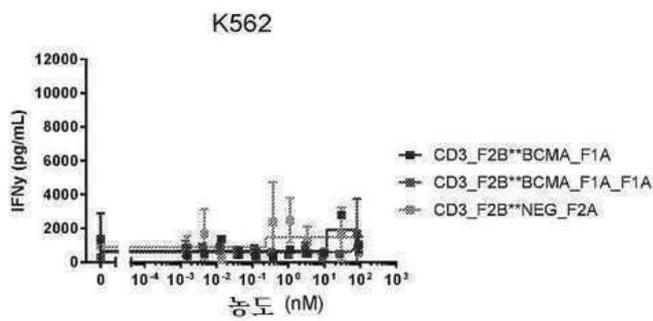
도면10b



도면10c



도면10d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Trinklein, Nathan

vanSchooten, Wim

Aldred, Shelley Force

Harris, Katherine

Pham, Duy

<120> CD3 Binding Antibodies

<130> TEBO-001W02

<150> 62/394,360

<151> 2016-09-14

<150> 62/491,908

<151> 2017-04-28

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

<400> 19

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Gly Ile Arg
 165 170 175
 Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Gly
 210 215 220

Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 225 230 235 240
 Val Ser Ser

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val

