



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0024035  
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/2809 (2013.01)  
A61K 51/1042 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2021-7040895  
(22) 출원일자(국제) 2020년06월19일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년12월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/038669  
(87) 국제공개번호 WO 2020/257604  
국제공개일자 2020년12월24일

(30) 우선권주장  
62/864,960 2019년06월21일 미국(US)

(71) 출원인  
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드  
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

(72) 발명자  
키쉬너 제시카 알.  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내 크로포드 엘리슨  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내 추 다니카  
영국 런던 엔더블유34엘비 벨사이즈 파크 가든즈 7 에이

(74) 대리인  
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **MUC16 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자와 4-1BB 공동 자극의 병용**

**(57) 요약**

뮤신 16(MUC16) 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에 따르면, 본원에서 유용한 항체는 높은 친화도로 인간 MUC16에 결합하고 CD3에 결합하여 인간 T 세포 증식을 유도한다. 특정 구현예에 따르면, 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 인간 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 분자를 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자는 본원에서 특히 유용하다. 특정 구현예에서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 항-4-1BB 작용제와 병용으로, MUC16를 발현하는 종양, 예를 들어 난소 종양의 성장을 억제할 수 있다. 항-4-1BB 작용제와 조합된 이중 특이적 항원 결합 분자는, 표적화된 면역 반응의 상황 조절 또는 유도가 바람직하고/하거나 치료적으로 유익한 질환 또는 장애를 치료하는 데(예를 들어, 다양한 암을 치료하는 데) 유용하다.

(52) CPC특허분류

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 16/2878* (2013.01)

*C07K 16/3092* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*A61K 2039/507* (2013.01)

*C07K 2317/31* (2013.01)

*C07K 2317/75* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

암을 치료하거나 종양의 성장을 억제하는 방법으로서, (a) 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자; 및 (b) 항-4-1BB 작용제 각각의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 암은 유방암, 난소암, 각막암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-종피 형성 유형, 자궁암, 자궁경부암, 위암, 또는 대장 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 암은 난소암인, 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 암은 유방암인, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체 및 항-4-1BB 작용제는 별도로 투여되는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체 및 상기 항-4-1BB 작용제는 공동 투여되는, 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체는 항-4-1BB 작용제 이전에, 동시에, 또는 이후에 투여되는, 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체는 항-4-1BB 작용제 이전에 투여되는, 방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체는 항-4-1BB 작용제와 동일한 날에 투여되는, 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항체는 항-4-1BB 작용제와 병용 투여되는, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 항-4-1BB 작용제는 저분자 또는 항체로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 항-4-1BB 작용제는 우렐루맙 및 유토밀루맙으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체인, 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 제1 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 항원 결합 도메인은 인간 CD3에 특이적으로 결합하고 서열번호 2의 중쇄 가변 영역(HCVR-1) 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 이 중 특이적 항원 결합 분자는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 인간 MUC16에 특이적으로 결합하고 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 15**

제13항 또는 제14항에 있어서, 이 중 특이적 항원 결합 분자는: CD3에 특이적으로 결합하고 서열번호 2의 HCVR-1 아미노산 서열을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및 MUC16에 특이적으로 결합하고 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 분자를 포함하는, 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 이 중 특이적 항원 결합 분자는 서열번호 3의 공통 경쇄 가변 영역 (LCVR) 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 종양 부피는 항-4-1BB 작용제 없이 항-CD3/항-MUC16 이 중 특이적 항원 결합 분자가 투여된 대상체의 종양에 비해 감소되는, 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 대상체의 무종양 생존 기간은 항-4-1BB 작용제 없이 항-CD3/항-MUC16 이 중 특이적 항원 결합 분자가 투여된 대상체의 무종양 생존 기간에 비해 증가하는, 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 무종양 생존 기간의 증가는 대상체에서 체중 감소 없이 발생하는, 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 항-4-1BB 작용제가 존재하는 가운데 항-CD3/항-MUC16 이 중 특이적 항원 결합 분자로 치료한 대상체에서, 종양 세포에 대한 후속 노출은 기억 반응을 유도하는, 방법.

**청구항 21**

약학적 조성물로서,

(a) (i) 인간 CD3에 특이적으로 결합하고 서열번호 2의 HCVR-1 아미노산 서열을 포함하는 제1 항원 결합 도메인, 및 (ii) 인간 MUC16에 특이적으로 결합하고 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 분자를 포함하는, 이 중 특이적 항원 결합 분자;

(b) 항-4-1BB 작용제; 및

(c) 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 22**

제21항에 있어서, (a)의 이 중 특이적 항원 결합 분자는 서열번호 3의 공통 LCVR 아미노산을 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 23**

MUC16 및 CD3에 결합하는 이 중 특이적 항원 결합 분자, 킬레이트화 모이어티, 및 양전자 이미터를 포함하는, 방사성 표지된 항체 접합체.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 이의 이 중 특이적 항원 결합 분자는 화학식 (A)의 킬레이트화 모이어티인 L에 공유 결합되며:

-L-M<sub>z</sub>

(화학식 A)

식 중 M은 양전자 이미터이고; z는 각각의 경우에 독립적으로 0 또는 1이며; z 중 적어도 하나는 1인, 집합체.

**청구항 25**

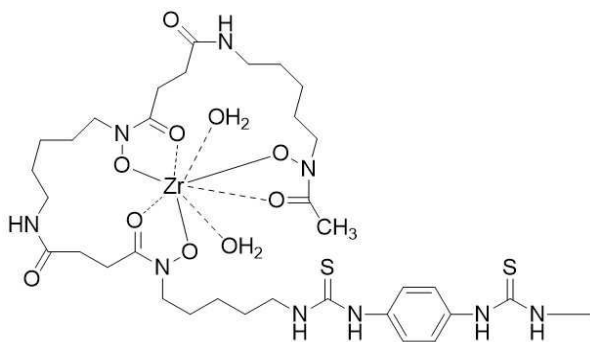
제23항 또는 제24항에 있어서, 킬레이트화 모이어티는 데스페리옥사민을 포함하는, 집합체.

**청구항 26**

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 양전자 이미터는 <sup>89</sup>Zr인, 집합체.

**청구항 27**

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, -L-M은



이고; 식 중 양전자 이미터 Zr은 <sup>89</sup>Zr인, 집합체.

**청구항 28**

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 화학식 (A)의 1개, 2개, 또는 3개의 모이어티에 공유 결합되는, 집합체.

**청구항 29**

제23항 또는 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 특이적 항원 결합 분자는: CD3에 특이적으로 결합하고 서열 번호 2의 HCVR-1 아미노산 서열을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및 MUC16에 특이적으로 결합하고 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 분자를 포함하는, 집합체.

**청구항 30**

MUC16를 발현하는 조직을 영상화하는 방법으로서, 제23항 내지 제29항 중 어느 한 항의 방사성 표지된 이중 특이적 항체 집합체를 조직에 투여하는 단계; 및 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함하는, 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

기술분야

[0002]

본 발명은 4-1BB 공동 자극과 병용 시의 뮤신 16(MUC16) 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0003]

서열 목록에 대한 참조

[0004]

서열 목록의 공식 사본은, 2020년 6월 19일자로 생성되고 10604W001\_SEQ\_LIST\_ST25의 파일명을 가진 약 16,384 바이트 크기의 ASCII 형식의 서열 목록으로서, EFS-Web을 통해 전자 방식으로 명세서와 함께 동시에 제출된다.

본 ASCII 형식의 문헌에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

**배경 기술**

[0005] 암 항원 125, 암종 항원 125, 탄수화물 항원 125, 또는 CA-125로도 알려진 뮤신 16(MUC16)은 단일 막관통 도메인을 가진 고도로 당질화된 일체형 막 당단백질이며, 난소암에서 고도로 발현된다. MUC16은 다음 3개의 주요 도메인으로 구성된다: 세포외 N-말단 도메인; 성게 정자, 엔테로키나아제, 및 아그린(SEA) 도메인이 산재된 큰 텐덤 반복 도메인; 및 막관통 영역의 분절 및 짧은 세포질 꼬리를 포함하는 카르복실 말단 도메인. 단백질 가수분해 절단은 MUC16의 세포외 부분 중 대부분을 혈류 내로 배출시킨다. MUC16은 난소암, 유방암, 췌장암, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-종괴 형성 유형, 자궁 경부 선암종, 및 위관 선암종을 포함하는 암, 및 염증성 장 질환, 간경화증, 심부전, 복막 감염증, 및 복부 수술을 포함하는 질환 및 병태에서 과발현된다. (Haridas, D. 등의 문헌[2014, FASEB J., 28:4183-4199] 참조). 암세포에서의 발현은 면역체계로부터 종양 세포를 보호하는 것으로 보인다. (Felder, M. 등의 문헌[2014, Molecular Cancer, 13:129]) MUC16에 대한 항체를 사용하여 난소암을 치료하는 방법이 연구되어 왔다. 오레고보맵(oregovomab) 및 압고보맵(abgovomab)은 제한적으로 성공한 항-MUC16 항체이다. (Felder의 전술한 문헌, Das, S. 및 Batra, S.K.의 문헌[2015, Cancer Res. 75:4660-4674]).

[0006] CD3은 T 세포 수용체 복합체(TCR)와 관련하여 T 세포에서 발현되는 동종이량체 또는 이종이량체 항원이며, T 세포 활성화에 필요하다. 기능적 CD3은 4개의 상이한 사슬(엡실론, 제타, 델타, 및 감마) 중 2개의 이량체 결합으로부터 형성된다. CD3 이량체 배열은 감마/엡실론, 델타/엡실론, 및 제타/제타를 포함한다. CD3에 대한 항체는 T 세포 상에 CD3을 클러스터링함으로써, 펩티드 로딩된 MHC 분자에 의한 TCR의 결합과 유사한 방식으로 T 세포 활성화를 유발하는 것으로 나타났다. 따라서, 항-CD3 항체가, T 세포의 활성화를 포함하는 치료 목적으로 제안되었다. 또한, CD3 및 표적 항원에 결합할 수 있는 이중 특이적 항체가, 표적 항원을 발현하는 조직 및 세포에 대한 T 세포 면역 반응을 표적화하는 것을 포함하는 치료적 용도로 제안되었다.

[0007] T 세포 활성화에 있어서, TNF 수용체 상과를 통한 공동 자극은 생존, 효과기 기능 획득, 및 기억 세포로의 분화의 핵심이다. CD137로도 알려진 4-1BB(Tnfrsf9)는 TNF 수용체 상과의 구성원이다. 수용체 발현은 TCR 매개 프라이밍에 이어지는 림프구 활성화에 의해 유도되지만, 그 수준은 CD28 공동 자극에 의해 증강될 수 있다. CD8<sup>+</sup>T 세포 상의 리간드 또는 작용제 단클론 항체(mAb)에 대한 노출은 4-1BB를 공동 자극하여, T 세포의 클론 증식, 생존 및 발달; 말초 단핵구의 증식 유도; NF-카파B의 활성화; TCR/CD3 유발 활성화에 의해 유도된 T 세포 자멸사의 강화, 및 기억 세포 생성에 기여한다.

**발명의 내용**

[0008] 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에게 투여하고, 항-4-1BB 작용제를 대상체에게 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 방법은 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자, 항-4-1BB 작용제, 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 난소암, 유방암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 종괴종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-종괴 형성 유형, 자궁 경부의 선암종, 및 위관의 선암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 암은 난소암이다. 일부 경우에, 암은 유방암이다.

[0009] 추가로, 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하기 위한 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 상기 방법은 (a) 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자; 및 (b) 항-4-1BB 작용제 각각의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 또한, MUC16를 발현하는 종양 세포를 표적화/살해하기 위한 치료 방법이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 상기 치료 방법은 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자의 치료적 유효량 및 항-4-1BB 작용제의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 항-4-1BB 작용제는 별도로 제형화된다. 일부 양태에서, 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 항-4-1BB 작용제는 동일한 약학적 조성물로 제형화된다.

[0011] 또한, MUC16-발현 세포와 관련이 있거나 이에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서, 항-4-1BB 작용제와 더불어, 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자의 용도가 본

원에 제공된다.

- [0012] 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자를, 항-4-1BB 작용제가 존재하는 가운데 투여하면, 항-4-1BB 작용제 없이 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여한 대상체에서의 종양 부피에 비해 종양 부피를 감소시킬 수 있다.
- [0013] 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자를, 항-4-1BB 작용제가 존재하는 가운데 투여하면, 항-4-1BB 작용제 없이 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여한 대상체에서의 무종양 생존 기간에 비해 무종양 생존 기간을 증가시킬 수 있다. 일부 양태에서, 무종양 생존 기간의 증가는 대상체에서 체중 감소 없이 발생한다.
- [0014] 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자를, 항-4-1BB 작용제가 존재하는 가운데 투여하면, 종양 세포에 후속 노출 시, 항-4-1BB 작용제가 존재하는 가운데 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자로 치료한 대상체에서 기억 반응을 유도할 수 있다.
- [0015] 항-4-1BB 작용제는 4-1BB의 저분자 또는 생물학적 작용제일 수 있고, 일부 양태에서는 항체이다. 예시적인 항-4-1BB 작용제는 상업적으로 이용 가능한 항체, 예를 들어 항-마우스 4-1BB 작용제, 및 치료 항체, 예컨대 우렐루맵(urelumab) 및 유토밀루맵(utomilumab)을 포함한다.
- [0016] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 인간 MUC16 및 인간 CD3에 결합하는 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 이중 특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편이다. 이중 특이적 항체는, 예를 들어, MUC16를 발현하는 세포의 T 세포 매개 사멸이 유익하거나 바람직한 상황에서, CD3을 발현하는 T 세포를 표적화하고, T 세포 활성화를 자극하는 데 특히 유용하다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 난소 종양 세포와 같은 특이적 MUC16-발현 세포에 대해 CD3-매개 T 세포 활성화를 유도할 수 있다.
- [0017] MUC16에 결합하는 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항-4-1BB 작용제와 병용으로 MUC16-발현 종양, 및 특히 더 크고 및/또는 치료하기가 더 어려운 종양과 관련이 있거나 이에 의해 야기된 질환 및 장애를 치료하는 데 유용하다. 예시적인 항-MUC16 항체 및 이의 항원 결합 단편은 U.S. 2018/0112001에 상세히 기술되어 있다. 일부 양태에서, 항-MUC16 항체는 U.S. 2018/0112001에 언급된 서열번호 18의 HCVR 및 서열번호 26의 LCVR을 포함한다. 일부 양태에서, 항-MUC16 항체는 U.S. 2018/0112001에서 언급된 H1H8767P 항체이다.
- [0018] 또한, MUC16 및 CD3 둘 다에 결합하는 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자는 본원에 참조로서 통합된 미국 공개 제2018/0112001호에 기술되어 있다.
- [0019] MUC16 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 항체)는 본원에서 "항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 분자", "항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자", "MUC16xCD3 bsAb", 또는 단순히 "MUC16xCD3"로도 지칭된다. 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 분자의 항-MUC16 부분은 MUC16(예를 들어, 난소 종양)를 발현하는 세포(예를 들어, 종양 세포)를 표적화하는 데 유용하고, 이중 특이적 분자의 항-CD3 부분은 T 세포를 활성화하는 데 유용하다. 종양 세포 상의 MUC16 및 T 세포 상의 CD3에 동시 결합하면, 활성화된 T 세포가 표적화된 종양 세포를 유도 사멸(세포 용해)시키는 것을 용이하게 한다. 따라서, 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 분자는 MUC16-발현 종양(예를 들어, 난소 종양)과 관련이 있거나 이에 의해 야기되는 질환 및 장애를 치료하는 데 특히 유용하다. 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 분자는 항-4-1BB 작용제와 병용으로, MUC16-발현 종양과 관련이 있거나 이에 의해 야기되는 질환 및 장애를 치료하고, 기억 반응을 생성하고/하거나, 에피토프 확산을 유도하는 데에도 유용하다. 일부 양태에서, 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자는 항-4-1BB 작용제와 병용으로, 특히 이차 종양 유발을 억제함에 있어서, MUC16 항원의 존재 또는 이에 대한 반응과 상관없이 항종양 반응을 생성하는 데 유용하다.
- [0020] 이중 특이적 항원 결합 분자는 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0021] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 예시적인 이중 특이적 항체는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자이며, 여기서 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 임의의 미국 공개 제2018/0112001호에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 영역(HCVR) 아미노산 서열 중 어느 하나, 경쇄 가변 영역(LCVR) 아미노산 서열 중 어느 하나, HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 중 어느 하나, 중쇄 CDR1-CDR2-CDR3 아미노산 서열 중 어느 하나, 또는 경쇄 CDR1-CDR2-CDR3 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함한다.
- [0022] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자이며, 여기서 CD3에 특이

적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 미국 공개 제2018/0112001호의 표 16, 18, 19, 22, 및 24에 제시된 것과 같은 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나 및/또는 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 2의 HCVR-1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 5의 전장 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자이며, 여기서 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 미국 공개 제2018/0112001호의 표 1에 제시된 것과 같은 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나 및/또는 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 일부 양태에서, MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 4의 전장 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은 미국 공개 제2018/0112001호의 표 4에 제시된 것과 같은 서열 중 어느 하나, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자이다.

[0025] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자이며, 여기서 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 2의 HCVR-1 아미노산 서열을 포함하고, MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 1의 HCVR-2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자는 서열번호 3의 공통 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 것은 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자이며, 여기서 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 5의 전장 중쇄 아미노산 서열을 포함하고, MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 4의 전장 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 분자는 서열번호 6의 전장 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 일 양태에서, 항-MUC16 항원 결합 분자 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 항-4-1BB 작용제를 추가로 포함한다.

[0028] 본 개시의 방법에 따라 유용한 것은 항-MUC16 항체 및 이의 항원 결합 단편, 및 변형된 당질화 패턴을 갖는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자이다. 일부 응용예에서, 예를 들어, 항체 의존적 세포 독성(ADCC) 기능을 증가시키기 위해 바람직하지 않은 글리코실화 부위를 제거하는 변형이 유용하거나, 올리고당 사슬에 존재하는 푸코오스 모이어티가 결여된 항체가 유용할 수 있다(Shield 등의 JBC 277:26733(2002) 참조). 다른 응용예에서, 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변형시키기 위해 갈락토실화 변형이 이루어질 수 있다.

[0029] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 바와 같은 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자, 항-4-1BB 작용제, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 관련된 양태에서, 본 개시는 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자, 항-4-1BB 작용제, 및 제3 치료제가 조합된 조성물을 포함한다. 일 구현예에서, 제3 치료제는 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자와 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자와 유리하게 조합될 수 있는 예시적인 제제는 본원의 다른 곳에서 상세히 논의된다.

[0030] 또 다른 양태에서, 면역-PET 영상화에 사용하기 위한 방사성 표지된(radiolabelled) 항-MUC16 접합체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체가 본원에 제공된다. 접합체는 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자, 킬레이트화 모이어티, 및 양전자 이미터를 포함한다.

[0031] 상기 접합체를 합성하는 공정 및 이에 유용한 합성 중간체가 본원에 제공된다.

[0032] MUC16를 발현하는 조직을 영상화하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 조직에 투여하는 단계; 및 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다.

[0033] MUC16 발현 세포를 포함하는 조직을 영상화하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 방사성 표

지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 조직에 투여하는 단계; 및 PET 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다.

- [0034] 조직에서 MUC16를 검출하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 조직에 투여하는 단계; 및 PET 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 조직은 인간 대상체 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 대상체는 비인간 포유동물이다. 특정 구현예에서, 대상체는 암과 같은 질환이나 장애, 염증성 질환, 또는 감염을 갖는다.
- [0035] 조직에서 MUC16를 검출하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 형광 분자에 접합된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자와 조직을 접촉시키는 단계; 및 형광 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다.
- [0036] 항종양 요법에 적합한 대상체를 식별하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 고휘 종양을 가진 대상체를 선택하는 단계, 본원에 기술된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 항원 결합 분자 접합체를 투여하는 단계, 및 종양에 투여된 방사성 표지된 항체 접합체를 PET 영상화에 의해 시각화하는 단계를 포함하며, 여기서 방사성 표지된 항체 접합체가 종양에 존재하는 경우, 대상체는 항종양 요법에 적합한 대상체로서 식별된다.
- [0037] 종양을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 고휘 종양을 가진 대상체를 선택하는 단계; 고휘 종양이 MUC16 양성인지 결정하는 단계; 및 항종양 요법을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 항종양 요법은 예시적인 관문 억제제 요법인 PD-1/PD-L1 신호 전달 축 억제제(예: 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체)를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 대상체에게 투여하고, 방사성 표지된 항체 접합체의 국소화를 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화를 통해 영상화하여, 종양이 MUC16 양성인지 여부를 결정한다. 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항-PD-1 항체 접합체를 대상체에게 투여하고, 방사성 표지된 항체 접합체의 국소화를 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화를 통해 영상화하여, 종양이 PD-1 양성인지 여부를 결정한다.
- [0038] 대상체에서 항종양 요법의 효능을 모니터링 하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 고휘 종양을 가진 대상체로서 항종양 요법으로 치료 중인 대상체를 선택하는 단계; 본원에 기술된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 대상체에게 투여하는 단계; 투여된 방사성 표지된 접합체의 종양 내 국소화를 PET 영상화에 의해 영상화하는 단계; 및 종양 성장을 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 항종양 요법의 효능은 베이스라인 대비 접합체의 흡수 감소 또는 방사성 표지된 신호의 감소로 나타난다.
- [0039] 특정 구현예에서, 항종양 요법은 PD-1 억제제(예: REGN2810, BGB-A317, 니볼루맙, 피달리주맙, 및 웹브롤리주맙), PD-L1 억제제(예: 아테졸리주맙, 아벨루맙, 더발루맙, MDX-1105, 및 REGN3504를 비롯하여 특허 공개 제US 2015-0203580호에 개시된 것들), CTLA-4 억제제(예: 이필리무맙), TIM3 억제제, BTLA 억제제, TIGIT 억제제, CD47 억제제, GITR 억제제, 또 다른 T 세포 보조 억제제 또는 리간드의 길항제(예: LAG3, CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 또는 VISTA에 대한 항체), 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 억제제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제[예: 애플리버셉트(afibercept)와 같은 "VEGF-Trap" 또는 US 7,087,411에 제시된 것과 같은 기타 VEGF-억제 융합 단백질, 또는 항VEGF 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예: 베마시주맙, 또는 라니비주맙) 또는 VEGF 수용체의 소분자 키나아제 억제제(예: 수니티닙, 소라페닙, 또는 파조파닙)], Ang2 억제제(예: 네스바쿠맙), 형질변환 성장 인자 베타(TGFβ) 억제제, 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제(예: 엘로티닙, 세특시맙), CD20 억제제(예: 리투시맙과 같은 항CD20 항체), 종양 특이적 항원에 대한 항체[예: CA9, CA125, 흑색 종 관련 항원 3(MAGE3), 암배아 항원(CEA), 비멘틴, 종양-M2-PK, 전립선-특이 항원(PSA), 엽산 가수분해효소 1(FOLH1)로도 알려진 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 뮤신-1, MART-1, 및 CA19-9], 백신(예: 바실루스 칼렛-게링, 암 백신), 항원 제시를 증가시키는 보조제(예: 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자), 이중 특이적 항체(예: CD3xCD20 이중 특이적 항체, 또는 PSMAxCD3 이중 특이적 항체), 세포독소, 폴리-ADP-리보오스 폴리머라제(PARP) 억제제, 화학요법제(예: 다카바진, 테모졸로마이드, 시클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 다우노루비신, 시스플라틴, 카보플라틴, 젠시타빈, 메토틱세이트, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀 및 빈크리스틴), 시클로포스파미드, 방사선요법, IL-6R 억제제(예: 사릴루맙), IL-4R 억제제(예: 두필루맙), IL-10 억제제, 사이토카인(예: IL-2, IL-7, IL-21 및 IL-15), 및 항체-약물 접합체(ADC)(예: 항CD19-DM4 ADC, 및 항DS6-DM4 ADC)를 포함한다.

[0040] 다른 구현에는 다음의 상세한 설명을 검토함으로써 명백해질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0041] 도 1은 OVCAR-3 모델 임상시험 1의 결과(평균 휘도 [ $p/s/cm^2/sr$ ], 4일차)를 보여준다. 모든 군은 투여 시작 전에 BLI에 의해 평가했을 때 유사한 종양 부담을 가졌다. 표시된 데이터는 종양 이식 후 4일차에 BLI에 의해 평가했을 때의 종양 부담이다. 통계적 유의성은 독립표본 비모수 Mann-Whitney t 검정을 사용하여 결정하였다. 투여 시작 전에 군 간에 종양 부담에 있어서 유의한 차이는 없었다.

도 2는 OVCAR-3 모델 임상시험 1의 결과(평균 휘도 [ $p/s/cm^2/sr$ ], 25일차)를 보여준다. BSMUC16/CD3-001은 12.5 ug에서 종양 부담을 상당히 감소시키며, 항-4-1BB를 첨가하면 BSMUC16/CD3-001 단독에 비해 항종양 효능이 강화된다. 인간 T 세포가 생착된 NSG 마우스에게 인간 OVCAR-3/Luc 세포를 이식하였다. 종양 이식 후 5일차 및 8일차에 BSMUC16/CD3-001(12.5 ug IV) 또는 CD3-결합 대조군(12.5 ug IV)을 단독으로 치료하거나 항-4-1BB 작용제(100 ug IV)와 병용 치료하였다. 표시된 데이터는 종양 이식 후 25일차에 BLI에 의해 평가했을 때의 종양 부담이다. 통계적 유의성은 독립표본 비모수 Mann-Whitney t 검정을 사용하여 결정하였다. 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\*  $p = 0.0159$ 는 BSMUC16/CD3-001에 대한 것이고, \*\*  $p < 0.0079$ 는 BSMUC16/CD3-001과 항-4-1BB의 병용요법에 대한 것임). BSMUC16/CD3-001과 항-4-1BB의 병용을 BSMUC16/CD3-001 단독과도 비교하였다(#  $p = 0.0159$ ).

도 3은 BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB로 병용 치료한 ID8-VEGF/huMUC16 마우스 모델의 결과를 보여준다. BSMUC16/CD3-001 치료는 ID8-VEGF/huMUC16 복수(ascite) 모델에서 생존기간 중앙값을 유의하게 증가시키고, 4-1BB 공동 자극을 추가하면 여러 마우스의 생존을 가능하게 한다. 마우스 CD3 대신에 대신 인간 CD3 및 키메라 MUC16 분자를 발현하는 마우스에게 인간 MUC16의 일부를 발현하는 췌관 난소 종양주(tumor line)를 이식하였다. 이식 후 3일차, 6일차, 및 10일차에 BSMUC16/CD3-001 (1mg/kg IV) 또는 CD3 결합 대조군 (1 mg/kg IV)을 이소형 대조군을 마우스마우스에게 투여하거나, 이식 후 3일차에 항-4-1BB(클론 LOB12.3, 2.5 mg/kg IV)를 투여하고, 이어서 6일차 및 10일차에 BSMUC16/CD3-001 (1 mg/kg IV)의 2회의 추가 투여량을 마우스에게 투여하였다. 복수로 인해 복부가 팽창하여 마우스의 체중이 30% 넘게 증가했을 때 마우스를 희생시켰다. 통계적 유의성은 Gehan-Breslow-Wilcoxon 방법을 사용하여 결정하였다. 통계 분석을 위해, 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\*\* $p=0.0026$ 은 BSMUC16/CD3-001에 대한 것이고, \*\*\*\* $p<0.0001$ 은 BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB에 대한 것임). 또한, 항-4-1BB의 추가가 BSMUC16/CD3-001 단독에 비해 임의의 유의한 결과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, 항-4-1BB를 BSMUC16/CD3-001 단독과 비교하였다(#  $p=0.0168$ ). BSMUC16/CD3-001은 CD3-결합 대조군에 비해 생존기간 중앙값뿐만 아니라 마우스의 생존률도 증가시켰다(0에서 27%). 50%가 넘는 마우스가 생존했기 때문에, BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB 병용 치료군에 대한 생존 시간 중앙값은 정의할 수 없었다. 병용 치료군의 총 생존율은 55%였다.

도 4는 시간 경과에 따른 체중 변화를 도시한다. 도 3에 도시된 바와 같이 BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB를 이용한 병용 치료는 투여 기간 동안 유의한 체중 감소를 전혀 유도하지 않았는데, 이를 독성에 대한 관독값으로서 사용되었다.

도 5는 BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB의 3가지 상이한 병용 요법으로 치료한 ID8-VEGF/huMUC16 마우스 모델의 제 2 임상시험 데이터를 제공한다: A) 이식 후 3일차, 7일차, 및 10일차에 BSMUC16/CD3-001(1 mg/kg i.v.) 또는 CD3-결합 대조군(1 mg/kg i.v.) + 이소형 대조군(2.5 mg/kg IV) 또는 항-4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 병용 투여하는 요법; B) 이식 후 3일차에 BSMUC16/CD3-001(1 mg/kg i.v.) + 항-4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 1회 병용 투여한 다음, 이식 후 7일차 및 10일차에 BSMUC16/CD3-001(1 mg/kg i.v.)을 투여하는 요법; C) 이식 후 3일차에 BSMUC16/CD3-001(1 mg/kg i.v.) 또는 CD3-결합 대조군(1 mg/kg i.v.) + 항-4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 1회 병용 투여하고 더 이상 치료하지 않는 요법. 표시된 데이터는 생존 중앙값이다. 복수로 인해 복부가 팽창하여 마우스의 체중이 30% 넘게 증가했을 때 마우스를 희생시켰다. 통계적 유의성은 Gehan-Breslow-Wilcoxon 방법을 사용하여 결정하였다. 통계 분석을 위해, 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\*\*  $p=0.002$ 는 BSMUC16/CD3-001에 대한 것이고, \*\*\*\*  $p<0.0001$ 은 BSMUC16/CD3-001과 항-4-1BB의 병용요법으로 이루어진 3개의 군에 대한 것임). 또한, 항-4-1BB와의 병용 요법이 BSMUC16/CD3-001 단독 요법에 비해 유의한 결과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, 모든 군을 이 군과 비교하였다(# $p=0.011$ 은 Gp4(CD3 이중특이적 3회 투여 + 항-4-1BB 3회 투여)에 대한 것이고, # $p=0.027$ 은 Gp5(CD3 이중특이적 3회 투여 + 항-4-1BB 1회 투여)에 대한 것이고, # $p=0.011$ 은 Gp7(CD3 이중 특이적 + 항-4-1BB 1회 병용 투여)에 대한 것임).

도 6은 시간 경과에 따른 체중 변화를 도시한다. 도 5에 도시된 바와 같이 BSMUC16/CD3-001 + 항-4-1BB의 상이한 투여량을 이용한 병용 치료는 투여 기간 동안 유의한 체중 감소를 전혀 유도하지 않았는데, 이를 독성에 대한 관독값으로서 사용되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0042] 본 발명을 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 하는데, 이는 이러한 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이다. 또한 본 개시의 범위는 첨부된 청구항에 의해서만 한정되므로 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술하기 위한 목적이며, 한정하는 것으로 의도되지 않음을 이해해야 한다.
- [0043] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당해 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 널리 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 설명에 사용된 용어 "약"은 인용된 특정 수치와 관련하여 사용될 때, 이러한 값이 인용된 값과 1% 이내에서 다를 수 있음을 의미한다. 예를 들어 본 설명에 사용된 바와 같이, 표현 "약 100"은 99와 101을 포함하고 그 사이의 모든 값(예를 들어, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.
- [0044] 본 개시에 기재된 방법 및 재료와 유사 또는 동등한 어떠한 방법 및 재료도 본 개시의 실시 또는 검사에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 재료를 지금부터 설명한다. 본 명세서에 언급된 모든 특허, 출원 및 비 특허 공개 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0045] 실시예에 나타난 바와 같이, MUC16xCD3 이중 특이적 항체는 여러 마우스 모델에서 난소 종양을 치료하는 데 효과적이었다. 그러나, 본 발명자들은 항-4-1BB 작용제를 사용해 공동 자극 신호를 제공함으로써 MUC16xCD3 유도 T 세포 활성을 강화시키고 이를 연장시키기 위해 노력하였다. 4-1BB 신호 전달 경로는 T 세포 생존을 촉진하고, T 세포 무기질을 역전시키고, 후속하여 기억 T 세포를 생성하여 강력한 항종양 활성화와 에피토프 확산을 촉진함으로써 T 세포 반응의 크기 및 지속시간을 향상시킬 수 있다.
- [0046] 본원에 나타난 바와 같이, MUC16xCD3 이중특이적 항체를 항-4-1BB 공동 자극과 병용하면 난소 종양에서 현저한 항종양 효능이 나타났다. 항종양 효과는 체중 감소가 없는 상태에서 관찰되었다. 이러한 병용은 종양-특이적 T 세포 기억을 유도하고 에피토프 확산을 개시하는 것으로도 나타났다. 이러한 병용은, 특히 이차 종양 유발을 억제함에 있어서 MUC16 항원의 존재 또는 이에 대한 반응과 상관없이, 항종양 반응을 생성하는 것으로도 나타났다.
- [0047] 항-MUC16 항체 및 MUC16xCD3 이중 특이적 항체와 4-1BB 공동 자극의 병용 요법의 능력을 T 세포 반응의 크기 및 지속시간을 향상시켜, 본원에서 입증된 바와 같은 현저한 항종양 효능을 유도한다. 항-MUC16 항체 또는 MUC16xCD3-이중 특이적 항체와 4-1BB 공동 자극의 병용은 종양을 치료하여 보다 양호한 전체 생존을 달성하는 방법에서 유용하다.
- [0048] **항원 결합 분자의 치료적 용도**
- [0049] 본 개시는, 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 CD3 및 MUC16에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 항-4-1BB 작용제와 함께 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 본원의 방법에 따라 유용한 치료 조성물은 항-MUC16 항체 또는 MUC16xCD3-이중 특이적 항원 결합 분자 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이를 필요로 하는 대상체"라는 표현은 암의 하나 이상의 증상 또는 징후를 나타내거나(예를 들어, 종양을 발현하거나, 아래 본원에 언급된 암 중 어느 하나를 앓고 있는 대상체), 달리 MUC16 활성화의 억제 또는 감소 또는 MUC16+ 세포(예: 난소암 세포)의 고갈로부터 혜택을 얻게 되는 인간 또는 비인간 동물을 의미한다.
- [0050] 본원에 개시된 항체 및 이중 특이적 항원 결합 분자(및 이를 포함하는 치료 조성물)는, 면역 반응의 자극, 활성화, 및/또는 표적화가 유의한 임의의 질환 또는 장애를 치료하기 위해 항-4-1BB 작용제와 병용했을 때 특히 유용하다. 특히, 항-4-1BB 작용제와 조합된 항-MUC16 항체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자는 MUC16의 발현과 관련이 있거나 이에 의해 매개되는 임의의 질환 또는 장애, 또는 MUC16+ 세포의 활성화 또는 증식과 관련이 있거나 이에 의해 매개되는 임의의 질환 또는 장애를 치료, 예방, 및/또는 완화시키는 데 사용될 수 있다. 본원에 개시된 치료 방법이 달성되는 작용 메커니즘은 효과기 세포의 존재 하에 MUC16를 발현하는 세포를, 예를 들어, CDC, 세포자멸사, ADCC, 식균작용에 의해, 또는 이들 메커니즘 중 둘 이상의 조합에 의해 살해하는 것을 포함한다. MUC16를 발현하는 세포로서, 항체 또는 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 억제

되거나 살해될 수 있는 세포는, 예를 들어 난소 종양 세포를 포함한다. 추가의 치료 효과는 4-1BB 공동 자극에 의해 달성되며, 이는 T 세포의 클론 증식, 생존, 및 발달에 대한 기여, 말초 단핵구에서의 증식 유도, NF-카파B를 활성화, TCR/CD3 유발 활성화에 의해 유도된 T 세포 세포자멸사의 강화, 및 기억 생성이 포함된다.

[0051] 항-MUC16 항체 및 항-MUC16/항-CD3 이중특이적 항체를 포함하는 항원 결합 분자는 항-4-1BB 작용제와 병용으로, 예를 들어, 난소암, 유방암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-종괴 형성 유형, 자궁 경부 선암종, 및 위관 선암종과 같은 원발성 및/또는 전이성 종양 및 염증성 장 질환, 간경화증, 심부전, 복막 감염증, 및 복부 수술을 포함하는 질환 및 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이중 특이적 항원 결합 분자는 다음 암 중 하나 이상을 치료하는 데 사용된다: 난소암, 유방암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-종괴 형성 유형, 자궁 경부 선암종, 및 위관 선암종. 본 개시의 특정 구현예에 따르면, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체는 항-4-1BB 작용제와 병용으로, 난소암 또는 유방암에 걸린 대상체를 치료하는 데 유용하다. 본원에 개시된 다른 관련 구현예에 따르면, 난소암 또는 유방암에 걸린 환자에게 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 항-4-1BB 작용제와 병용 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0052] 본 개시는 또한, 기억 반응 및/또는 에피토프 확산을 개시하는 방법을 포함한다. 본 개시는 또한, 예를 들어, 이차 종양 유발을 억제함에 있어서 MUC16 항원의 존재 또는 이에 대한 반응과 상관없이 항종양 반응을 생성하는 위한 방법을 포함한다.

[0053] 또한, 본 개시는 대상체에서 잔존 암을 치료하는 방법을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "잔존 암(residual cancer)"은 항암 요법으로 치료한 후 대상체에서 하나 이상의 암 세포가 존재하거나 지속되는 것을 의미한다.

[0054] 특정 양태에 따르면, 본 개시는 MUC16 발현과 관련이 있는 질환 또는 장애(예: 난소암)를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 대상체가 난소암을 가진 것으로 결정된 후에, 이 대상체에게 본원의 다른 곳에서 기술된 이중 특이적 항원 결합 분자 중 하나 이상을 항-4-1BB 작용제와 병용 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 개시는 난소암을 치료하는 방법을 포함하며, 상기 방법은, 대상체가 호르몬 요법(예: 항-안드로겐 요법)으로 치료받은 지 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주 또는 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 8개월, 1년 또는 그 이상 후에 이 환자에게 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0055] 정의

[0056] 본원에 사용된 "CD3"이라는 표현은, 다분자 T 세포 수용체(TCR)의 일부로서 T 세포에서 발현되는 항원으로서, 4개의 수용체 사슬(CD3-엡실론, CD3-델타, CD3-제타, 및 CD3-감마) 중 2개와 결합하여 형성된 동종이량체 또는 이종이량체로 이루어진 항원을 지칭한다. 본원의 단백질, 폴리펩티드 및 단백질 단편에 대한 모든 언급은, 비인간-종에서 유래된 것으로서 명시적으로 달리 명시되지 않는 한, 각각의 단백질, 폴리펩티드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 지칭하도록 의도된다. 따라서, "CD3"이란 표현은 비-인간 종에서 유래된 것, 예를 들어, "마우스 CD3", "원숭이 CD3" 등으로서 달리 명시되지 않는 한 인간 CD3을 의미한다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, "CD3에 결합하는 항체" 또는 "항-CD3 항체"는 단일 CD3 서브유닛(예를 들어, 엡실론, 델타, 감마, 또는 제타)을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 비롯하여, 2개의 CD3 서브유닛으로 이루어진 이량체 복합체(예를 들어, 감마/엡실론, 델타/엡실론, 및 제타/제타 CD3 이량체)를 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 본원에서 유용한 항체 및 항원 결합 단편은 가용성 CD3 및/또는 세포 표면 발현형 CD3에 결합할 수 있다. 가용성 CD3은 천연 CD3 단백질을 비롯하여 재조합 CD3 단백질 변이체, 예컨대, 막관통 도메인이 없거나 달리 세포막과 미결합된 단량체 또는 이량체 CD3 작제물을 포함한다.

[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포 표면 발현형 CD3"이란 표현은, CD3 단백질의 적어도 일부가 세포막의 세포외 측면에 노출되어 항체의 항원 결합 부분에 접근할 수 있도록 시험관 내에서 또는 생체 내에서 세포의 표면 상에서 발현되는 하나 이상의 CD3 단백질(들)을 의미한다. "세포 표면 발현형 CD3"은 세포막 내 기능적 T 세포 수용체의 맥락에 함유된 CD3 단백질을 포함한다. "세포 표면 발현형 CD3"이란 표현은 동종이량체 또는 이종이량체(예를 들어, 감마/엡실론, 델타/엡실론, 및 제타/제타 CD3 이량체)의 일부로서 세포 표면에서 발현된 CD3 단백질을 포함한다. "세포 표면 발현형 CD3"이란 표현은 세포의 표면에서 다른 CD3 사슬 유형 없이 저절로 발현되는 CD3 사슬(예를 들어, CD3-엡실론, CD3-델타, 또는 CD3-감마)을 포함한다. "세포 표면 발현형 CD3"은 정상적으로 CD3 단백질을 발현하는 세포의 표면에서 발현된 CD3 단백질을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 대안

적으로, "세포 표면 발현형 CD3"은 정상적으로는 그 표면에서 인간 CD3을 발현하지 않지만, 그 표면에서 CD3을 발현하도록 인공적으로 조작된 세포의 표면에서 발현된 CD3 단백질을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, "MUC16"이라는 표현은 암 항원 125(CA125)로도 알려진 뮤신 16을 지칭한다. MUC16은 단일 막관통 도메인을 갖는 거대 막 결합형 뮤신이다. 이러한 세포 표면 당단백질은 난소암에서 고도로 발현되며, 암세포 성장을 촉진하는 역할을 한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "MUC16에 결합하는 항체" 또는 "항-MUC16 항체"는 MUC16을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, CD137로도 알려진 "4-1BB"라는 표현은 활성화 유도 공동 자극 분자를 지칭한다. 4-1BB는 면역 반응의 중요한 조절자이며 TNF 수용체 상과의 구성원이다. "항-4-1BB 작용제"라는 표현은, 4-1BB에 결합하여 수용체를 활성화시키는 임의의 리간드이다. 예시적인 항-4-1BB 작용제는 우렐루맙(BMS-663513) 및 유토밀루맙(PF-05082566), 및 상업적으로 이용 가능한 항마우스 4-1BB 항체를 포함한다. 또한, "4-1BB 작용제"라는 용어는 4-1BB의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 촉진하고/하거나, 유도하고/하거나, 증가시키고/시키거나, 활성화하는 임의의 분자를 지칭한다. 적절한 작용제 분자는 구체적으로, 작용제 항체 또는 항체 단편을 포함하며, 이에는 이중 특이적 항체, 예를 들어, 면역 세포 상의 4-1BB에 결합하는 하나의 아암 및 예를 들어 종양 표적 상의 항원에 결합하는 다른 하나의 아암을 포함하는 이중 특이적 항체가 포함된다. 상기 용어는 천연 폴리펩티드, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 작은 유기 분자 등의 단편 또는 아미노산 서열 변이체를 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제 존재 시의 활성화는 투여량 의존적 방식으로 관찰된다. 일부 구현예에서, 측정된 신호(예: 생물학적 활성)은 비슷한 조건 하에 음성 대조군으로 측정된 신호보다 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 100%보다 더 높다. 작용제의 효능(efficacy), 예컨대 폴리펩티드의 기능을 활성화하거나 촉진하는 작용제의 능력은 기능적 검정을 사용하여 결정될 수도 있다. 예를 들어, 기능적 검정은 폴리펩티드를 후보 작용제 분자와 접촉시키는 단계; 및 일반적으로 폴리펩티드와 연관된 하나 이상의 생물학적 활성의 검출 가능한 변화를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 작용제의 역가(potency)는 일반적으로 이의 EC<sub>50</sub> 값(작용제 반응의 50%를 활성화하는 데 필요한 농도)에 의해 정의된다. EC<sub>50</sub> 값이 낮을수록 작용제의 역가가 더 크고, 최대 생물학적 반응을 활성화하는 데 필요한 농도가 더 낮다. 4-1BB 작용제는 4-1BB-리간드 또는 4-1BB-리간드의 단편을 함유하는 분자, 예를 들어, 4-1BBL 또는 이의 단편을 함유하는 하나의 아암 및, 예를 들어, 종양 상의 항원에 결합하는 다른 하나의 아암을 포함하는 이중 특이적 분자를 포함할 수도 있다. 이들 단편은 Fc 영역을 포함할 수 있다.

[0061] 용어 "항원 결합 분자"는 항체 및 예를 들어, 이중 특이적 항체를 포함하는 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 항원(예컨대 MUC16 또는 CD3)과 특이적으로 결합하거나 상호 작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 임의의 항원 결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이의 다량체(예를 들어, IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V<sub>H</sub>로 약칭됨)과 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V<sub>L</sub>로 약칭됨)과 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인을 포함한다(C<sub>L</sub>1). V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub> 영역은, 더 보존적인 영역(프레임워크 영역(FR)으로 지칭됨)이 중간에 끼어 있는 추가 변 영역(상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭됨)으로 추가로 세분화될 수 있다. 각각의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>는 아미노 말단에서 카르복시 말단의 방향으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본원에 기술된 다른 구현예에서, 항-MUC16 항체 또는 항-CD3 항체의 FR(또는 이들 항체의 항원 결합 부분)은 인간 생식선 서열과 동일하거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통 서열은 둘 이상의 CDR의 병렬 분석에 기초하여 정의될 수 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 전체 항체 분자의 항원 결합 단편을 또한 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연적인, 또는 효소에 의해 수득할 수 있는, 또는 합성, 또는 유전자 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은 임의의 적합한 표준 기법, 예를 들어, 단백질 가수분해성 소화 또는 항체 가변 도메인 및 임의로 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 재조합 유전자 조작 기법을 사용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어 상

업적인 공급원, (예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함하는) DNA 라이브러리로부터 쉽게 이용할 수 있거나, 합성될 수 있다. 이러한 DNA는 서열화될 수 있고, 예를 들면 하나 또는 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적당한 구성으로 배열하기 위해, 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하며, 아미노산을 변형, 첨가 또는 결실시키기 위해서 등, 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0064] 항원 결합 단편의 비제한적 실시예는: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 추가 변 영역(예를 들어, CDR3 펩티드와 같은 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기, 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드로 이루어진 최소 인지 단위를 포함한다. 다른 조작된 분자, 예를 들어, 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실 항체, 키메라 항체, CDR-이식 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예를 들어, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 작은 모듈형 면역치료제(SMIP), 및 상어 가변 IgNAR 도메인 등도 본원에서 사용되는 "항원 결합 단편"이란 표현에 포함된다.

[0065] 항체의 항원 결합 단편은 일반적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함하게 된다. 이러한 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 그것과 한 프레임에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V<sub>L</sub> 도메인과 결합된 V<sub>H</sub> 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인은 임의의 적절한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체로서, V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub> V<sub>L</sub> 또는 V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> 이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인을 포함할 수 있다.

[0066] 특정 구현예에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 결합된 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 본원에서 유용한 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적 구성은 다음을 포함한다: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; 및 (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. 위에서 열거된 임의의 예시적인 구성을 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 이러한 가변 및 불변 도메인은 직접적으로 상호간에 연결되거나 또는 전체 또는 부분적인 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩티드 분자의 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 또는 반 가요성 연결을 초래하는 적어도 2개(예를 들어, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, 본원에서 유용한 항체의 항원 결합 단편은 위에서 열거된 가변 및 불변 도메인 구성 중 어느 하나의 동중-이량체 또는 이중-이량체(또는 다른 다량체)를 포함할 수 있으며, 이들은 (예를 들어, 이황화 결합(들)에 의해) 서로 비공유 결합되고/되거나, 하나 이상의 단량체 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인과 비공유 결합된다.

[0067] 완전 항체 분자와 마찬가지로, 항원 결합 단편은 단일 특이적이거나 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적)일 수 있다. 항체의 다중 특이적 항원 결합 단편은 일반적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함하게 되며, 여기에서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원에 특이적으로 결합할 수 있거나 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 개시된 예시적인 이중 특이적 항체 포맷을 포함하여, 임의의 다중 특이적 항체 포맷은 당업계에서 이용할 수 있는 일상적인 기술을 사용하여 본원에서 유용한 항체의 항원 결합 단편의 맥락에서 사용하기에 적합할 수 있다.

[0068] 본원에서 유용한 항체는 보체 의존성 세포독성(CDC) 또는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 통해 기능할 수 있다. "보체-의존성 세포독성"(CDC)은 보체의 존재 하에 본원에 개시된 항체에 의해 항원-발현 세포가 용해되는 것을 지칭한다. "항체-의존성 세포-매개 세포독성"(ADCC)은 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포 상에서 결합된 항체를 인식하여 표적 세포의 용해를 유도하는 세포-매개 반응을 지칭한다. CDC 및 ADCC는 당업계에 공지되어 있고 이용 가능한 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 제5,500,362호 및 제5,821,337호, 및 Clynes 외, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656(1998) 참조) 항체의 불변 영역은 보체를 고정하고 세포 의존적 세포독성을 매개하는 항체의 능력에 있어서 중요하다. 따라서, 항체의 이소형은 항체가 세포독성을 매개하는 것이 바람직한지 여부를 기준으로 선택될 수 있다.

[0069] 특정 구현예에서, 본원에서 유용한 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로블린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는

항체를 포함하도록 의도된다. 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내 체세포성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를, 예를 들어 CDR에 포함할 수 있고, 특히 CDR3에 포함할 수 있다. 그러나 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유류 중, 예를 들면 마우스의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 위로 그래프트되어 있는 항체를 포함하도록 의도되지는 않는다.

[0070] 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 항체는 일부 구현예에서, 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 인간 항체, 예를 들어 숙주 세포 안에 형질전환된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 재조합된 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자가 도입된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체(예를 들어, Taylor 외, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295(1992) 참조) 또는 다른 DNA 서열에 대해 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체를 포함하고자 한 것이다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 일부 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 유전자 도입된 동물이 사용되는 경우에서의, 생체 내 체세포성 돌연변이 유발)을 거치므로, 재조합 항체의  $V_H$  및  $V_L$  영역의 아미노산 서열은 인간 생식선  $V_H$  및  $V_L$  서열로부터 유래되고 이들과 관련되지만, 생체 내에서 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0071] 인간 항체는 한지 비균질성과 연관된 2가지 형태로 존재할 수 있다. 제1 형태로, 면역글로불린 분자는 대략 150~160 kDa의 안정적인 4쇄 작체물을 포함하며, 여기에서 이량체는 사슬 간 중쇄 이황화 결합에 의해 함께 유지된다. 제2 형태에서, 이량체는 사슬 간 이황화 결합을 통해 연결되지 않으며, 공유 결합된 경쇄 및 중쇄(반수 항체)로 구성된 약 75~80 kDa의 분자가 형성된다. 이러한 형태는 친화성 정제 후에도 분리하기가 매우 어렵다.

[0072] 다양한 온전한 IgG 이소형에서 제2 형태의 출현 빈도는 항체의 한지 영역 이소형과 관련된 구조적 차이로 인한 것이지만, 이에 한정되지는 않는다. 인간 IgG4 한지의 한지 영역에서의 단일 아미노산 치환은 인간 IgG1 한지를 사용하여 전형적으로 관찰되는 수준으로 제2 형태의 외관을 상당히 감소시킬 수 있다(Angal 외, Molecular Immunology 30:105(1993)). 본 개시는 한지,  $C_H2$  또는  $C_H3$  영역에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 항체를 포함하며, 이는 예를 들어 생산에서 원하는 항체 형태의 수율을 개선하는 데 바람직할 수 있다.

[0073] 본원에서 유용한 항체는 단리된 항체일 수 있다. 본원에서 사용되는 "단리된 항체"는 이의 자연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 식별되어 분리되었고/되었거나 회수된 항체를 의미한다. 예를 들어, 유기체의 적어도 하나의 성분으로부터 분리 또는 제거된 항체, 또는 항체가 자연적으로 존재하거나 자연적으로 생산되는 조직이나 세포로부터 분리 또는 제거된 항체가 본 개시의 목적에 맞는 "단리된 항체"이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 인 시튜(in situ) 항체 또한 포함한다. 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 또는 단리 단계를 거친 항체이다. 특정 구현예에 따르면, 단리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질을 실질적으로 갖지 않을 수 있다.

[0074] 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 항-MUC16 항체 및 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체는, 항체가 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교했을 때 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본원에 개시된 아미노산 서열을, 예를 들어, 공개된 항체 서열 데이터베이스로부터 이용할 수 있는 생식선 서열과 비교함으로써 쉽게 확인할 수 있다. 본 개시는 본원에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 유래된 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하되, 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식계열 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 또 다른 인간 생식계열 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 상응하는 생식계열 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이될 수 있다(이러한 서열 변화는 본원에서 "생식계열 돌연변이"로서 통칭한다). 당업자는, 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에서 출발하여, 하나 이상의 개별 생식선 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 다수의 항체 및 항원 결합 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 특정 구현예에서,  $V_H$  및/또는  $V_L$  도메인 내의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기의 전부는, 항체가 유래된 원래의 생식선 서열에서 발견되는 잔기로 다시 돌연변이 된다. 다른 구현예에서, 특정한 잔기만이, 예를 들어, FR1의 처음 8개의 아미노산 또는 FR4의 마지막 8개의 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 발견되는 돌연변이된 잔기만이 원래의 생식선 서열로 다시 돌연변이 된다. 다른 구현예에서, 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들) 중 하나 이상은 상이한 생식선 서열(예를 들어, 항체가 유래된 원래의 생식선 서열과 상이한 생식선 서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이 된다. 또한, 본원에서 유용한 항체는 프레임워크 및

/또는 CDR 영역 내의 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 함유할 수 있는데, 예를 들어, 특정 개별 잔기는 특정 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이 되는 반면, 원래의 생식선 서열과 상이한 특정한 다른 잔기는 유지되거나, 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이 된다. 일단 획득되면, 하나 이상의 생식선 돌연변이를 포함하는 항체 및 항원 결합 단편은, 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화도, 개선되거나 강화된 길항성 또는 작용성 생물학적 특성(경우에 따라), 감소된 면역원성 등과 같은 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 시험될 수 있다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 항체 및 항원 결합 단편은 본 개시에 포함된다.

[0075] 본원에서 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나의 변이체를 포함하는 항-MUC16 항체 및 항-MUC16/항-CD3 항체이다. 예를 들어, 본 개시는 본원의 표 1에 제시된 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열 중 어느 하나에 비해, 예를 들어, 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-MUC16 항체 및 항-MUC16/항-CD3 항체를 포함한다.

[0076] 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특이적 항원 결합 부위와 상호 작용하는 항원 결정자를 지칭한다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체는 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효능을 가질 수 있다. 에피토프는 입체적이거나 선형일 수 있다. 입체적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 상이한 분절에서 유래된 공간적으로 병치된 아미노산에 의해 생산된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬 내 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성된 것이다. 특정 상황에서, 에피토프는 항원 상에 당류, 포스포릴기, 또는 술폰닐기의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0077] 핵산 또는 이의 단편을 지칭할 때의 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"이란 용어는, 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실을 또 다른 핵산(또는 이의 상보성 가닥)과 최적으로 정렬한 경우, 후술한 바와 같은 임의의 알려진 서열 동일성 알고리즘(예: FASTA, BLAST 또는 Gap)에 의해 측정했을 때 뉴클레오티드 염기의 적어도 95%, 더 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%에서 뉴클레오티드 서열 동일성이 있음을 나타낸다. 기준 핵산 분자에 대한 실질적 동일성을 갖는 핵산 분자는, 특정 경우, 기준 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다.

[0078] 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, 용어 "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은, 예를 들어, 디폴트 갭 가중치를 사용하는 GAP 또는 BESTFIT 프로그램에 의해 최적으로 정렬되었을 때, 2개의 펩티드 서열이 적어도 95% 서열 동일성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환만큼 상이하다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환만큼 서로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사성의 정도는 상향으로 조정되어 치환의 보존적 성질을 보정할 수 있다. 이러한 조정을 만드는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 Pearson의 문헌[(1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331] 참조. 화학적 성질이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; (2) 지방족-히드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌, 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파르트산염 및 글루탐산염; 및 (7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐산염-아스파르트산염, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 치환은 본원에 참조로서 통합된 Gonnet 등의 문헌[(1992) *Science* 256: 1443-1445]에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "적당한 보존적" 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음의 값을 갖는 임의의 변화이다.

[0079] 서열 동일성으로도 지칭되는, 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 일반적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용해 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 배정된 유사성 측정치를 사용하여 유사한 서열들을 대조한다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는, 상이한 중의 유기체 유래의 상동성 폴리펩티드와 같은 밀접하게 연관된 폴리펩티드 간의 서열 상동성이나 서열 동일성, 또는 야생형 단백질과 이의 뮤테인 사이의 서열 상동성이나 서열 동일성을 결정하기 위한 디폴트 파라미터와 함께 사용될 수 있는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램을 포함한다. 예를 들어, GCG 버전 6.1을 참조한다. 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 FASTA를 사용해, 디폴트 파라미터 또는 권장 파라미터를 사용해 비교할 수도 있다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리 및 검색 서열 사이의 가장 중첩된 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(전술한 Pearson(2000) 참조). 상이한 유기체 유래의 다수의 서열이 포함된 데이터베이스와 본

원에 개시된 서열을 비교할 때 바람직한 또 다른 알고리즘은 디폴트 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램인 BLAST, 구체적으로는 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, Altschul 등의 문헌[(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410] 및 Altschul 등의 문헌[(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402]을 참조하고, 이들 각각은 참조로서 본원에 통합된다.

**[0080] 서열 변이체**

**[0081]** 본원에서 유용한 항체 및 이중 특이적 항체는, 항체가 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교했을 때 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다.

**[0082]** 또한, 본원에서 유용한 것은 본원에 개시된 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 유래되고 검출 가능한 항원 결합이 약하거나 없는 항체 및 이의 항원 결합 단편인데, 여기서 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식선 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 또 다른 인간 생식선 서열의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이되거나, 상응하는 생식선 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이될 수 있다(이러한 서열 변화는 본원에서 "생식선 돌연변이"로서 통칭함).

**[0083]** 또한, 본원에서 유용한 항체는 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 함유할 수 있는데, 예를 들어, 특정 개별 잔기는 특정 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이 되는 반면, 원래의 생식선 서열과 상이한 특정한 다른 잔기는 유지되거나, 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단 획득되면, 하나 이상의 생식계열 돌연변이를 포함하는 항체 및 항원 결합 단편을 하나 이상의 바람직한 특성, 예컨대, 개선된 결합 특이성, 약하거나 감소된 결합 친화도, 개선되거나 강화된 약동학적 특성, 감소된 면역원성 등에 대해 쉽게 시험할 수 있다. 본 개시의 지침이 주어진 이러한 일반적인 방식으로 수득된 항체 및 항원 결합 단편은 본 발명에 포함된다.

**[0084]** 본 개시에 따라 유용한 것은, 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본원에서 제공된 HCVR 또는 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나의 변이체를 포함하는 항체 및 이중 특이적 항체이다. 본원에서 유용한 항체 및 이중 특이적 항원 결합 분자는, 개별 항원 결합 도메인이 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교했을 때, 원하는 항원 결합 특성을 유지하거나 개선하면서 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 성질을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 화학적 성질이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; (2) 지방족-히드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌, 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파르트산염 및 글루탐산염; 및 (7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐산염-아스파르트산염, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 치환은 Gonnet 등의 문헌에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다(예: Gonnet 등의 문헌[(1992) Science 256: 1443-1445 참조]. "적당한 보존적" 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음의 값을 갖는 임의의 변화이다.

**[0085]** 본 개시는, 원하는 항원 친화도를 유지하거나 개선하면서, 본원에 개시된 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 또한 포함한다. 아미노산 서열을 언급할 때의 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"이란 용어는, 예컨대 디폴트 갭 가중치(default gap weight)를 사용해 GAP 또는 BESTFIT 프로그램으로 2개의 아미노산 서열을 최적으로 정렬했을 때, 이들 아미노산 서열이 적어도 95%의 서열 동일성, 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환만큼 상이하다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환만큼 서로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사성의 정도는 상향으로 조정되어 치환의 보존적 성질을 보정할 수 있다. 이러한 조정을 만드는 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 Pearson의 문헌[(1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331] 참조.

**[0086]** 서열 동일성으로도 지칭되는, 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 일반적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용해 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 배정된 유사성 측정치를 사용하여 유사한 서열들을 대조한다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는, 상이한 중의 유기체 유래의 상동성 폴리펩티드와 같은 밀접하게 연관된 폴리펩티드 간의 서열 상동성이나 서열 동일성, 또는 야생형 단

백질과 이의 뮤테인 사이의 서열 상동성이나 서열 동일성을 결정하기 위한 디폴트 파라미터와 함께 사용될 수 있는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램을 포함한다. 예를 들어, GCG 버전 6.1을 참조한다. 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 FASTA를 사용해, 디폴트 파라미터 또는 권장 파라미터를 사용해 비교할 수도 있다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리 및 검색 서열 사이의 가장 중첩된 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(전술한 Pearson(2000) 참조). 상이한 유기체 유래의 다수의 서열이 포함된 데이터베이스와 본원에 개시된 서열을 비교할 때 바람직한 또 다른 알고리즘은 디폴트 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램인 BLAST, 구체적으로는 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, Altschul 등의 문헌[(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410] 및 Altschul 등의 문헌[(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402] 참조.

[0087] 하나 이상의 생식선 돌연변이를 함유하는 항원 결합 도메인을 수득한 후, 이들을 하나 이상의 시험관내 검정을 사용하여 결합 친화도 감소에 대해 시험하였다. 특정 항원을 인식하는 항체는 항원에 대한 높은(즉, 강한) 결합 친화도를 시험함으로써 일반적으로 그 목적을 맞게 스크리닝되지만, 본원에서 유용한 항체는 약한 결합을 나타내거나 검출 가능한 결합을 나타내지 않는다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자가 본 개시에 포함되며, 결합력-유도 중앙 요법으로서 유리한 것으로 밝혀졌다.

[0088] 개선된 약동학적 특성 및 환자에 대한 낮은 독성과 같은 예상하지 못한 이점이 본원에 기술된 방법에 의해 실현될 수 있다.

[0089] **항체의 결합 특성**

[0090] 본원에서 사용되는 바와 같이, 예를 들어, 소정의 항원(예: 세포 표면 단백질 또는 이의 단편)에 대한 항체, 면역글로불린, 항체 결합 단편, 또는 Fc-함유 단백질의 결합의 맥락에서 "결합(binding)"이라는 용어는 최소 2개의 엔티티 또는 분자 구조 간의 상호작용 또는 결합, 예컨대 항체-항원 상호작용을 일반적으로 지칭한다.

[0091] 예를 들어, 결합 친화도는 항원을 리간드로서 사용하고 항체, Ig, 항체 결합 단편, 또는 Fc-함유 단백질을 분석물(또는 항-리간드)로서 사용해, 예를 들어, BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술로 결정했을 때, 약  $10^{-7}$  M 이하, 예컨대 약  $10^{-8}$  M 이하, 예컨대 약  $10^{-9}$  M 이하의  $K_D$  값에 상응한다. 형광 활성화 세포 분류(FACS) 결합 검정과 같은 세포 기반 결합 전략도 일상적으로 사용되며, FACS 데이터는 방사성 리간드 경쟁 결합 및 SPR과 같은 다른 방법과 잘 상관된다(Benedict, CA의 문헌[J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31]; Geuijen, CA 등의 문헌[J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77]).

[0092] 따라서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단백질은 비특이적 항원(예: BSA, 카제인)에 결합하기 위한 친화도 보다 적어도 10배 더 낮은  $K_D$  값에 상응하는 친화도를 갖는 소정의 항원 또는 세포 표면 분자(수용체)에 결합한다. 본 개시에 따르면, 비특이적 항원보다 10배 이하인  $K_D$  값에 상응하는 항체의 친화도는 검출 불가능한 결합으로 간주될 수 있지만, 이러한 항체는 본원에 개시된 이중 특이적 항체의 생산을 위해 제2 항원 결합 아암과 쌍을 이룰 수 있다.

[0093] 용어 " $K_D$ "(M)는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수, 또는 항원에 결합하는 항체 또는 항체-결합 단편의 평형 해리 상수를 지칭한다.  $K_D$ 와 결합 친화도 사이에는 역관계가 존재하므로,  $K_D$  값이 작을수록 친화도가 높아진다(강해진다). 따라서, "더 높은 친화도" 또는 "더 강한 친화도"란 용어는 상호작용을 형성하는 더 높은 능력, 따라서 더 작은  $K_D$  값에 관한 것이고; 반대로 "더 낮은 친화도" 또는 "더 약한 친화도"란 용어는 상호작용을 형성하는 더 낮은 능력, 따라서 더 큰  $K_D$  값에 관한 것이다. 일부 경우에, 특정 분자(예: 항체)의 또 다른 상호작용 파트너 분자(예: 항원 Y)에 대한 결합 친화도(또는  $K_D$ )와 비교했을 때 동 분자(예: 항체)의 이의 상호작용 파트너 분자(예: 항원 X)에 대한 더 높은 결합 친화도는 더 큰  $K_D$  값(더 낮거나, 더 약한 친화도)을 더 작은  $K_D$ (도 높거나, 더 강한 친화도) 나누어서 결정된 결합비로서 표현될 수 있으며, 경우에 따라, 예를 들어 5배 또는 10배 더 큰 결합 친화도로서 표현될 수 있다.

[0094] 용어 " $k_d$ "( $\text{sec}^{-1}$  또는 1/s)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수, 또는 항체 또는 항체-결합 단편의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은  $k_{off}$  값으로도 지칭된다.

- [0095] 용어 " $k_a$ " ( $M^{-1} \times sec^{-1}$  또는  $1/M$ )는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도 상수, 또는 항체 또는 항체-결합 단편의 결합 속도 상수를 지칭한다.
- [0096] 용어 " $K_A$ " ( $M^{-1}$  또는  $1/M$ )는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 평형 상수, 또는 항체 또는 항체-결합 단편의 결합 평형 상수를 지칭한다. 결합 평형 상수는  $k_3$ 를  $k_4$ 로 나누어서 구한다.
- [0097] 용어 "EC50" 또는 "EC<sub>50</sub>"은 반수 최대 유효 농도를 지칭하며, 베이스라인과 특정 노출 시간 후 최대 반응의 절반에 해당하는 반응을 유도하는 항체 농도를 포함한다. EC<sub>50</sub>은 본질적으로 항체의 최대 효과의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 나타낸다. 특정 구현예에서, EC<sub>50</sub> 값은, 예를 들어, FACS 결합 분석에 의해 결정했을 때, CD3 또는 종양 관련 항원을 발현하는 세포에 대한 본원에 개시된 항체의 최대 결합의 절반을 제공하는 농도와 동일하다. 따라서, EC<sub>50</sub> 또는 반수 최대 유효 농도 값이 증가하면 감소되거나 더 약한 결합이 관찰된다.
- [0098] 일 구현예에서, 결합 감소는 반수 최대량으로 표적 세포에 결합할 수 있게 하는 EC<sub>50</sub> 항체 농도의 증가로서 정의될 수 있다.
- [0099] 또 다른 구현예에서, EC<sub>50</sub> 값은 T 세포 세포독성 활성화에 의해 표적 세포의 반수 최대 고갈을 유도하는 항체의 농도를 나타낸다. 따라서, 세포독성 활성화(예: T 세포 매개 종양 세포 살해)의 증가는 EC<sub>50</sub> 또는 반수 최대 유효 농도 값이 감소할 때 관찰된다.
- [0100] **이중 특이적 항원 결합 분자**
- [0101] 본원에서 유용한 항체는 단일 특이적, 이중 특이적, 또는 다중 특이적일 수 있다. 다중 특이적 항체는 하나의 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 특이적이거나 둘 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원 결합 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어, Tutt 등의 문헌[1991, J. Immunol. 147:60-69]; Kufer 등의 문헌[2004, Trends Biotechnol. 22:238-244] 참조. 본원에서 유용한 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체는 또 다른 기능성 분자, 예를 들어 또 다른 펩티드 또는 단백질에 연결되거나 이와 공동-발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 (예를 들어, 화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합에 의하거나 그 외의 방법으로) 하나 이상의 다른 분자 엔티티, 예컨대 또 다른 항체 또는 항체 단편에 연결되어 제2 또는 추가의 결합 특이성을 갖는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 생산할 수 있다.
- [0102] 본원에서 "항-CD3 항체" 또는 "항-MUC16 항체"라는 표현의 사용은 단일 특이적 항-CD3 또는 항-MUC16 항체 둘 다를 비롯하여, CD3-결합 아암 및 MUC16-결합 아암을 포함하는 이중 특이적 항체도 포함하도록 의도된다. 따라서, 본 개시는 MUC16에 결합하는 단일 특이적 항체, 예를 들어, U.S. 2018/0112001에 기술된 항-MUC16 항체를 포함한다. 예시적인 항-MUC16 항체는 U.S. 2018/0112001에 개시된 것과 같이 H1H8767P 항체 및 H1H8767P 항체 내에 CDR을 포함하는 항체를 포함한다. 또한, 본 개시는 면역글로불린의 하나의 아암이 인간 CD3에 결합하고 면역글로불린의 다른 하나의 아암은 인간 MUC16에 특이적인 이중 특이적 항체를 포함한다. 본원에 제공된 방법에 따라 유용한 이중 특이적 항체의 예시적인 서열은 표 1에 나타나 있다.
- [0103] 특정 구현예에서, CD3-결합 아암은 인간 CD3에 결합하여 인간 T 세포 활성화를 유도한다. 특정 구현예에서, CD3-결합 아암은 인간 CD3에 약하게 결합하여 인간 T 세포 활성화를 유도한다. 다른 구현예에서, CD3-결합 아암은 인간 CD3에 약하게 결합하여, 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체의 맥락에서 종양 관련 항원 발현 세포 살해를 유도한다. 다른 구현예에서, CD3-결합 아암은 인간 및 시노몰구스 (원숭이) CD3에 약하게 결합하지만, 결합 상호작용은 당업계에 공지된 시험관 내 검정로는 아직까지 검출할 수 없다.
- [0104] 특정 예시적인 구현예에 따르면, 본 개시는 CD3 및 MUC16에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 이러한 분자는, 예를 들어, "항-CD3/항-MUC16", 또는 "항-CD3xMUC16" 또는 "CD3xMUC16" 이중 특이적 분자, 또는 다른 유사한 용어(예: 항-MUC16/항-CD3)로서 본원에서 지칭될 수 있다.
- [0105] 본원에서 사용되는 용어 "MUC16"는 비인간 종으로부터 유래된 것(예를 들어, "마우스 MUC16", "원숭이 MUC16" 등)으로 명시되지 않는 한 인간 MUC16 단백질을 지칭한다.
- [0106] CD3 및 MUC16에 특이적으로 결합하는 전술한 이중 특이적 항원 결합 분자는 시험관 내 친화도 결합 검정에 의해 측정했을 때 약한 결합 친화도로, 예컨대 약 40 nM 초과의  $K_D$ 를 나타내는 결합 친화도로 CD3에 결합하는 항-CD3

항원 결합 분자를 포함할 수 있다.

- [0107] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항원 결합 분자"라는 표현은 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하거나 이로 이루어지는 단백질, 폴리펩티드, 또는 분자 복합체를 의미하며, 여기서 상기 적어도 하나의 상보성 결정 영역은 단독으로, 또는 하나 이상의 추가 CDR 및/또는 프레임워크 영역(FR)과 함께 특정 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 항체의 단편이며, 이러한 용어들은 본원의 다른 곳에서 정의된다.
- [0108] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중 특이적 항원 결합 분자"라는 표현은 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질, 폴리펩티드, 또는 분자 복합체를 의미한다. 이중 특이적 항원 결합 분자 내의 각각의 항원 결합 도메인은, 단독으로 또는 하나 이상의 추가 CDR 및/또는 FR과 함께 특정 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 본 개시의 맥락에서, 제1 항원 결합 도메인은 제1 항원(예: CD3)에 특이적으로 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 구별되는 제2 항원(예: MUC16)에 특이적으로 결합한다.
- [0109] 특정 예시적인 구현예에서, 이중 특이적 결합 분자는 이중 특이적 항체이다. 이중 특이적 항체의 각 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 도메인(HCVR) 및 경쇄 가변 도메인(LCVR)을 포함한다. 제1 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 이중 특이적 항체)의 맥락에서, 제1 항원 결합 도메인의 CDR은 접두어 "A1"와 함께 지정될 수 있고, 제2 항원 결합 도메인의 CDR은 접두어 "A2"와 함께 지정될 수 있다. 따라서, 제1 항원 결합 도메인의 CDR은 본원에서 A1-HCDR1, A1-HCDR2, 및 A1-HCDR3로 지칭될 수 있고; 제2 항원 결합 도메인의 CDR은 본원에서 A2-HCDR1, A2-HCDR2, 및 A2-HCDR3로 지칭될 수 있다.
- [0110] 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 직접적으로 또는 간접적으로 서로 연결되어 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성할 수 있다. 대안적으로, 제1 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 각각 별도의 다량체화 도메인에 연결될 수 있다. 하나의 다량체화 도메인과 또 다른 다량체화 도메인을 결합시키면 2개의 항원 결합 도메인 간의 결합이 용이해져, 이중 특이적 항원 결합 분자가 형성된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "다량체화 도메인"은 동일하거나 유사한 구조 또는 구성의 제2 다량체화 도메인과 결합하는 능력이 있는 임의의 거대분자, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 아미노산이다. 예를 들어, 다량체화 도메인은 면역글로불린 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다량체화 도메인의 비제한적인 예는 (C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는) 면역글로불린의 Fc 부분, 예를 들어, 이소형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4뿐만 아니라 각 이소형 군 내의 임의의 알로타입(allo type)으로부터 선택된 IgG의 Fc 도메인이다.
- [0111] 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자는 일반적으로 2개의 다량체화 도메인, 예를 들어, 각각이 별개 항체 중쇄의 개별적으로 일부분인 2개의 Fc 도메인을 포함하게 된다. 제1 및 제2 다량체화 도메인은, 예를 들어, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4와 같은 동일한 IgG 이소형일 수 있다. 대안적으로, 제1 및 제2 다량체화 도메인은 예를 들어, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 등과 같은 상이한 IgG 이소형일 수 있다.
- [0112] 특정 구현예에서, 다량체화 도메인은 Fc 단편 또는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 함유하는 1개 내지 약 200개 아미노산 길이의 아미노산 서열이다. 다른 구현예에서, 다량체화 도메인은 시스테인 잔기, 또는 짧은 시스테인을 함유하는 펩티드이다. 다른 다량체화 도메인은 류신 지퍼, 나선-루프 모티프 또는 이중 코일 모티프를 포함하거나 이들로 구성된 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0113] 임의의 이중 특이적 항체 포맷 또는 기술을 사용하여 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자를 제조할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 (예를 들어, 화학적 결합, 유전자 융합, 비공유 결합 또는 다른 것에 의해) 하나 이상의 다른 분자 엔티티, 예컨대, 제2 항원 결합 특이성을 갖는 또 다른 항체 또는 항체 단편에 기능적으로 연결되어 이중 특이적 항원 결합 분자를 생산할 수 있다. 본 개시의 맥락에서 사용될 수 있는 특정 예시적인 이중 특이적 포맷은 예를 들어, scFv-기반 또는 디아바디 이중 특이적 포맷, IgG-scFv 융합체, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, 콰드로마, knob-into-holes(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예를 들어, knob-into-holes를 가지는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)바디, 류신 지퍼, 듀오바디, IgG1/IgG2, 이중 작용 Fab (DAF)-IgG, 및 Mab<sup>2</sup> 이중 특이적 포맷을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다(전술한 포맷에 대한 검토는 예를 들어, Klein 등의 문헌[2012, mAbs 4:6, 1-11], 및 동 문헌에 인용된 참고문헌을 참조한다).
- [0114] 본원에 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자의 맥락에서, 다량체화 도메인(예: Fc 도메인)은 Fc 도메인의 자연 발생 버전인 야생형과 비교했을 때 하나 이상의 아미노산 변화(예: 삽입, 결실, 또는 치환)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시는 Fc 도메인에서 하나 이상의 변형을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하며, 이러한 변형은 Fc 도메인을 변형시켜 Fc와 FcRn 사이에서 변형된 결합 상호작용(예를 들어, 강화 또는 감소)을 야

기한다. 일 구현예에서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 C<sub>H</sub>2 또는 C<sub>H</sub>3 영역에서 변형을 포함하며, 변형은 산성 환경(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 약 6.0인 엔도솜)에서 FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는, 예를 들어, 위치 250(예: E 또는 Q)에서의 변형; 250 및 428(예: L 또는 F)에서의 변형; 252(예: L/Y/F/W 또는 T), 254(예: S 또는 T), 및 256(예: S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예: L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예: H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예: 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 일 구현예에서, 변형은 428L(예: M428L) 및 434S(예: N434S) 변형; 428L, 259I(예: V259I), 및 308F(예: V308F) 변형; 433K(예: H433K) 및 434(예: 434Y) 변형; 252, 254, 및 256(예: 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예: T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예: 308F 또는 308P)을 포함한다.

[0115] 본 개시는 또한, 제1 Ig C<sub>H</sub>3 도메인 및 제2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하며, 제1 및 제2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 적어도 하나의 아미노산만큼 서로 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는, 아미노산 차이가 없는 이중 특이적 항체와 비교해, 단백질 A에 대한 이중 특이적 항체의 결합을 감소시킨다. 일 구현예에서, 제1 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 단백질 A에 결합하고, 제2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R임)과 같이 단백질 A 결합을 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 함유한다. 제2 C<sub>H</sub>3은 Y96F 변형(IMGT 넘버링에 의함; EU 넘버링은 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 8,586,713호를 참조한다. 제2 C<sub>H</sub>3에서 발견할 수 있는 추가의 변형은 다음을 포함한다: IgG1 항체의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 항체의 경우 N44S, K52N 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 항체의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT에 의함; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I).

[0116] 특정 구현예에서, Fc 도메인은 둘 이상의 면역글로불린 이소형으로부터 유래된 Fc 서열을 조합하는 키메라일 수 있다. 예를 들어, 키메라 Fc 도메인은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 C<sub>H</sub>2 영역 유래의 C<sub>H</sub>2 서열의 일부 또는 전부를 포함할 수 있고, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 유래의 C<sub>H</sub>3 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 키메라 Fc 도메인은 또한 키메라 힌지 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2, 또는 인간 IgG4 힌지 영역 유래의 "하부 힌지" 서열과 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2, 또는 인간 IgG4 힌지 영역 유래의 "상부 힌지" 서열을 포함할 수 있다. 본원에 제시된 항원 결합 분자 중 어느 하나에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 특정 실시예는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함한다: [IgG4 C<sub>H</sub>1] - [IgG4 상부 힌지] - [IgG2 하부 힌지] - [IgG4 CH2] - [IgG4 CH3]. 본원에 제시된 항원 결합 분자 중 어느 하나에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 또 다른 실시예는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음을 포함한다: [IgG1 C<sub>H</sub>1] - [IgG1 상부 힌지] - [IgG2 하부 힌지] - [IgG4 CH2] - [IgG1 CH3]. 본원에 유용한 임의의 항원 결합 분자 중 어느 하나에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 이런 저런 예시는 2014년 8월 28일에 공개된 미국 특허 공개 2014/0243504에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 이들 일반적인 구조적 배열을 갖는 키메라 Fc 도메인 및 이의 변이체는 변경된 Fc 수용체 결합을 가질 수 있고, 이는 결국 Fc 작동자 기능에 영향을 미친다.

[0117] **pH 의존성 결합**

[0118] 본 개시는 pH 의존성 결합 특성을 갖는 항-MUC16 항체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 예를 들어, 본원에 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자의 항-MUC16 아암은 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 MUC16에 대한 결합 감소를 나타낼 수 있다. 대안적으로, 본원에 유용한 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자는 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 MUC16에 대한 결합 강화를 나타낼 수 있다. "산성 pH"란 표현은 약 6.2 미만, 예를 들어, 약 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0, 또는 그 이하의 pH 값을 포함한다. 본 설명에서 사용된 표현 "중성 pH"는 약 7.0 내지 약 7.4의 pH를 의미한다. 표현 "중성 pH"는 약 7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35 및 7.4의 pH 값을 포함한다.

[0119] 특정 경우에, "중성 pH와 비교해 산성 pH에서엔에 대한 결합 감소"는, 산성 pH에서 이의 항원에 결합하는 항체의 K<sub>D</sub> 값 대 중성 pH에서 이의 항원에 결합하는 항체의 K<sub>D</sub> 값의 비(또는 그 반대의 비)로서 표현된다. 예를

들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약 3.0 이상의 산성  $K_D$ /중성  $K_D$  비를 나타내는 경우, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 개시의 목적을 위해 "중성 pH에 비해 산성 pH에서 MUC16에 대한 결합 감소"를 나타내는 것으로서 간주될 수 있다. 특정 예시적인 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 산성  $K_D$ /중성  $K_D$  비는 약 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0, 또는 그 이상일 수 있다.

[0120] pH-의존성 결합 특징을 나타내는 항체는, 예를 들면 중성 pH에 비해 산성 pH에서 특정 항원에 대한 결합이 감소된(또는 강화된) 항체 집단을 스크리닝함으로써 획득할 수 있다. 추가적으로, 아미노산 수준에서 항원 결합 도메인을 변형시켜 pH 의존적 특징을 갖는 항체를 획득할 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, CDR 내의) 항원 결합 도메인의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘 잔기로 치환함으로써, 중성 pH에 비해 산성 pH에서 항원 결합이 감소된 항체를 획득할 수 있다.

[0121] **Fc 변이체를 포함하는 항체**

[0122] 본원에서 유용한 특정 구현예에 따르면, 예를 들어 중성 pH에 비해 산성 pH에서 FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 강화시키거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-MUC16 항체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자가 제공된다. 예를 들어, 본 개시는 Fc 도메인의  $C_{H2}$  또는  $C_{H3}$  영역에서 돌연변이를 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 돌연변이(들)는 산성 환경에서(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 6.0 범위인 엔도솜에서) FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 돌연변이는, 동물에게 투여되는 경우 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는, 예를 들어, 위치 250(예: E 또는 Q)에서의 변형; 250 및 428(예: L 또는 F)에서의 변형; 252(예: L/Y/F/W 또는 T), 254(예: S 또는 T), 및 256(예: S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예: H/L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예: H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308(예: 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 일 구현예에서, 변형은 428L(예: M428L) 및 434S(예: N434S) 변형; 428L, 259I(예: V259I), 및 308F(예: V308F) 변형; 433K(예: H433K) 및 434(예: 434Y) 변형; 252, 254, 및 256(예: 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예: T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예: 308F 또는 308P)을 포함한다.

[0123] 예를 들어, 본 개시는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 하나 이상의 쌍 또는 군을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-MUC16 항체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다: 250Q 및 248L(예: T250Q 및 M248L); 252Y, 254T 및 256E(예: M252Y, S254T 및 T256E); 428L 및 434S(예: M428L 및 N434S); 및 433K 및 434F(예: H433K 및 N434F). 전술한 Fc 도메인 돌연변이 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이의 모든 가능한 조합은 본 개시의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0124] **이중 특이적 항원 결합 분자의 생물학적 특성**

[0125] 본 개시에 따라 유용한 것은, 높은 친화도로 (예를 들어, 나노몰 수준의  $K_D$  값으로) CD3-발현 인간 T 세포 및/또는 인간 MUC16에 결합하는 단일 특이적 및 이중 특이적 항체 및 이들의 항원 결합 단편이다. 이러한 항체 및 이들의 특성은 본원에 참조로서 통합된 U.S. 공개 제2018/0112001호에 개시되어 있다. 이러한 이중 특이적 항체는 종양 치료에 있어서 항-4-1BB 작용제와 병용 시 특히 유용하다.

[0126] 본원에서 유용한 것은, 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 나타내는 항-MUC16 항체 및 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자이다: (a) 인간 난소암 이종이식편을 가진 면역손상 마우스에서 종양 성장의 억제; (b) 인간 난소암 이종이식편을 가진 면역손상 마우스에서 확립된 종양의 종양 성장 억제(예를 들어, U.S. 공개 제2018/0112001호의 실시예 8 참조).

[0127] 본원에서 유용한 것은, 치료적 맥락 및 바람직한 특정 표적화 특성에 따라, 중간 또는 낮은 친화도로 인간 CD3에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편이다. 예를 들어, 하나의 아암이 CD3에 결합하고 다른 하나의 아암이 표적 항원(예: MUC16)에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자의 맥락에서, 표적 항원 결합 아암은 높은 친화도로 표적 항원에 결합하지만 항-CD3 아암은 중간 또는 낮은 친화도로만 CD3에 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 방식으로, 일반적인/표적화되지 않은 CD3 결합을 회피함으로써 이와 연관된 유해한 이상 반응을 결과적으로 회피하면서, 표적 항원을 발현하는 세포에 대한 항원 결합 분자의 우선적 표적화를 달성할 수 있다.

[0128] 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자(예: 이중 특이적 항체)는 인간 CD3 및 인간 MUC16에 동시에 결합

할 수 있다. CD3을 발현하는 세포와 상호작용하는 결합 아암은 적절한 시험관 내 결합 검정에서 측정했을 때 결합이 약하거나 검출되지 않을 수 있다. CD3 및/또는 MUC16을 발현하는 세포에 이중 특이적 항원 결합 분자가 결합하는 정도는 U.S. 2018/0112001의 실시예 5에서 예시된 바와 같이, 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 평가될 수 있다.

- [0129] 예를 들어, 본원에서 유용한 것은 이의 이중 특이적 항체로서, CD3을 발현하지만 MUC16를 발현하지 않는 인간 T 세포주, 예를 들어 Jurkat 및/또는 T 세포(예: 시노몰구스 말초 혈액 단핵 세포(PBMC))에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체이다. 또한, 본원에 유용한 것은, U.S. 공개 제2018/0112001호의 실시예 5에 제시된 것과 같은 FACS 결합 검정 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 결정했을 때,  $7 \text{ nM}(7 \times 10^{-9})$  이하의  $EC_{50}$  값으로 MUC16 발현 세포 및 세포주에 결합하는 이중 특이적 항체이다.
- [0130] 일부 양태에서, 이중 특이적 항체는 인간 CD3에 약한 (즉, 낮은) 친화도로 결합하거나 심지어 친화도가 검출되지도 않는다. 특정 구현예에 따르면, 본 개시는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정했을 때 (예를 들어,  $37^\circ\text{C}$ 에서) 약  $11 \text{ nM}$  초과와  $K_D$ 로 인간 CD3에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0131] 일부 양태에서, 이중 특이적 항체는 원숭이(시노몰구스) CD3에 약한 (즉, 낮은) 친화도로 결합하거나 심지어 친화도가 검출되지도 않는다.
- [0132] 일부 양태에서, 이중 특이적 항체는 인간 CD3에 결합하여 T 세포 활성화를 유도한다. 예를 들어, 특정 항-CD3 항체는 시험관 내 T 세포 활성화 검정에 의해 측정했을 때, 약  $113 \text{ pM}$  미만의  $EC_{50}$  값으로 인간 T 세포 활성화를 유도한다.
- [0133] 본원에서 유용한 이중 특이적 항체는 인간 CD3에 결합하여 종양 항원-발현 세포의 T 세포-매개 살해를 유도할 수 있다. 예를 들어, 본 개시는 시험관 내 T 세포 매개 종양 세포 살해 검정에서 측정했을 때, 약  $1.3 \text{ nM}$  미만의  $EC_{50}$ 으로 종양 세포의 T 세포 매개 살해를 유도하는 이중 특이적 항체를 포함한다.
- [0134] 본원에서 유용한 이중 특이적 항체는  $25^\circ\text{C}$  또는  $37^\circ\text{C}$ 에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정했을 때 약 10분 미만의 해리 반감기( $t_{1/2}$ )로 CD3에 결합할 수 있다.
- [0135] 본원에서 유용한 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 추가로 나타낼 수 있다: (a) 시험관 내에서 PBMC의 증식 유도; (b) 인간 전혈에서 IFN-감마 방출 및 CD25 상향 조절 유도에 의해 T 세포의 활성화; 및 (c) MUC16 발현 종양 세포의 T 세포 매개 세포독성의 유도.
- [0136] 본 개시는 대상체에서 종양 항원-발현 세포를 고갈시킬 수 있는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다(예를 들어, U.S. 공개 제2018/0112001호의 실시예 8 참조). 예를 들어, 특정 구현예에 따르면, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자가 제공되며, 여기서 (약  $5.0 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.1 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.08 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.06 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.04 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.02 \text{ mg/kg}$ , 약  $0.01 \text{ mg/kg}$ , 또는 그 이하의 투여량으로) 이중 특이적 항원 결합 분자를 대상체에게 투여하는 경우 대상체에서 MUC16-발현 세포의 수가 검출 가능한 수준 미만으로 감소된다 (예를 들어, 대상체에서 종양 성장이 저해되거나 억제된다). 달리 명시되지 않는 한, 생물발광 휘도는  $[\text{p/s/cm}^2/\text{sr}]$ 을 지칭한다.
- [0137] 특정 구현예에서, 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 약  $0.4 \text{ mg/kg}$ 의 투여량으로 1회 투여하면, 대상체에게 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여한 후 약 7일, 약 6일, 약 5일, 약 4일, 약 3일, 약 2일, 또는 약 1일만에 대상체에서 종양 성장이 검출 가능한 수준 미만으로 감소한다. 특정 구현예에 따르면, 본원에 개시된 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 적어도 약  $0.01 \text{ mg/kg}$ , 예를 들어, 적어도  $85 \text{ ug/kg}$  또는 적어도  $100 \text{ ug/kg}$ 의 투여량으로 1회 투여하면, 투여 후 적어도 약 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일 또는 그 이상까지 MUC16 발현 종양 세포의 수가 검출 가능한 수준 미만으로 유지된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "검출 가능한 수준 미만"이라는 표현은, 예를 들어, U.S. 공개 제2018/0112001호의 실시예 8에 제시된 것과 같이, 본원의 표준 캘리퍼 측정 방법을 사용했을 때, 대상체에서 피하에서 성장하는 종양 세포가 직접 또는 간접적으로 검출될 수 없음을 의미한다.
- [0138] 또한 본원에서 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 나타내는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자이다: (a) 인간 난소암 이종이식편을 가진 면역손상 마우스에서 종양 성장의 억제; (b) 인간 난소암 이종이식편을 가진 면역적격성 마우스에서 종양 성장의 억제; (c) 인

간 난소암 이종이식편을 가진 면역손상 마우스에서 확립된 종양의 종양 성장 억제; 및 (d) 인간 난소암 이종이식편을 가진 면역적격성 마우스에서 확립된 종양의 종양 성장 감소(예를 들어, U.S. 공개 제2018/0112001호의 실시예 8 참조). 예시적인 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 추가로 나타낼 수 있다: (a) 순환 사이토카인의 일시적인 투여량 의존성 증가를 유도함; (b) 순환 T 세포의 일시적인 증가를 유도함; 및 (c) 효과기 T 세포(예: CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 및 조절 T 세포, 즉 Treg)를 고갈시키지 않음.

[0139] 또한, 본원에서 제공된 방법에 따라 유용한 것은, 항-MUC16x항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 약물 접합체를 포함하는 항-MUC16 항체 약물 접합체로서, 생체 내 MUC16 양성 난소암 이식편 모델에서 종양 성장을 억제하는 접합체이다(예를 들어, U.S. 2018/0112001의 실시예 10에서의 생물발광 영상 검정 또는 실질적으로 유사한 검정 참조).

[0140] **에피토프 맵핑 및 관련 기술**

[0141] 본원에서 유용한 항원 결합 분자가 결합하는 CD3 및/또는 MUC16 상의 에피토프는 CD3 또는 MUC16 단백질의 3개 이상의 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의) 아미노산으로 이루어진 단일 연속 서열로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 CD3 또는 MUC16의 복수의 비연속 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 이루어질 수 있다. 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 항체는 단일 CD3 사슬(예: CD3-엡실론, CD3-델타, 또는 CD3-감마) 내에 함유된 아미노산과 상호작용할 수 있거나, 둘 이상의 상이한 CD3 사슬 상의 아미노산과 상호작용할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특이적 항원 결합 부위와 상호 작용하는 항원 결정자를 지칭한다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체는 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효능을 가질 수 있다. 에피토프는 입체적이거나 선형일 수 있다. 입체적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 상이한 분절에서 유래된 공간적으로 병치된 아미노산에 의해 생산된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬 내 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성된 것이다. 특정 상황에서, 에피토프는 항원 상에 당류, 포스포릴기, 또는 술폰기의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0142] 당업자에게 공지된 다양한 기술을 사용해 항체의 항원 결합 도메인이 폴리펩티드 또는 단백질 내의 "하나 이상의 아미노산과 상호작용하는지" 여부를 결정할 수 있다. 예시적인 기술은, 예를 들어, Harlow와 Lane의 문헌 [*Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY]에 기술된 것과 같은 일상적인 교차 차단 검정(cross-blocking assay), 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩티드 블롯 분석(Reineke의 문헌[2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463]), 및 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법이 사용될 수 있다(Tomer의 문헌[2000, *Protein Science* 9:487-496] 참조). 항체의 항원 결합 도메인과 상호 작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 식별하는데 사용될 수 있는 또 다른 방법은 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 교환이다. 일반적으로 말하자면, 수소/중수소 교환 방법은 관심 단백질을 중수소-표지하는 단계, 이어서 항체를 중수소-표지된 단백질에 결합시키는 단계를 포함한다. 다음으로, 단백질/항체 복합체가 물로 옮겨져 (중수소 표지된 상태의) 항체에 의해 보호되는 잔기를 제외한 모든 잔기에서 수소-중수소 교환을 일어나게 한다. 항체 해리 후, 표적 단백질을 대상으로 프로테아제 절단 및 질량 분광 분석을 수행하여, 항체가 상호 작용하는 특정 아미노산에 상응하는 중수소-표지된 잔기를 밝혀낸다. 예를 들어, Ehring의 문헌[(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259]; Engen 및 Smith의 문헌[(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A]을 참조한다. 항원/항체 복합체의 X-선 결정학이 에피토프 맵핑 목적으로 사용될 수도 있다.

[0143] 본원에서 유용한 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자는 낮거나 검출 가능한 결합 친화도로 인간 CD3 및/또는 시노몰구스 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 인간 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 본원에 기술된 특정 예시적인 CD3-특이적 항원 결합 도메인 중 어느 하나와 동일한 CD3 상의 에피토프에 결합하고/하거나, 제2 항원 결합 도메인은 본원에 기술된 특정 예시적인 MUC16-특이적 항원 결합 도메인 중 어느 하나와 동일한 MUC16 상의 에피토프에 결합한다.

[0144] 마찬가지로, 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자는 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 인간 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 CD3에 결합하기 위해 본원에 기술된 특정 예시적인 CD3-특이적 항원 결합 도메인 중 어느 하나와 경쟁하고/하거나, 제2 항원 결합 도메인은 MUC16에 결합하기 위해 본원에 기술된 특정 예시적인 MUC16-특이적 항원 결합 도메인 중 어느 하나와 경쟁한다.

[0145] 특정 항원 결합 분자(예: 항체) 또는 이의 항원 결합 도메인이 본 개시의 기준 항원 결합 분자와 동일한 에피토프

프에 결합하는지, 또는 결합을 위해 본 개시의 기준 항원 결합 분자와 경쟁하는지 여부는 당업계에 공지된 일상적인 방법을 사용해 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본 개시의 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와 동일한 MUC16 (또는 CD3) 상의 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해, 기준 이중 특이적 분자를 MUC16 단백질(또는 CD3 단백질)에 먼저 결합시킨다. 그 다음으로, 시험 항체가 MUC16 (또는 CD3) 분자에 결합하는 능력을 평가한다. 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와의 포화 결합 후에 시험 항체가 MUC16(또는 CD3)에 결합할 수 있다면, 시험 항체는 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와는 다른 MUC16(또는 CD3)의 에피토프에 결합하는 것으로 결론을 내릴 수 있다. 한편, 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와의 포화 결합 후에 시험 항체가 MUC16(또는 CD3) 분자에 결합할 수 없다면, 시험 항체는 기준 이중 특이적 항원 결합 분자가 결합한 에피토프와 동일한 MUC16(또는 CD3)의 에피토프에 결합할 수 있다. 그런 다음, 추가의 일상적인 실험(예: 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)을 수행하여, 시험 항체의 관찰된 결합 결여가 실제로 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 대한 결합으로 인한 것인지, 또는 입체적 차단(또는 다른 현상)이 관찰된 결합 결여의 원인인지 여부를 확인할 수 있다. 이러한 정렬 실험은 ELISA, RIA, Biacore, 유세포 측정법 또는 당업계에서 이용할 수 있는 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 분석법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 개시의 특정 구현예에 따르면, 경쟁적 결합 분석에서 측정했을 때, 예를 들어 1배, 5배, 10배, 20배, 또는 100배 과량인 하나의 항원 결합 단백질이 다른 하나의 결합을 적어도 50%, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%만큼 억제하는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 동일한 (또는 중첩하는) 에피토프에 결합한다(예를 들어, Junghans 등의 문헌[Cancer Res. 1990:50:1495-1502] 참조). 대안적으로, 하나의 항원 결합 단백질의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원 내 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 하나의 항원 결합 단백질의 결합을 감소시키거나 제거하는 아미노산 돌연변이의 하위집합만이 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 "중첩하는 에피토프"를 갖는 것으로 간주된다.

[0146] 항체 또는 항원 결합 도메인이 결합을 위해 기준 항원 결합 분자와 경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, 전술한 결합 방법론은 다음의 2개의 방향으로 수행된다: 제1 방향으로는, 포화 조건 하에 기준 항원 결합 분자를 MUC16 단백질(또는 CD3 단백질)에 결합시키고, 이어서 MUC16 (또는 CD3) 분자에 대한 시험 항체의 결합을 평가한다. 제2 방향으로는, 포화 조건 하에 시험 항체를 MUC16 (또는 CD3) 분자에 결합시키고, 이어서 MUC16 (또는 CD3) 분자에 대한 기준 항원 결합 분자의 결합을 평가한다. 만약, 2가지 방향 모두에서, 제1 (포화) 항원 결합 분자만이 MUC16 (또는 CD3) 분자에 결합할 수 있다면, 시험 항체 및 기준 항원 결합 분자는 MUC16 (또는 CD3)에 결합하기 위해 경쟁하는 것으로 결론을 내린다. 당업자가 이해할 수 있듯이, 결합을 위해 기준 항원 결합 분자와 경쟁하는 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합할 필요는 없지만, 중첩하거나 또는 인접한 에피토프에 결합함으로써 기준 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0147] **항원 결합 도메인의 제조 및 이중 특이적 분자의 작제**

[0148] 특정 항원에 특이적인 항원 결합 도메인은 당업계에 공지된 임의의 항체 생성 기술에 의해 제조할 수 있다. 일단 수득되면, 2개의 상이한 항원(예를 들어, CD3 및 MUC16)에 특이적인 2개의 상이한 항원 결합 도메인을 일상적인 방법을 사용하여 서로에 대해 적절히 배열하여 이중 특이적 항원 결합 분자를 생성할 수 있다. (본 개시의 이중 특이적 항원 결합 분자를 작제하는 데 사용될 수 있는 예시적인 이중 특이적 항체 포맷에 대한 논의는 본원의 다른 곳에서 제공된다). 특정 구현예에서, 다중 특이적 항원 결합 분자의 개별 성분(예: 중쇄 및 경쇄) 중 하나 이상은 키메라 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체로부터 유래된다. 이러한 항체를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자의 중쇄 및/또는 경쇄 중 하나 이상은 VELOCIMMUNE™ 기술을 사용해 제조할 수 있다. VELOCIMMUNE™ 기술(예를 들어, 미국 특허 제6,596,541호, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®, 또는 임의의 다른 인간 항체 생성 기술 참조)을 사용해, 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 가진 키메라 항체로서 특정 항원(예: CD3 또는 MUC16)에 대한 고 친화도 키메라 항체를 먼저 단리한다. 항체의 특성을 분석하여 친화도, 선택도, 에피토프 등을 포함하는 바람직한 특성에 맞게 선택한다. 마우스 불변 영역을 원하는 인간 불변 영역으로 치환하여 본원에 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자에 혼입될 수 있는 완전한 인간 중쇄 및/또는 경쇄를 생성한다.

[0149] 유전자 조작된 동물을 사용해 인간 이중 특이적 항원 결합 분자를 만들 수도 있다. 예를 들어, 내인성 마우스 면역글로블린 경쇄 가변 서열을 재배열할 수 없고 발현할 수 없는 유전적으로 변형된 마우스를 사용될 수 있으며, 여기서 마우스는 내인성 마우스 카파 유전자좌에서 마우스 카파 불변 유전자에 작동 가능하게 연결된 인간 면역글로블린 서열에 의해 암호화된 1개 또는 2개의 인간 경쇄 가변 도메인만을 발현한다. 이러한 유전적으로 변형된 마우스를 사용해, 1개 또는 2개의 상이한 인간 경쇄 가변 영역 유전자 분절로부터 유래된 가변 도메인을

포함하는 동일한 경쇄와 결합되는 2개의 상이한 중쇄를 포함하는 완전한 인간 이중 특이적 항원 결합 분자를 생성할 수 있다. (이러한 조작된 마우스, 및 이중 특이적 항원 결합 분자를 생성하기 위한 이의 용도에 대한 상세한 논의는 예를 들어 미국 특허 제10,143,186호를 참조한다).

**[0150] 생물학적 동등물**

**[0151]** 현재 개시된 방법은 본원에 개시된 예시적인 분자의 아미노산 서열과는 다르지만 CD3 및/또는 MUC16에 결합하는 능력을 보유한 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 분자의 용도를 포함한다. 이러한 변이체 분자는 부모 서열과 비교했을 때 아미노산의 하나 이상의 추가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기술된 이중 특이적 항원 결합 분자와 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다.

**[0152]** 본원에서 유용한 것은, 표 1에 제시된 예시적인 항원 결합 분자 중 어느 하나와 생물학적으로 동등한 항원 결합 분자이다. 2개의 항원 결합 단백질 또는 항체가, 예를 들어, 유사한 실험 조건 하에 동일한 몰 투여량(1회 투여량 또는 다회 투여량)으로 투여되었을 때, 흡수 속도 및 정도에 있어서 유의한 차이를 보이지 않는 약학적 등가물 또는 약학적 대안인 경우, 이들은 생물학적으로 동등한 것으로 간주된다. 일부 항원 결합 단백질이 흡수 정도에 있어서는 동등하지만 흡수 속도가 다른 경우, 이들은 등가물 또는 약학적 대안으로서 간주될 것이고, 여전히 생물학적으로 동등한 것으로 간주될 수 있는데, 그 이유는, 흡수 속도에 있어서의 이러한 차이는 의도적이고 표지에 반영되어 있으며, 예를 들어, 만성적으로 사용될 때 효과적인 신체 약물 농도를 달성하는 데 반드시 필요하지 않으며, 특정한 연구 의약품에 대해 의학적으로 유의하지 않은 것으로 간주되기 때문이다.

**[0153]** 일 구현예에서, 2개의 항원 결합 단백질이 안전성, 순도 및 효능에 있어서 임상적으로 의미 있는 차이가 없는 경우, 이들은 생물학적으로 동등하다.

**[0154]** 일 구현예에서, 환자가 기준 생성물을 사용하는 치료와 생물학적 생성물을 사용하는 치료 사이에서 1회 이상 전환할 수 있고, 이러한 전환이 없는 연속 요법과 비교했을 때 면역원성에 있어서의 임상적으로 유의한 변화를 포함하여 예상되는 이상 반응의 위험 증가 또는 효과의 감소가 없는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 생물학적으로 동등하다.

**[0155]** 일 구현예에서, 2개의 항원 결합 단백질 둘 모두가 사용 조건(들)에 대한 공통의 메커니즘 또는 공통의 작용 메커니즘(들)에 의해 이러한 메커니즘이 알려진 정도까지 작용하는 경우, 이들은 생물학적으로 동등하다.

**[0156]** 생물학적 동등성은 생체 내 방법 및 시험관 내 방법에 의해 입증될 수 있다. 생물학적 동등성 측정에는, 예를 들어: (a) 항체의 농도 또는 이의 대사가 혈액, 혈장, 혈청, 또는 기타 생물학적 유체에서 시간의 함수로서 측정되는, 인간 또는 다른 포유동물의 생체 내 시험; (b) 인간의 생체 내 생체이용률 데이터와 연관되었거나 이를 합리적으로 예측할 수 있게 하는 시험관 내 시험; (c) 항체(또는 이의 표적)의 적절한 급성 약리학적 효과가 시간의 함수로서 측정되는, 인간 또는 다른 포유동물의 생체 내 시험; 및 (d) 항원 결합 단백질의 안전성, 효능, 또는 생체이용률이나 생물학적 동등성을 확립하는 잘 조절된 임상 시험이 있다.

**[0157]** 본원에서 제시된 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자의 생물학적으로 동등한 변이체는, 예를 들어, 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 만들거나 생물학적 활성에 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실함으로써 삭제할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적인 시스테인 잔기를 결실시키거나 다른 아미노산과 치환하여, 변성 시에 불필요하거나 부정확한 분자내 이황화 브리지가 형성되는 것을 방지할 수 있다. 다른 맥락에서, 생물학적으로 동등한 항원 결합 단백질은 분자의 글리코실화 특징을 변형시키는, 예를 들어, 글리코실화를 제거하거나 없애는 돌연변이를 일으키는 아미노산 변화를 포함하는, 본원에서 제시된 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자의 변이체를 포함할 수 있다.

**[0158] 종 선택도 및 종 교차 반응성**

**[0159]** 특정 구현예에 따르면, 본원에서 유용한 이중 특이적 항원 결합 분자는 인간 CD3에 결합하지만 다른 종의 CD3에는 결합하지 않는다. 또한, 본원에서 유용한 것은 인간 MUC16에 결합하지만 다른 종의 MUC16에는 결합하지 않는 항원 결합 분자이다. 현재 개시된 방법은, 인간 CD3 및 하나 이상의 비인간 종의 CD3에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자; 및/또는 인간 MUC16 및 하나 이상의 비인간 종의 MUC16에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자의 용도를 고려한다.

**[0160]** 특정 예시적인 구현예에 따르면, 본원에서 유용한 항원 결합 분자는 인간 CD3 및/또는 인간 MUC16에 결합하며, 경우에 따라, 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터, 저빌 쥐, 돼지, 고양이, 개, 토끼, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 시노물구스, 마모셋, 붉은털 원숭이, 또는 침팬지 CD3 및/또는 MUC16 중 하나 이상에 결합하거나 결합하지 않을

수 있다. 예를 들어, 본 개시의 특정 예시적인 구현예에서, 인간 CD3 및 시노물구스 CD3에 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 인간 MUC16에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자가 제공된다.

[0161] **면역-PET 영상화를 위한 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자의 방사성 표지된 면역접합체**

[0162] MUC16 및/또는 CD3에 결합하는 방사성 표지된 항원 결합 단백질이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 방사성 표지된 항원 결합 단백질은 양전자 이미터에 공유 결합된 항원 결합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 방사성 표지된 항원 결합 단백질은, 양전자 이미터를 킬레이트화할 수 있는 화학적 모이어티인 하나 이상의 킬레이트화 모이어티에 공유 결합된 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0163] 적절한 방사성 표지된 항원 결합 단백질, 예를 들어, 방사성 표지된 항체는, 방사성 표지된 항원 결합 단백질에 노출될 때 T 세포 기능을 손상시키지 않거나 실질적으로 손상시키지 않는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-MUC16/항-CD3에 결합하는 방사성 표지된 항원 결합 단백질은 CD3 T 세포 기능의 약한 차단제이며, T 세포 기능은 방사성 표지된 항체에 노출될 때 손상되지 않거나 실질적으로 손상되지 않는다. CD3 매개 T 세포 기능에 최소한의 영향을 미치는 방사성 표지된 항-CD3 결합 단백질을 본원에 제공된 방법에 따라 사용하면, 분자로 치료한 대상체가 그의 T 세포가 감염을 제거하는 능력이 없는 것에 의해 불리해지지 않게 한다.

[0164] 일부 구현예에서, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자(예: 이중 특이적 항체)가 제공되며, 여기서 상기 항원 결합 단백질은 다음의 구조를 갖는 하나 이상의 모이어티에 공유 결합되며:

[0165]  $-L-M_z$

[0166] 식 중, L은 킬레이트화 모이어티이고; M은 양전자 이미터이고; z는 각각의 경우 독립적으로 0 또는 1이며; z 중 적어도 하나는 1이다.

[0167] 일부 구현예에서, 방사성 표지된 항원 결합 단백질은 화학식 (I)의 화합물이며:

[0168]  $M-L-A-[L-M_z]_k$

[0169] (화학식 I)

[0170] 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자이고; L은 킬레이트화 모이어티이고; M은 양전자 이미터이고; z는 0 또는 1이며; k는 0 내지 30의 정수이다. 일부 구현예에서, k는 1이다. 일부 구현예에서, k는 2이다.

[0171] 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항원 결합 단백질은 화학식 (II)의 화합물이며:

[0172]  $A-[L-M]_k$

[0173] (화학식 II)

[0174] 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자이고; L은 킬레이트화 모이어티이고; M은 양전자 이미터이고; k는 1 내지 30의 정수이다.

[0175] 일부 구현예에서, 다음의 구조를 갖는 접합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며:

[0176]  $A-L_k$

[0177] 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자이고; L은 킬레이트화 모이어티이고; k는 1 내지 30의 정수이며; 여기서 접합체는 임상 PET 영상화에 적합한 특이적 활성을 제공하기에 충분한 양으로 양전자 이미터에 의해 킬레이트화 된다.

[0178] 적절한 킬레이트화 모이어티, 및 양전자 이미터는 아래에 제공된다.

[0179] **양전자 이미터 및 킬레이트화 모이어티**

[0180] 적절한 양전자 이미터는, 킬레이트화 모이어티와 안정한 복합체를 형성하고 면역-PET 영상화 목적에 적합한 물리적 반감기를 갖는 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 양전자 이미터는  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ , 및  $^{86}\text{Y}$ 를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 적절한 양전자 이미터는, 항-MUC16 항체 또는 항-

MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자와 직접 결합하는 것들(<sup>76</sup>Br 및 <sup>124</sup>I를 포함하되 이들로 한정되지 않음), 및 보결원자단(prosthetic group)을 통해 도입되는 것들(예: <sup>18</sup>F)을 또한 포함한다.

[0181] 본원에 기술된 킬레이트화 모이어티는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 항원 결합 분자에 공유 연결되는 화학적 모이어티로서, 양전자 이미터를 킬레이트화할 수 있는 부분, 즉, 양전자 이미터와 반응하여 조정된 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 부분을 포함한다. 적절한 모이어티는, 특정 금속의 효율적인 첨가를 가능하게 하고, 진단용(예; 면역-PET 영상화)으로 사용하기에 생체 내에서 충분히 안정한 금속-킬레이터 복합체를 형성하는 것들을 포함한다. 예시적인 킬레이트화 모이어티는, 진단용으로 사용하기에 적합한 정도까지 양전자 이미터의 해리와 미네랄 뼈에서의 축적, 플라즈마 단백질, 및/또는 골수 침착을 최소화시키는 것들을 포함한다.

[0182] 킬레이트화 모이어티의 예에는 양전자 이미터 <sup>89</sup>Zr, <sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu, <sup>44</sup>Sc, 및/또는 <sup>86</sup>Y와 함께 안정한 복합체를 형성하는 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 킬레이트화 모이어티는 *Nature Protocols*, 5(4): 739, 2010; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); *Chem Commun (Camb)*, 51(12): 2301 (2015); *Mol. Pharmaceutics*, 12: 2142 (2015); *Mol. Imaging Biol.*, 18: 344 (2015); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 37:250 (2010); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016). doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*, 26(12): 2579 (2015); WO 2015/140212A1; 및 미국 특허 제5,639,879호에 기술된 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않으며, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0183] 예시적인 킬레이트화 모이어티는 또한, 데스페리옥사민(DFO), 1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA), 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라(메틸렌 포스포)산(DOTP), 1R, 4R, 7R, 10R)-α'-α''-테트라메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTMA), 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA), H<sub>4</sub>옥타과, H<sub>6</sub>포스포, H<sub>2</sub>딤과, H<sub>5</sub>테카과, H<sub>2</sub>아자과, HOPO, DO2A, 1,4,7,10-테트라키스(카바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸(DOTAM), 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA), 1,4,7,10-테트라키스(카바모일메틸)-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸(DOTAM), 1,4,8,11-테트라아자바이시클로[6.6.2]헥사데칸-4,11-아세트산(CB-TE2A), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸(Cyclen), 1,4,8,11-테트라아자시클로테트라데칸(Cyclam), 옥타텐테이트 킬레이터, 옥타텐테이트 이기능성 킬레이터(예: DFO\*), 헥사텐테이트 킬레이터, 포스포네이트-계열 킬레이터, 마크로시클릭 킬레이터, 마크로시클릭 테레프탈아미드 리간드를 포함하는 킬레이터, 이기능성 킬레이터, 푸사리닌 C 및 푸사리닌 C 유도체 킬레이터, 트리아세틸푸사리닌 C(TAFC), 페리옥사민 E(FOXE), 페리옥사민 B(FOX), 페리크롬 A(FCHA) 등을 포함하는 것들을 포함하되, 이들로 한정되지는 않는다.

[0184] 일부 구현예에서, 킬레이트화 모이어티는, 킬레이트화 모이어티의 킬레이트화 부분을 결합 단백질에 공유 부착하는 링커 모이어티를 통해 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자에 공유 결합된다. 일부 구현예에서, 이들 링커 모이어티는 이중 특이적 항원 결합 분자의 반응성 모이어티(예: 항체의 시스테인 또는 리신)와 킬레이터에 부착되는 반응성 모이어티(예를 들어, p-이소티오시아나토벤질 및 아래의 접합 방법에서 제공된 반응성 모이어티를 포함함) 간의 반응으로부터 형성된다. 또한, 이러한 링커 모이어티는, 극성, 용해도, 입체 상호 작용, 양성 및/또는 킬레이트화 부분과 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 결합 단백질 간의 길이를 조절하기 위한 목적으로 사용되는 화학기(chemical group)를 임의로 포함한다.

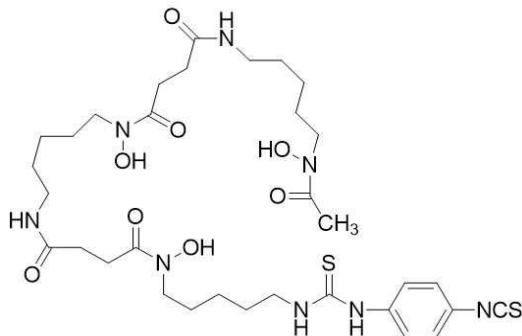
[0185] 방사성 표지된 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체의 제조

[0186] 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 및 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체는 (1) 항원 결합 분자를 이중 특이적 결합 단백질의 원하는 접합 부위에 반응하는 모이어티 및 양전자 이미터 킬레이터를 포함하는 분자와 반응시키고, (2) 바람직한 양전자 이미터를 첨가함으로써 제조될 수 있다.

[0187] 적절한 접합 부위는 리신 및 시스테인을 포함하되 이들로 한정되지 않으며, 이들 모두는, 예를 들어, 자연적이거나 조작된 것일 수 있고, 예를 들어, 항체의 중쇄 또는 경쇄에 존재할 수 있다. 시스테인 접합 부위는 항체 이황화 결합의 돌연변이, 삽입 또는 환원으로 수득된 것들을 포함하되, 이들로 한정되지는 않는다. 시스테인 조작 항체를 만드는 방법은 WO2011/056983에 개시된 것을 포함하나 이들로 한정되지는 않는다. 부위 특이적 접합 방법을 사용해 항체의 특이적 부위에 대해 접합 반응을 유도하고, 바람직한 화학량론을 달성하고/하거나 바람직한 킬레이트 대 항체 비율을 달성할 수도 있다. 글루타민 접합, Q295 접합, 및 트랜스글루타미나아제 매개 접합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 이러한 접합 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 시스테인 조작, 효소적

방법 및 화학-효소적 방법을 비롯하여, *J.Clin.Immunol.*, 36: 100 (2016)(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 것들을 포함하되, 이들로 한정되지는 않는다. 원하는 접합 부위에 반응하는 적절한 모이어티는 일반적으로 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자(예: 이중 특이적 항체)와 양전자 이미터 킬레이터의 효율적이고 용이한 결합을 가능하게 한다. 리신과 시스테인 부위에 대한 반응성 모이어티는 당업자에게 알려진 친전자기(electrophilic group)를 포함한다. 특정 양태에서, 원하는 접합 부위가 리신인 경우, 반응성 모이어티는 이소티오시아네이트, 예를 들어, p-이소티오시아나토벤질기 또는 반응성 에스테르이다. 특정 양태에서, 원하는 접합 부위가 시스테인인 경우, 반응성 모이어티는 말레이미드(maleimide)이다.

[0188] 킬레이터가 데스페리옥사민(DFO)인 경우, 적절한 반응성 모이어티는 이소티오시아나토벤질기, n-하이드록시숙신이미드 에스테르, 2,3,5,6 테트라플루오로페놀 에스테르, n-숙신이미딜-S-아세틸티오아세테이트, 및 *Biomed Research International*, Vol 2014, Article ID 203601(그 전체가 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 것들을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 특정 구현예에서, 양전자 이미터 킬레이터 및 접합 부위에 대해 반응성인 모이어티를 포함하는 분자는 p-이소티오시아나토벤질-데스페리옥사민(p-SCN-Bn-DFO)이다:



[0189]

[0190] 양전자 이미터의 첨가는, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 킬레이터 접합체를 양전자 이미터와 함께, 상기 양전자 이미터를 킬레이터에 대해 조정시킬 수 있는 충분한 시간 동안 인큐베이션함으로써, 예를 들어, 본원에 제공된 실시예에 기술된 방법 또는 실질적으로 유사한 방법을 수행함으로써 달성된다.

[0191] **접합체의 예시적인 구현예**

[0192] 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 및 양전자 이미터를 포함하는 방사성 표지된 항체 접합체가 본 개시에 포함된다. 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자, 킬레이터화 모이어티, 및 양전자 이미터를 포함하는 방사성 표지된 항체 접합체가 또한 본 개시에 포함된다. (Tavare 등의 문헌[Cancer Res. 2016, 76(1): 73-82]; 및 Azad 등의 문헌[Oncotarget. 2016, 7(11): 12344-58].)

[0193] 일부 구현예에서, 킬레이터화 모이어티는 <sup>89</sup>Zr과 복합체를 형성할 수 있는 킬레이터를 포함한다. 특정 구현예에서, 킬레이터화 모이어티는 데스페리옥사민을 포함한다. 특정 구현예에서, 킬레이터화 모이어티는 p-이소티오시아나토벤질-데스페리옥사민이다.

[0194] 일부 구현예에서, 양전자 이미터는 <sup>89</sup>Zr이다. 일부 구현예에서, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 1.0% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.9% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.8% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.7% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.6% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.5% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.4% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.3% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.2% 미만이 양전자 이미터와 접합되거나, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 0.1% 미만이 양전자 이미터와 접합된다.

[0195] 일부 구현예에서, 접합체의 킬레이터화 모이어티 대 항체의 비율은 1.0 내지 2.0이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "킬레이터화 모이어티 대 항체 비율"은 항체에 대한 킬레이터 모이어티의 평균 비율이며, 항체당 킬레이

터 첨가량의 척도이다. 이러한 비율은 항체-약물 접합체(ADC)를 대상으로 항체당 약물 첨가량을 측정하기 위해 당업자가 사용하는 "DAR", 즉 약물-항체 비율과 유사하며; 본원에 기술된 iPET 영상화용 접합체의 맥락에서, 킬레이트화 모이어티 대 항체 비율은 본원에 기술된 방법 또는 당업계에 알려진 다른 DAR 결정 방법, 예를 들어, Wang 등의 Antibody-Drug Conjugates, The 21<sup>st</sup> Century Magic Bullets for Cancer (2015)에 기술된 것들을 사용해 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 킬레이트화 모이어티 대 항체의 비율은 약 1.7이다. 일부 구현예에서, 킬레이트화 모이어티 대 항체의 비율은 1.0 내지 2.0이다. 일부 구현예에서, 킬레이트화 모이어티 대 항체의 비율은 약 1.7이다.

[0196] 특정 구현예에서, 킬레이트화 모이어티는 p-이소티오시아나토벤질-테스페리옥사민이고 양전자 이미터는 <sup>89</sup>Zr이다. 또 다른 특정 구현예에서, 킬레이트화 모이어티는 p-이소티오시아나토벤질-테스페리옥사민이고 양전자 이미터는 <sup>89</sup>Zr이며, 접합체의 킬레이트화 모이어티 대 항체 비율은 1 내지 2이다.

[0197] 일부 구현예에서, 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자가 본원에 제공되며, 여기서 상기 항원 결합 단백질은 다음의 구조를 갖는 하나 이상의 모이어티에 공유 결합되며:

[0198] -L-M<sub>z</sub>

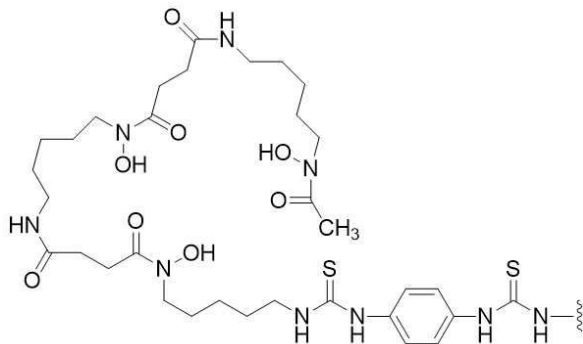
[0199] 식 중, L은 킬레이트화 모이어티이고; M은 양전자 이미터이고; z는 각각의 경우 독립적으로 0 또는 1이며; z 중 적어도 하나는 1이다. 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항원 결합 단백질은 화학식 (I)의 화합물이며:

[0200] M-L-A-[L-M<sub>z</sub>]<sub>k</sub>

[0201] (화학식 I)

[0202] 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자이고; L은 킬레이트화 모이어티이고; M은 양전자 이미터이고; z는 0 또는 1이며; k는 0 내지 30의 정수이다. 일부 구현예에서, k는 1이다. 일부 구현예에서, k는 2이다.

[0203] 일부 구현예에서, L은 다음과 같다:

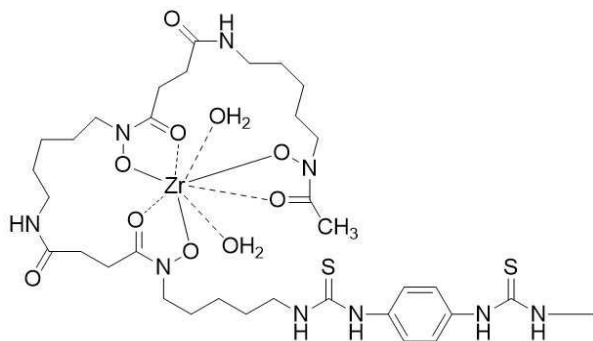


[0204]

[0205] 일부 구현예에서, M은 <sup>89</sup>Zr이다.

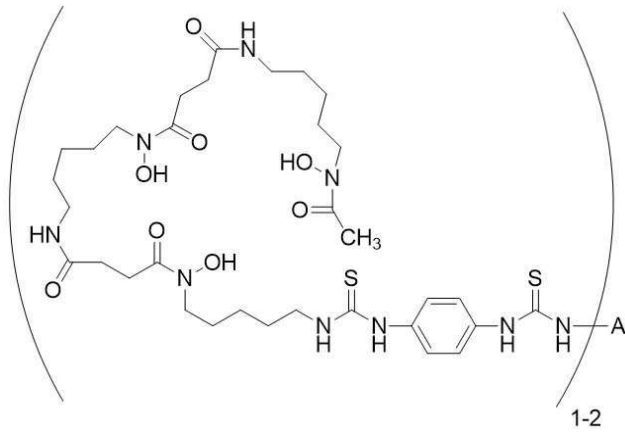
[0206] 일부 구현예에서, k는 1 내지 2의 정수이다. 일부 구현예에서, k는 1이다. 일부 구현예에서, k는 2이다.

[0207] 일부 구현예에서, -L-M은



[0208] 이고, 식 중 Zr은 양전자 이미터 <sup>89</sup>Zr이다.

[0209] 방사성 표지된 항체 접합체를 합성하는 방법이 또한 본 개시에 포함되며, 상기 방법은 화학식 (III)의 화합물을:

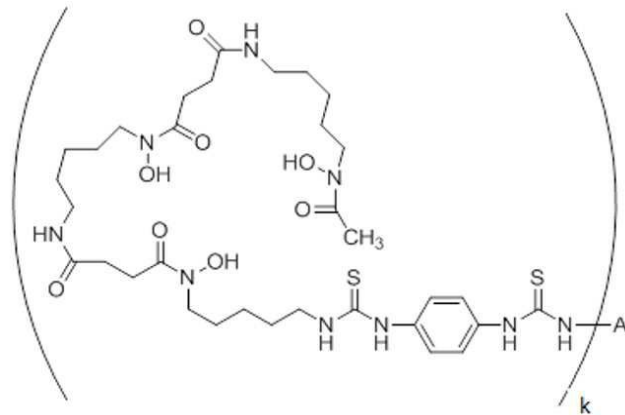


[0210]  
[0211] (화학식 III)

[0212] <sup>89</sup>Zr과 접촉시키는 단계를 포함하며, 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자이다. 특정 구현예에서, 화학식 (III)의 화합물은 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자를 p-SCN-Bn-DFO와 접촉시키는 단계에 의해 합성된다.

[0213] 화학식 (III)의 화합물과 <sup>89</sup>Zr 간의 반응 생성물이 또한 본원에 제공된다.

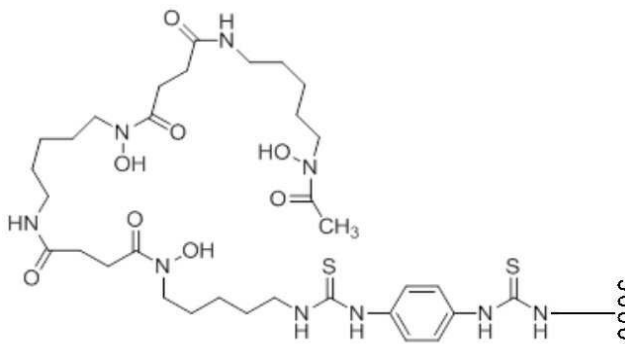
[0214] 화학식 (III)의 화합물들이 본원에 제공되며:




[0215]  
[0216] 식 중 A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자이고, k는 1 내지 30의 정수이다. 일부 구현예에서, k는 1 또는 2이다.

[0217] 항체 접합체가 본원에 제공되며, 항체 접합체는 (i) 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 (ii) 하나 이상의 킬레이트화 모이어티를 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 킬레이트화 모이어티는 다음을 포함하고



[0219] ,

- [0220]  는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 공유 결합이다.
- [0221] 일부 양태에서, 항체 접합체는 약 1.0 내지 약 2.0의 킬레이트화 모이어티 대 항체 비율을 갖는다. 일부 양태에서, 항체 접합체는 약 1.7의 킬레이트화 모이어티 대 항체 비율을 갖는다.
- [0222] 일부 구현예에서, 다음의 구조를 갖는 접합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며:
- [0223] A-L<sub>k</sub>
- [0224] 식 중, A는 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자이고; L은 킬레이트화 모이어티이고; k는 1 내지 30의 정수이며; 접합체는 임상 PET 영상화에 적합한 특이적 활성을 제공하기에 충분한 양으로 양전자 이미터와 킬레이트화 된다. 일부 구현예에서, 킬레이트화된 양전자 이미터의 양은 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 1 내지 50 mg 당 약 1 내지 약 50 mCi의 특이적 활성을 제공하기에 충분한 양이다.
- [0225] 일부 구현예에서, 킬레이트화된 양전자 이미터의 양은 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자의 1 내지 50 mg 당 최대 50 mCi, 최대 45 mCi, 최대 40 mCi, 최대 35 mCi, 최대 30 mCi, 최대 25 mCi, 또는 최대 10 mCi, 예를 들어, 약 5 내지 약 50 mCi, 약 10 내지 약 40 mCi, 약 15 내지 약 30 mCi, 약 7 내지 약 25 mCi, 약 20 내지 약 50 mCi, 또는 약 5 내지 약 10 mCi 범위의 특이적 활성을 제공하기에 충분한 양이다.
- [0226] **방사성 표지된 면역접합체를 사용하는 방법**
- [0227] 특정 양태에서, 본 개시는 본 개시의 방사성 표지된 항체 접합체의 진단적 및 치료적 사용 방법을 제공한다.
- [0228] 일 양태에 따르면, 본 개시는 조직에서 MUC16를 검출하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에 제공된 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체를 조직에 투여하는 단계; 및 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 조직은 세포 또는 세포주를 포함한다. 특정 구현예에서, 조직은 대상체에 존재하며, 대상체는 포유동물이다. 특정 구현예에서, 대상체는 비인간 대상체이다. 특정 구현예에서, 대상체는 MUC16 항원을 발현하는 암, 예컨대 난소암, 유방암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-중피 형성 유형, 자궁 경부의 선암종, 및 위관의 선암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애를 갖는다. 일 구현예에서, 대상체는 난소암을 갖는다.
- [0229] 일 양태에 따르면, 본 개시는 MUC16를 발현하는 조직을 영상화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 개시의 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체 접합체를 조직에 투여하는 단계; 및 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화에 의해 MUC16 발현을 시각화하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 조직은 종양에 포함된다. 일 구현예에서, 조직은 종양 세포 배양물 또는 종양 세포주에 포함된다. 일 구현예에서, 조직은 대상체의 종양 병변에 포함된다. 일 구현예에서, 조직은 조직에서의 종양 내 림프구이다. 일 구현예에서, 조직은 MUC16-발현 세포를 포함한다.
- [0230] 일 양태에 따르면, 본 개시는, 대상체가 항종양 요법에 적합한 종양을 가지고 있는지 결정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 본 개시의 방사성 표지된 항체 접합체를 투여하는 단계, 및 투여된 방사성 표지된 항체 접합체를 PET 영상화에 의해 종양에서 국소화하는 단계를 포함하며, 방사성 표지된 항체 접합체가 종양에 존재하면, 대상체는 항종양 요법에 적합한 것으로 식별된다.
- [0231] 일 양태에 따르면, 본 개시는 고휘 종양을 가진 대상체의 항종양 요법에 대한 반응을 예측하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 종양이 MUC16 양성인지 여부를 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 종양이 MUC16 양성인 경우, 대상체의 반응이 양성인 것으로 예측된다. 특정 구현예에서, 종양은, 본 개시의 방사성 표지된 항체 접합체를 투여하고 PET 영상화에 의해 방사성 표지된 항체 접합체를 종양 내에 국소화함으로써 양성으로 결정되며, 방사성 표지된 항체 접합체가 종양 내에 존재하면 종양은 MUC16 양성으로 나타난다.
- [0232] 일 양태에 따르면, 본 개시는 대상체에서 MUC16 양성 종양을 검출하는 방법을 제공한다. 본 양태에 따르면, 상기 방법은, 본 개시의 방사성 표지된 항체 접합체를 대상체에게 투여하는 단계; 및 PET 영상화에 의해 방사성 표지된 항체 접합체를 종양 내에 국소화하는 단계를 포함하며, 방사성 표지된 항체 접합체가 종양 내에 존재하면 종양은 MUC16 양성으로 나타난다.
- [0233] 항종양 요법에 대한 양성 반응을 예측하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은, 방사성 표지된 항-MUC16 항체

접합체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체 결합 분자 접합체를 대상체에게 투여하여 고형 종양에서 MUC16 양성 세포의 존재를 결정하는 단계를 포함한다. MUC16 양성 세포의 존재를 통해 항종양 요법에 대한 양성 반응을 예측할 수 있다.

[0234] 본원에서 사용되는 바와 같이, 표현 "이를 필요로 하는 대상체"는 암의 하나 이상의 증상 또는 징후를 나타내는 인간 또는 비인간 포유동물, 및/또는 암(고형 종양 포함)으로 진단되어 이에 대한 치료를 필요로 하는 인간 또는 비인간 포유동물을 의미한다. 많은 구현예에서, 용어 "대상체"는 용어 "환자"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 대상체는 원발성 종양이나 전이성 종양으로 진단되고/되거나 설명할 수 없는 체중 감소, 쇠약감(general weakness), 만성 피로, 식욕 상실, 발열, 도한(night sweats), 뼈 통증, 숨가쁨, 복부 팽윤, 흉통/흉압, 비장 팽창, 및 암 관련 바이오마커(예: CA125) 수준의 상승을 포함하는 하나 이상의 증상이나 징후로 진단될 수 있다. 상기 표현은 원발성 종양 또는 확립된 종양을 가진 대상체를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 표현은 난소암, 유방암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-중피 형성 유형, 자궁 경부 선암종, 및 위관 선암종과 같은 고형 종양을 가진 인간 대상체 및/또는 이에 대한 치료를 필요로 하는 인간 대상체를 포함한다. 이 용어는 원발성 종양 또는 전이성 종양(진행된 병기의 악성 종양)을 가진 대상체를 포함한다. 특정 구현예에서, "이를 필요로 하는 대상체"란 표현은, 선행 요법(예: 항암제를 사용하는 치료)에 대해 내성을 가지거나 불응성인 종양 또는 선행 요법으로 적절히 조절되지 않는 고형 종양을 가진 대상체를 포함한다. 예를 들어, 상기 표현은 화학요법(예: 카보플라틴 또는 도세탁셀) 치료와 같은 선행 요법으로 1선량 이상의 치료를 받은 대상체를 포함한다. 특정 구현예에서, "이를 필요로 하는 대상체"란 표현은 1선량 이상의 선행 요법으로 치료하였지만 후속하여 재발하였거나 전이된 고형 종양을 가진 대상체를 포함한다.

[0235] 특정 구현예에서, 본 개시의 방법은 고형 종양을 가진 대상체에서 사용된다. 용어 "종양", "암" 및 "악성 종양"은 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "고형 종양"은 보통 낭포 또는 액체 영역을 포함하지 않는 비정상적인 조직 덩어리를 지칭한다. 고형 종양은 양성(암이 아님) 또는 악성(암)일 수 있다. 본 개시의 목적을 위해, 용어 "고형 종양"은 악성 고형 종양을 의미한다. 상기 용어는 고형 종양을 형성하는 세포 유형에 따라 명명된 상이한 유형의 고형 종양, 즉, 육종, 암종 및 림프종을 포함한다.

[0236] 특정 구현예에서, 암 또는 종양은 성상세포종, 항문암, 방광암, 혈액암, 혈액암, 골암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 투명 세포 신세포 암종, 대장암, 미소부수체-중간체 대장암, 피부 편평 세포 암종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 중피종, 섬유육종, 위암, 교아세포종, 다형성 교아종, 두경부 편평 세포 암종, 간 세포 암종, 간내 담관암종-중피 형성 유형, 백혈병, 간암, 평활근육종, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 골수종, 비인두암, 비소세포 폐암, 골육종, 난소암, 췌장암, 췌장관 암종, 원발성 및/또는 재발성 암, 전립선암, 신세포 암종, 횡문근육종, 침샘암, 피부암, 소세포 폐암, 편평세포암, 위암, 윤활막 육종, 고환암, 갑상선암, 삼중 음성 유방암, 자궁경부 암종을 포함하는 자궁암, 및 윌름스 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 암은 원발성 암이다. 일부 양태에서, 암은 전이성 및/또는 재발성 암이다.

[0237] 특정 구현예에서, 암 또는 종양은 MUC16 양성 종양, 예컨대 난소, 유방, 기관지, 자궁내막, 각막, 위 상피, 췌장, 또는 대장에서 기원하는 종양으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 암은 유방암, 난소암, 각막암, 췌장암, 자궁내막암, 난관암, 중피종, 비소세포 폐암, 간내 담관암종-중피 형성 유형, 자궁암, 자궁경부암, 위암, 또는 대장 암종이다. 일부 양태에서, 암은 난소암이다. 일부 양태에서, 암은 원발성 난소 종양에서 기원하는 전이성 암이다.

[0238] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료(treat, treating 등)"는 증상을 완화시키거나, 증상의 원인을 일시적인 방식 또는 영구적인 방식으로 제거하거나, 종양의 성장을 지연 또는 억제하거나, 종양 세포 부하 또는 종양 부담을 감소시키거나, 종양 퇴행을 촉진하거나, 종양의 축소, 괴사 및/또는 제거를 유도하거나, 종양 재발을 방지하거나, 전이를 방지 또는 억제하거나, 전이성 종양 성장을 억제하고/하거나 대상체의 생존 기간을 연장시키는 것을 의미한다.

[0239] 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 접합체는 대상체에게 정맥내, 복강내, 또는 피하 투여된다. 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항체 접합체는 대상체에게 종양 내 투여된다. 투여 시, 방사성 표지된 항체 접합체는 종양에서 국소화된다. 국소화된 방사성 표지된 항체 접합체는 PET 영상화에 의해 영상화되고, 종양에 의한 방사성 표지된 항체 접합체의 흡수는 당업계에 공지된 방법에 의해 측정된다. 특정 구현예에서, 영상화는 방사성 표지된 접합체가 투여된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일차에 수행된다. 특정 구현예에서, 영상화는 방사성 표지된 항체 접합체가 투여되는 당일에 수행된다.

[0240] 특정 구현예에서, 방사성 표지된 항-MUC16 항체 접합체 또는 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자 접합

체는 대상체의 체중 1 kg당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 투여량, 예를 들어, 체중 1 kg당 약 0.1 mg 내지 약 50 mg, 또는 약 0.5 mg 내지 약 25 mg, 또는 약 0.1 mg 내지 약 1.0 mg의 투여량으로 투여될 수 있다.

[0241] **치료 제형 및 투여**

[0242] 본 개시에 따라 유용한 것은 본원에서 유용한 항원 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물이다. 일부 양태에서, 약학적 조성물은 항-4-1BB 작용제를 추가로 포함한다. 약학적 조성물은 적절한 담체, 부형제, 및 수송, 전달, 내성 등을 개선하는 기타 제제와 함께 제형화된다. 다수의 적절한 제형은 모든 약사들에게 예전에 공지된 다음의 문헌에서 확인할 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. 이러한 제형은, 예를 들어, 분말, 고약, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온성 또는 음이온성) 함유 소포체(예를 들어, LIPOFECTIN제, Life Technologies, Carlsbad, CA), DNA 접합체, 무수 흡수 연고제, 수중유 및 유중수 유화제, 카보왁스 유화제(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고형성 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고형성 혼합물을 포함한다. Powell 외, "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311 참조.

[0243] 환자에게 투여되는 항원 결합 분자의 투여량은 환자의 연령 및 크기, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 바람직한 투여량은 일반적으로 체중 또는 신체 표면적에 따라 계산된다. 이중 특이적 항원 결합 분자가 성인 환자에게 치료 목적으로 사용될 경우, 이중 특이적 항원 결합 분자를 일반적으로 체중 1 kg당 약 0.01 내지 약 20 mg, 보다 바람직하게는 체중 1 kg당 약 0.02 내지 약 7 mg, 약 0.03 내지 약 5 mg, 또는 약 0.05 내지 약 3 mg의 1회 투여량으로 정맥내 투여하는 것이 유리할 수 있다. 병태의 중증도에 따라, 치료의 빈도와 기간을 조절할 수 있다. 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여하기 위한 효과적인 투여량과 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며; 예를 들어, 환자의 진행 상황에 대한 주기적 평가에 의해 모니터링하고 이에 따라 투여량을 조절할 수 있다. 또한, 투여량의 중간 스케일링은 당업계에서 잘 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Mordenti 등의 문헌[1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351] 참조).

[0244] 환자에게 투여되는 항-4-1BB 작용제의 투여량은 환자의 연령 및 크기, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 바람직한 투여량은 일반적으로 체중 또는 신체 표면적에 따라 계산된다. 항-4-1BB 작용제가 성인 환자에게 치료 목적으로 사용될 경우, 작용제를 일반적으로 체중 1 kg당 약 0.01 내지 약 20 mg, 보다 바람직하게는 체중 1 kg당 약 0.02 내지 약 7 mg, 약 0.03 내지 약 5 mg, 또는 약 0.05 내지 약 3 mg, 또는 약 2.5 mg의 1회 투여량으로 정맥내 투여하는 것이 유리할 수 있다.

[0245] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있고, 본원에서 유용한 약학적 조성물, 예를 들어, 캡슐화된 리포솜, 극미립자, 마이크로캡슐, 돌연변이체 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 엔도시토시스를 투여하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, Wu 등의 문헌[1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432] 참조). 도입 방법은 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강 내, 경막 외 및 구강 경로를 포함하되 이들로 제한되지는 않는다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면 주입 또는 볼투스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부의 내벽(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 투여이거나 국소 투여일 수 있다.

[0246] 본원에서 유용한 약학적 조성물은 표준 바늘 및 주사기를 사용하여 피하 전달되거나 정맥내 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달의 경우, 본원에서 유용한 약학적 조성물을 전달하는 데 펜 전달 장치가 용이하게 적용된다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용식이거나 일회용일 수 있다. 재사용식 펜 전달 장치에는 일반적으로 약학적 조성물이 담긴 교체식 카트리지가 사용된다. 일단 카트리지 내의 모든 약학적 조성물이 투여되어 카트리지가 비면, 빈 카트리지를 쉽게 폐기하고 약학적 조성물이 담긴 새로운 카트리지로 교체할 수 있다. 그러면, 펜 전달 장치를 재사용할 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에는 교체식 카트리지 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 약학적 조성물이 장치 내의 저장조에 미리 담긴 상태로 제공된다. 일단 저장조의 약학적 조성물이 소진되면, 전체 장치가 폐기된다.

[0247] 다수의 재사용식 펜 전달 장치 및 자가주입 전달 장치가 본원에서 유용한 약학적 조성물을 피하 전달하는 데 적용된다. 예로서 몇 가지만 거명하자면, AUTOPEN제(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC제 펜(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25제 펜, HUMALOG제 펜, HUMALIN 70/30제 펜(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN제 I, II 및 III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR제(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD제 펜(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN제, OPTIPEN PRO제, OPTIPEN STARLET제, 및 OPTICLIK제(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)이 포함되지만, 이들로 한정되지는 않는다. 본원에서 유용한 약학적 조성물을 피하 전달하는 데 적용되

는 일회용 펜 전달 장치의 예로서 몇 가지만 거명하자면, SOLOSTAR제 펜(sanofi-aventis), FLEXPEN제(Novo Nordisk), 및 KWIKPEN제(Eli Lilly), SURECLICK제 Autoinjector(Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET제(Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN(Dey, L.P.) 및 HUMIRA제 펜(Abbott Labs, Abbott Park IL)이 포함되지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0248] 특정 상황에서는, 약학적 조성물이 방출 조절 시스템으로 전달될 수 있다. 일 구현예에서, 펌프가 사용될 수 있다(Langer의 전술한 문헌; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987) 참조). 또 다른 구현예에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다(Medical Applications of Controlled Release, Langer 및 Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974) 참조). 또 다른 구현예에서, 방출 조절 시스템은 조성물의 표적에 근접하여 배치될 수 있으며, 따라서 전신 투여량의 단지 일부만을 필요로 한다(예를 들어, 전술한 Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, 115-138(1984) 참조). 다른 조절 방출 시스템은 Lange, Science 249:1527-1533(1990)에서 검토된 내용에 논의되어 있다.

[0249] 주사식 제제는 정맥 내, 피하, 피 내 및 근육 내 주사, 적가 주입 등을 위한 투여량 형태를 포함할 수 있다. 이들 주사식 제제는 공지의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사식 제제는, 예를 들어, 주사용으로 종래에 사용되는 멸균 수성 매질 또는 유성 매질에 전술한 항체 또는 이의 염을 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 제조될 수 있다. 주사용 수성 매질로서는, 예를 들어, 생리 식염수, 알코올(예를 들어, 에탄올)과 같은 적절한 가용화제와 조합하여 사용할 수 있고 글루코오스 및 기타 보조제 등을 함유하는 등장성 용액, 다가알코올(예: 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜), 비이온성 계면활성제[예를 들어, 폴리소르베이트 80, HCO-50(수소 첨가 피마자유의 폴리옥시에틸렌 (50 몰) 부가물)] 등이 있다. 유성 매질로서는, 예를 들어, 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용할 수 있는 참기름, 대두유 등이 사용된다. 따라서, 제조된 주사제는 바람직하게는 적절한 앰플에 채워진다.

[0250] 유리하게는, 전술한 경구 또는 비경구적으로 사용하기 위한 약학적 조성물은 활성 성분의 투여량에 적절히 맞춰진 단위 투여량의 투약 형태로 제조된다. 이러한 투여량 형태는, 예를 들어, 정제, 알약, 캡슐, 주사제(앰플), 좌제 등을 포함한다. 전술한 항체의 함유량은 일반적으로 단위 투여량의 투여 형태 당 약 1 내지 약 500 mg이고; 특히 주사제 형태로는, 전술한 항체가 약 1 내지 약 300 mg으로 함유되고; 다른 투여 형태로는 약 10 내지 약 500 mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

[0251] **병용 요법 및 제형**

[0252] 본 개시는 본원에 기술된 예시적인 단일 특이적 항체 또는 이중 특이적 항원 결합 분자 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물을 항-4-1BB 작용제, 및 하나 이상의 추가 치료제와 병용 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본원에서 유용한 항-4-1BB 작용제 및 이중 특이적 항원 결합 분자와 조합되거나 병용 투여될 수 있는 예시적인 추가 치료제는, 예를 들어, 다음을 포함한다: EGFR 길항제(예: 항EGFR 항체[예: 세특시맵 또는 파니투무맵] 또는 EGFR의 저분자 억제제[예: 게피티닙 또는 엘로티닙]), Her2/ErbB2와 같은 또 다른 EGFR 계열 구성원의 길항제, ErbB3 또는 ErbB4(예: 항-ErbB2, 항-ErbB3, 또는 항-ErbB4 항체 또는 ErbB2 ErbB3, 또는 ErbB4 활성의 저분자 억제제), EGFRvIII 길항제(예: EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체), cMET 길항제(예: 항-cMET 항체), IGF1R 길항제(예: 항-IGF1R 항체), B-raf 억제제(예: 베무라페닙, 소라페닙, GDC-0879, PLX-4720), PDGFR- $\alpha$  억제제(예: 항-PDGFR- $\alpha$  항체), PDGFR- $\beta$  억제제(예: 항-PDGFR- $\beta$  항체), VEGF 길항제(예: "VEGF 억제 용합 단백질"로도 본원에서 지칭되는 VEGF-Trap, 예를 들어 미국 특허 제 7,087,411호 참조, 항-VEGF 항체(예: 베바시주맵), VEGF 수용체의 저분자 키나아제 억제제(예: 수니티닙, 소라페닙, 또는 파조파닙)), DLL4 길항제(예: US 2009/0142354에 개시된 항-DLL4 항체, 예컨대 REGN421), Ang2 길항제(예: US 2011/0027286에 개시된 항-Ang2 항체, 예컨대 H1H685P), FOLH1(PSMA) 길항제, PRLR 길항제(예: 항-PRLR 항체), STEAP1 또는 STEAP2 길항제(예: 항-STEAP1 항체 또는 항-STEAP2 항체), TMPRSS2 길항제(예: 항-TMPRSS2 항체), MSLN 길항제(예: 항-MSLN 항체), CA9 길항제(예: 항-CA9 항체), 우로플라킨 길항제(예: 항-우로플라킨 항체), 등. 본원에 제공된 조성물과 유익하게 병용 투여할 수 있는 다른 제제는, 사이토카인 억제제를 포함하며, 사이토카인 억제제에는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18과 같이 사이토카인에 결합하거나 이들 각각의 수용체에 결합하는 저분자 사이토카인 억제제 및 항체가 포함된다. 본원에서 유용한 약학적 조성물(예를 들어, 본원에 개시된 것과 같은 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물)은 항-4-1BB 작용제 및 다음으로부터 선택된 하나 이상의 병용 치료제를 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여될 수도 있다: "ICE": 이포스파미드(예: Ifex®), 카보플라틴(예: Paraplatin®), 에토포시드(예: Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": 텍사메타손(예: Decadron®), 시타라빈(예: Cytosar-U®, 시토신 아라비노시드, ara-C), 시스플라틴(예: Platinol®-AQ); 및 "ESHAP": 에토포시드(예:

Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), 메틸프레드니손(예: Medrol®), 고 투여량 시타라빈, 시스플라틴(예: Platinol®-AQ).

[0253] 본 개시는 또한 본원에 언급된 항원 결합 분자 중 어느 하나 및 다음 중 하나 이상으로 이루어진 억제제를 포함하는 병용 치료제를 포함하며: VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PRLR, STEAP1, STEAP2, TMRSS2, MSLN, CA9, 우로플라킨, 또는 전술한 사이토카인 중 어느 하나, 여기서 억제제는 앵타머, 안티센스 분자, 리보자임, siRNA, 펩티바디, 나노바디 또는 항체 단편(예: Fab 단편; F(ab')<sub>2</sub> 단편; Fd 단편; Fv 단편; scFv; dAb 단편; 또는 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디 및 최소 인식 단위와 같은 기타 조작된 분자)이다. 본원에 개시된 항원 결합 분자는 항바이러스제, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드, 및/또는 NSAID와 병용 투여될 수도 있고/있거나 공동으로 제형화될 수도 있다. 본원에 개시된 항원 결합 분자는 방사선 치료 및/또는 종래의 화학요법을 또한 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여될 수도 있다.

[0254] 추가적인 치료적 활성 성분(들)은 본원에서 유용한 항원 결합 분자의 투여 직전에, 동시에, 또는 직후에 투여될 수 있다; (본 개시의 목적을 위해, 이러한 투여 요법은 항원 결합 분자를 추가적인 치료적 활성 성분과 "병용" 투여하는 것으로 간주된다).

[0255] 본 개시는, 본원에서 유용한 항원 결합 분자가 본원의 다른 곳에 기술된 것과 같은 하나 이상의 추가적인 치료적 활성 성분(들)과 공동으로 제형화되는 약학적 조성물을 포함한다.

[0256] **투여 요법**

[0257] 본 개시의 특정 구현예에 따르면, 항원 결합 분자(예: 항-MUC16 항체 또는 항-CD3/항-MUC16 이중 특이적 항원 결합 분자)의 다회 투여량이 정의된 시간 과정에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 또한, 항-4-1BB 작용제의 다회 투여량이 정의된 시간 과정에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 본 양태에 따른 방법은 각 치료제의 하나 이상의 투여량, 즉 항원 결합 분자의 하나 이상의 투여량 및 항-4-1BB 작용제의 하나 이상의 투여량을 순차적으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "순차적 투여"는 치료제, 예를 들어 항원 결합 분자의 각 투여량이 상이한 시점에, 예를 들어, 소정의 간격(예: 시간, 일, 주, 또는 월)만큼 분리된 상이한 날에 대상체에게 투여됨을 의미한다. 본 개시는, 로딩 투여량으로서 지칭되는 항원 결합 분자의 최초 1회 투여량에 이어서 항원 결합 분자의 하나 이상의 2차 투여량, 및 이어서 임의로 항원 결합 분자의 하나 이상의 3차 투여량을 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 본 개시는 로딩 투여량으로서 지칭되는 항-4-1BB 작용제의 최초 1회 투여량에 이어서 항-4-1BB 작용제의 하나 이상의 2차 투여량, 및 이어서 임의로 항-4-1BB 작용제의 하나 이상의 3차 투여량을 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0258] 용어 "최초 투여량", "2차 투여량" 및 "3차 투여량"은 본원에서 유용한 항원 결합 분자 및/또는 항-4-1BB 작용제의 시간적 투여 순서를 지칭한다. 따라서, "초기 투여량"은 치료 처방의 시작 시 투여되는 투여량("베이스라인 투여량"으로도 지칭됨); "2차 투여량"은 초기 투여 후 투여되는 투여량이고; "3차 투여량"은 2차 투여 후 투여되는 투여량이다. 최초, 2차, 및 3차 투여량은 모두 동일한 양의 항원 결합 분자(또는 항-4-1BB 작용제)를 함유할 수 있지만, 일반적으로 투여 빈도에서 서로 다를 수 있다. 그러나, 특정 구현예에서, 최초, 2차, 및/또는 3차 투여량에 함유된 항원 결합 분자(또는 항-4-1BB 작용제)의 양은 치료 과정 동안 서로 달라진다(예를 들어, 적절하게 상향 또는 하향 조절됨). 특정 구현예에서, 2가지 이상의(예: 2, 3, 4, 또는 5가지) 투여량이 치료 요법 시작 시 "로딩 투여량"으로서 투여되고, 적은 빈도수 기준으로 투여되는 후속 투여량(예: "유지 투여량")이 이어진다.

[0259] 본 개시의 예시적인 일 구현예에서, 각각의 2차 및/또는 3차 투여량은 직전 투여량의 1 내지 26주 후에 (예를 들어, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½주 또는 더 이상 후에) 투여된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 다회 투여의 순서에 있어서의 "직전 투여량(the immediately preceding dose)"이라는 문구는, 순서 상 바로 다음 투여량이 환자에게 투여되기 전에 투여되는 항원 결합 분자(또는 항-4-1BB 작용제)의 투여량을 의미하며, 이들 사이에는 개재되는 투여량이 없음을 의미한다.

[0260] 본 개시의 이러한 양태에 따른 방법은 MUC16 및 CD3에 특이적으로 결합하는 항-4-1BB 작용제, 항-MUC16 항체, 또는 이중 특이적 항원 결합 분자의 임의 수의 2차 및/또는 3차 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 1회의 2차 투여량만이 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 2회 이상의

(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상의) 2차 투여량이 환자에게 투여된다. 마찬가지로, 특정 구현예에서, 1회의 3차 투여량만이 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 2회 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상의) 3차 투여량이 환자에게 투여된다.

[0261] 다회의 2차 투여량을 포함하는 구현예에서, 각각의 2차 투여량은 다른 2차 투여량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 2차 투여량은 직전 투여량의 투여 후 1 내지 2주차에 환자에게 투여될 수 있다. 유사하게, 다회의 3차 투여량을 포함하는 구현예에서, 각각의 3차 투여량은 다른 3차 투여량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 3차 투여량은 직전 투여량의 투여 후 2 내지 4주차에 환자에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 2차 및/또는 3차 투여량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 요법의 과정에 걸쳐 달라질 수 있다. 투여 빈도는 임상 검사 후 개별 환자의 필요에 따라 의사가 치료 과정 동안 조정할 수도 있다.

[0262] **항체의 진단적 사용**

[0263] 본 개시의 이중 특이적 항체는, 예를 들어, 진단 목적으로 샘플에서 MUC16, 또는 MUC16 발현 세포를 검출 및/또는 측정하는 데 사용될 수도 있다. 예를 들어, 항-MUC16 항체 또는 이의 단편은 MUC16의 비정상 발현(예: 과발현, 발현 부족, 발현 결여 등)을 특징으로 하는 병태 또는 질환을 진단하는 데 사용될 수 있다. MUC16에 대한 예시적인 진단적 검정은, 예를 들어, 환자로부터 취득된 샘플을 항-MUC16 항체 또는 MUC16xCD3 이중특이적 항체와 분자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지된다. 대안적으로, 표지되지 않은 항-MUC16 항체 또는 항-MUC16xCD3 이중 특이적 항체가 자체적으로 검출 가능하게 표지된 보조 항체와 함께 진단 용도로 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S 또는 <sup>125</sup>I와 같은 방사성 동위원소; 플루오레세인 이소티오시아나이드 또는 로다민과 같은 형광 모이어티 또는 화학발광 모이어티; 또는 알칼라인 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 서양 고추냉이 퍼옥시다아제, 또는 루시페라아제와 같은 효소일 수 있다. 본원에서 유용한 항-MUC16xCD3 이중 특이적 항체의 또 다른 예시적인 진단적 용도는 대상체에서 종양 세포를 비침습적으로 식별하고 추적(예: 양전자 방출 단층촬영(PET) 영상화)하기 위한 목적으로 <sup>89</sup>Zr-표지된 항체, 예컨대 <sup>89</sup>Zr-테스페리옥사민-표지된 항체를 포함한다. (예를 들어, Tavaré, R. 등의 문헌 [Cancer Res. 2016 Jan 1;76(1):73-82]; 및 Azad, BB. 등의 문헌 [Oncotarget. 2016 Mar 15;7(11):12344-58] 참조.) 샘플에서 MUC16를 검출하거나 측정하는 데 사용할 수 있는 특정 예시적인 검정은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 방사성 면역분석(RIA) 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다.

[0264] 본 개시에 따른 MUC16 진단 검정에 사용될 수 있는 샘플에는 환자로부터 얻을 수 있는 임의의 조직 또는 체액 샘플이 포함되며, 이러한 샘플은 정상적인 또는 병리학적 조건 하에서 검출 가능한 양의 MUC16 단백질 또는 이의 단편을 함유한다. 일반적으로는, 건강한 대상체(예: 비정상적인 MUC16 수준 또는 활성과 관련이 있는 질환 또는 병태로 고통받지 않는 환자)로부터 취득한 특정 샘플에서 MUC16의 수준을 측정하여 MUC16의 베이스라인 수준 또는 표준 수준을 먼저 확립하게 된다. 그런 다음, MUC16의 이러한 베이스라인 수준을 MUC16 관련 질환(예: MUC16 발현 세포를 함유하는 종양)이나 병태를 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 취득한 샘플에서 측정된 MUC16의 수준과 비교할 수 있다.

[0265] **실시예**

[0266] 다음 실시예들은 당업자에게 본원에서 유용한 조성물을 제조하고 이를 사용하는 방법을 완전하게 개시하고 설명하기 위해 제시된 것으로서, 본 발명자들이 발명으로 간주하는 것의 범주를 제한하고자 하는 것이 아니다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력을 기울였으나 약간의 실험 오차와 편차에 대해서는 설명되어야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 부(parts)는 중량 부(parts by weight)이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0267] **실시예 1: MUC16 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항체의 생성**

[0268] 본 개시는 본원에 개시된 방법에 따라 유용한 항-MUC16 항체를 제공한다. 항체는 U.S. 2018/0112001호에 제공된 개시 내용에 따라 생성하였다. 본원에서 유용한 예시적인 항체는 H1H8767P 항체, 및 이 항체에 포함되는 CDR, HCVR, 및 LCVR 서열을 포함한다. 이와 같이, 예시적인 항-MUC16 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 U.S. 2018/0112001에 개시된 바와 같이 서열번호 18(본원의 서열번호 1)의 HCVR 및 서열번호 26(본원의 서열번호 3)의 LCVR을 포함한다.

[0269] 본 개시는 또한 CD3 및 뮤신 16(MUC16)에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공하며; 이러한 이중 특이적 항원 결합 분자는 본원에서 "항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 분자"로도 지칭된다. 항-MUC16/항-CD3 이중 특이

적 분자의 항-MUC16 부분은 MUC16를 발현하는 종양 세포를 표적화하는 데 유용하고, 이중 특이적 분자의 항-CD3 부분은 T 세포를 활성화하는 데 유용하다. 종양 세포 상의 MUC16 및 T 세포 상의 CD3에 동시 결합하면, 활성화된 T 세포가 표적화된 종양 세포를 유도 사멸(세포 용해)시키는 것을 용이하게 한다.

[0270] 항-MUC16 특이적 결합 도메인 및 항-CD3 특이적 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항체를 표준 방법론을 사용하여 작제하였는데, 여기서 항-MUC16 항원 결합 도메인 및 항-CD3 항원 결합 도메인은 공통 LCVR과 쌍을 이룬 구별되는 상이한 HCVR을 각각 포함한다. 예시적인 이중 특이적 항체에서, 분자는 항-CD3 항체의 중쇄, 항-MUC16 항체의 중쇄, 및 항-MUC16 항체의 공통 경쇄를 사용해 작제하였다. 다른 경우에, 이중 특이적 항체는 항-CD3 항체의 중쇄, 항-MUC16 항체의 중쇄, 및 항-CD3 항체의 경쇄 또는 다양한 중쇄 아암과 효과적으로 혼화되거나 쌍을 이루는 것으로 알려진 항체 경쇄를 사용하여 작제할 수 있다.

[0271] 예시적인 항-MUC16xCD3 이중 특이적 항체 작제물의 성분 부분의 요약은 표 1에 제시되어 있다.

**표 1**

[0272]

항-MUC16xCD3 이중 특이적 항원 결합 분자			
BSMUC16/CD3-001	MUC16-결합 아암 중쇄	CD3-결합 아암 중쇄	공통 경쇄
항체	H1H8767P	CD3-VH-G	H1H8767P
VR	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
전장 서열	서열번호 4	서열번호 5	서열번호 6

[0273] **실시예 2: 루시페라아제를 발현하는 OVCAR-3 세포를 갖는 이중 복수 모델(Xenogeneic Ascites Model)**

[0274] 4-1BB 공동 자극과 병용했을 때의 항-MUC16/항-CD3 이중 특이적 항체의 생체 내 효능을 이중 종양 모델에서 먼저 평가하였다. 이중 모델의 경우, 이전에 생체 내에서 계대한 OVCAR-3/Luc 세포주로부터의 복수 세포(0일차)를, 인간 PBMC를 생착한 후 13일차에 NSG(Nod scid gamma) 마우스에게 복강내 주사하였다. 5일차 및 8일차에, 각 군에서 5마리의 마우스를 대상으로 마우스 한 마리당 12.5 ug의 MUC16XCD3 또는 CD3-결합 대조군 단독을 복강내 투여해 치료하거나, 마우스 한 마리당 100 ug의 항-인간 4-1BB(BioXcell, Lebanon, NH의 클론 LOB122.3)와 병용으로 복강내 투여해 치료하였다. 종양 이식 후 4, 8, 12, 15, 20, 및 25일차에 생물발광 영상화(BLI; 발광 측정)에 의해 종양 부담을 평가하였다.

[0275] *이종이식 종양의 성장 및 역제의 계산*: 종양 부담을 측정하기 위해 BLI를 사용하였다. PBS에 현탁한 루시페라아제 기질 D-루시페린을 체중 1 kg(실험 시작 시 체중으로 결정함) 당 150 mg씩 마우스에게 복강내(IP) 주입하였다. 투여 10분 후, 이소플루란 마취 하에 Xenogen IVIS 시스템을 사용하여 마우스의 BLI 영상화를 수행하였다. 이미지는, 화각: D; 피사체 높이: 1.5 cm; 비닝 수준: 중간(medium); 및 노출: 0.5분으로 설정한 상태에서 획득하였다. BLI 신호는 Living Image 소프트웨어를 사용하여 추출하였다. 각 종양 덩어리 주위에 관심 영역을 그리고, 광자 강도는 p/s/cm<sup>2</sup>/sr로서 기록하였다. 통계적 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 6)을 사용해 수행하였다. BLI 결과에 대한 통계적 유의성은 독립표본 비모수 Mann-Whitney t 검정을 사용하여 결정하였다.

[0276] 표시된 데이터는 종양 이식 후 4일차에 BLI에 의해 평가했을 때의 종양 부담이다(표 2 및 도 1 참조). 통계적 유의성은 독립표본 비모수 Mann-Whitney t 검정을 사용하여 결정하였다. 4일차에는 군들 간에 종양 부담에 있어서 유의한 차이는 없었다(이는 임상시험 시작 시 모든 군이 유사한 종양 부담을 가짐을 나타냄).

**표 2**

[0277]

OVCAR-3 모델에서 종양 이식 후 4일차의 생물발광	
항체 (ug)	이식 후 4일차의 평균 휘도 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (중앙값 ± SEM)
CD3-결합 대조군 (12.5)	1.51e+05 ± 2.81e+04
MUC16XCD3 (12.5)	1.5e+05 ± 1.05e+04
CD3-결합 대조군 (12.5) + 항-4-1BB (100)	1.03e+05 ± 1.59e+04
MUC16XCD3 (12.5) + 항-4-1BB (100)	1.02e+05 ± 3.11e+04

[0278] 표 3은 종양 이식 후 25일차에 BLI에 의해 평가했을 때의 종양 부담을 보여준다(도 2도 참조). 통계적 유의성은

독립표본 비모수 Mann-Whitney t 검정을 사용하여 결정하였다. 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\* p=0.0159는 MUC16/CD3에 대한 것이고, \*\* p<0.0079는 MUC16/CD3과 항-4-1BB의 병용 요법에 대한 것임). MUC16/CD3과 항-4-1BB의 병용을 MUC16/CD3 단독과도 비교하였다(#p=0.0159). MUC16XCD3은 CD3-결합 대조군으로 치료한 후 종양 부담에 비해 12.5 ug에서 종양 부담을 유의하게 감소시켰으며, 항-4-1BB의 추가는 MUC16XCD3 단독에 의한 것보다 항종양 효능을 강화시켰다.

표 3

[0279]

OVCA-3 모델에서 종양 이식 후 25일차의 생물발광	
항체 (ug)	이식 후 25일차의 평균 휘도 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (중앙값 ± SEM)
CD3-결합 대조군 (12)	7.71e+06 ± 1.07e+06
MUC16XCD3 (12)	7.44e+03 ± 3.11e+03
CD3-결합 대조군 (12) + 항-4-1BB (100)	6.65e+06 ± 1.06e+06
MUC16XCD3 (12) + 항-4-1BB (100)	1.47e+03 ± 1.11e+02

[0280]

실시예 3: 동계 복수 모델에서의 MUC16xCD3 + 4-1BB 치료

[0281]

면역적격성 모델에서 효능을 조사하기 위해, 쥐와 CD3 유전자를 인간 CD3으로 대체하고, 마우스 MUC16 유전자의 일부를 인간 서열로 대체하였다. 생성된 마우스는 인간 CD3을 발현하는 T 세포를 가지고, 마우스는 MUC16XCD3 이중 특이적 항체가 결합하는 인간 MUC16의 일부를 함유하는 키메라 MUC16 분자를 발현한다. 마우스에게 ID8-VEGF/huMUC16 세포(인간 MUC16의 일부를 발현하도록 조작된 쥐와 난소 종양 세포주)를 복강내 이식하고, 항체를 이용한 치료를 정맥 내 투여하여 종양 이식 후 3일차에 시작하였다. 이식 후 3일차, 6일차, 및 10일차에 마우스에게 MUC16XCD3(1 mg/kg IV) 또는 CD3-결합 대조군(1 mg/kg IV)을 투여하거나, 3일차에는 이 중 하나와 항-마우스 4-1BB(2.5 mg/kg IV)를 함께 투여하고, 이어서 6일차 및 10일차에는 MUC16XCD3(1 mg/kg IV)을 2회 추가 투여하였다. 각 군에는 8~12마리의 마우스가 있었다. 복수로 인해 복부가 팽창하여 마우스의 체중이 30% 넘게 증가했을 때 마우스를 희생시켰다. 통계적 유의성은 Gehan-Breslow-Wilcoxon 방법을 사용하여 결정하였다.

[0282]

MUC16/CD3 치료는 ID8-VEGF/huMUC16 복수 모델에서 생존기간 중앙값을 유의하게 증가시켰고, 4-1BB 공동 자극을 추가했을 때 여러 마우스의 생존을 가능하게 하였다. 통계 분석을 위해, 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\*\* p=0.0026은 MUC16XCD3에 대한 것이고, \*\*\*\* p<0.0001은 MUC16XCD3과 항-4-1BB의 병용 요법에 대한 것임). 또한, 항-4-1BB의 추가가 MUC16/CD3 단독에 비해 임의의 유의한 결과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, 항-4-1BB를 MUC16/CD3 단독과 비교하였다(# p=0.0168). MUC16XCD3은 CD3-결합 대조군에 비해 생존기간 중앙값뿐만 아니라 마우스의 생존률도 증가시켰다(0에서 27%). 50%가 넘는 마우스가 생존했기 때문에 MUC16XCD3 + 항-4-1BB 병용 군에 대한 생존기간 중앙값은 정의할 수 없었다. 병용 치료 군의 총 생존율은 55%였다(표 4 및 도 3). 이러한 효과는 투여 기간 동안 유의한 체중 감소 없이 관찰되었으며, 이는 독성에 대한 관독치로 사용되었다(표 5 및 도 4).

표 4

[0283]

ID8-VEGF/huMUC16 모델에서의 생존 중앙값						
군 명칭	D3 항체 (mg/kg)	D6 항체 (mg/kg)	D10 항체 (mg/kg)	생존기간 중앙값(일)	무종양 마우스/총 마우스	생존율 (%)
대조군	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (5)	35	0/11	0
CD3 이중 특이적	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (5)	47	3/11	27
항-4-1BB	CD3-결합 대조군 (1) + 항-4-1BB (2.5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (5)	47	1/7	14
CD3 이중 특이적 + 항-4-1BB	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (5)	정의되지 않음	5/9	55

표 5

[0284]

ID8-VEGF/huMUC16 모델에서 이식 후 10일차 및 31일차(임상시험에서 첫 사망 전)의 체중 변화						
군 명칭	12일차			31일차		
	평균 체중 변화	SD	군 1과 비교한 통계 분석(이원 ANOVA)	평균 체중 변화	SD	군 1과 비교한 통계 분석(이원 ANOVA)
대조군	2.7	2.6		16.4	10.0	
CD3 이중 특이적	3.1	3.0	NS (1.0)	10.0	5.8	* (0.01)
항-4-1BB	0.42	3.5	NS (0.73)	8.7	14.0	** (0.0035)
CD3 이중 특이적 + 항-4-1BB	3.4	3.2	NS (0.99)	5.7	4.3	**** (<0.0001)

[0285]

초기 항종양 효능에 추가로, 임의의 기억 반응 및 에피토프 확산에 대해서도 마우스를 평가하였다. 이식 후 116 일차에, 무종양 마우스에게 부모 ID8-VEGF를 피하 이식을 통해 재접종하였다. 9마리의 미노출 마우스도 종양 성장을 위한 대조군으로서 포함시켰다. 표시된 데이터는 재접종 후 무종양 마우스의 수이다(표 6). MUC16XCD3으로 치료한 마우스 3마리 중 2마리는 2차 접종된 부모 종양 세포주를 제거할 수 있었고, MUC16을 발현하지 않았다. 또한, MUC16XCD3 + 항-4-1BB 병용으로 치료한 5마리 마우스 모두는 종양을 제거할 수 있었다. 이는 이들 2가지 치료 요법이 존재할 때 기억 반응이 형성될 수 있음을 보여준다.

표 6

[0286]

ID8-VEGF/huMUC16 모델에서의 기억 반응	
초기 복수 임상시험의 치료군	무종양 마우스/총 마우스
이전 임상시험에 참여하지 않은 미노출 대조군 마우스	0/9
MUC16XCD3(1) + 이소형 대조군(5)으로 이전에 치료한 마우스	2/3
MUC16xCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)로 이전에 치료한 마우스	5/5

[0287]

실시예 4: ID8-VEGF/huMUC16 모델에서의 MUC16XCD3 + 4-1BB 치료

[0288]

실시예 3과 같이, 마우스 CD3 대신에 대신 인간 CD3 및 키메라 MUC16 분자를 발현하는 마우스에게 인간 MUC16의 일부를 발현하는 쥐과 난소 종양주를 이식하였다. 3가지 투여 요법을 시험하였으며, 각 투여 요법에서 치료 당 9-10마리의 마우스를 사용하였다:

[0289]

A) 이식 후 3일차, 7일차, 및 10일차에 MUC16XCD3(1 mg/kg i.v.) 또는 CD3-결합 대조군(1 mg/kg i.v.) + 이소형 대조군(2.5 mg/kg IV) 또는 항마우스 4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 병용 투여하는 요법;

[0290]

B) 이식 후 3일차에 MUC16XCD3(1 mg/kg i.v.) + 항-마우스 4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 1회 병용 투여한 다음, 이식 후 7일차 및 10일차에 MUC16XCD3(1 mg/kg i.v.)을 투여하는 요법;

[0291]

C) 이식 후 3일차에 MUC16XCD3(1 mg/kg i.v.) 또는 CD3-결합 대조군(1 mg/kg i.v.) + 항-마우스 4-1BB(2.5 mg/kg i.v.)를 1회 병용 투여하고 더 이상 치료하지 않는 요법.

[0292]

표시된 데이터는 종양 이식 후 67일차까지의 생존 중앙값이다. 표 7 및 도 5 참조. 67일차 이전에, 복수로 인해 복부가 팽창하여 마우스의 체중이 30% 넘게 증가했을 때 마우스를 희생시켰다. 통계적 유의성은 Gehan-Breslow-Wilcoxon 방법을 사용하여 결정하였다. 통계 분석을 위해, 군을 CD3-결합 대조군과 비교하였다(\*\* p=0.002는 MUC16XCD3에 대한 것이고, \*\*\*\* p<0.0001은 MUC16XCD3과 항-4-1BB의 병용요법으로 이루어진 3개의 군에 대한 것임). 또한, 항-4-1BB와의 병용이 MUC16XCD3 단독에 비해 유의한 결과를 가졌는지 여부를 결정하기 위해, 모든 군을 이 군과 비교하였다(#p=0.011은 Gp4에 대한 경우이고(CD3 이중특이적 3회 투여 + 항-4-1BB 3회 투여), #p=0.027은 Gp5에 대한 경우이고(CD3 이중특이적 3회 투여 + 항-4-1BB의 1회만 투여), #p= 0.011은 Gp7에 대한

경우임(CD3 이중 특이적 + 항-4-1BB의 1회 투여). MUC16xCD3 + 항-4-1BB로 치료한 마우스는 효능 및 장기 생존을 입증하였다. 이러한 효과는 투여 기간 동안 유의한 체중 감소 없이 관찰되었으며, 이는 독성에 대한 관독치로 사용되었다(표 8 및 도 6).

표 7

[0293]

ID8-VEGF/huMUC16 모델에서의 생존 중앙값						
군	군 명칭	3일차 항체 (mg/kg)	7일차 항체 (mg/kg)	10일차 항체 (mg/kg)	생존기간 중앙값(일)	무종양 마우스/총 마우스
1	CD3 대조군의 3회 투여량	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	CD3-결합 대조군 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	41	0/9
2	이중특이적 항체의 3회 투여량	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	51	0/9
3	항-4-1BB의 3회 투여량	CD3-결합 대조군 (1) + 항-4-1BB (2.5)	CD3-결합 대조군 (1) + 항-4-1BB (2.5)	CD3-결합 대조군 (1) + 항-4-1BB (2.5)	44	2/10
4	이중 특이적 항체의 3회 투여량 + 항-4-1BB의 3회 투여량	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)	정의되지 않음	9/10
5	이중 특이적 항체의 3회 투여량 + 항-4-1BB의 1회 투여량	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	MUC16XCD3 (1) + 이소형 대조군 (2.5)	정의되지 않음	8/10
6	항-4-1BB의 1회 투여량	CD3-결합 대조군 (1) + 항-4-1BB (2.5) <sup>1</sup>			43.5	0/10
7	이중 특이적 항체 + 항-4-1BB의 1회 투여량	MUC16XCD3 (1) + 항-4-1BB (2.5)			정의되지 않음	9/10

표 8

[0294]

ID8-VEGF/huMUC16 모델에서 이식 후 12일차 및 30일차(임상시험에서 첫 사망 전)의 체중 변화							
군	군 명칭	12일차			30일차		
		평균 체중 변화	SD	군 1과 비교한 통계 분석(이원 ANOVA)	평균 체중 변화	SD	군 1과 비교한 통계 분석(이원 ANOVA)
1	CD3 대조군	-2.9	2.9		3.6	5.6	
2	CD3 이중특이적	-5.3	3.1	NS (0.75)	-0.8	4.9	NS (0.073)
3	항-4-1BB의 3회 투여량	-3.1	1.9	NS (1.0)	0.8	4.4	NS (0.49)
4	CD3 이중 특이적 항체의 3회 투여량 + 항-4-1BB의 3회 투여량	-5.9	2.4	NS (0.44)	-2.5	2.0	** (0.001)
5	CD3 이중 특이적 항체의 3회 투여량 + 항-4-1BB의 단 1회 투여량	-4.2	2.0	NS (0.98)	-1.9	3.5	** (0.006)
6	항-4-1BB의 1회 투여량	-3.8	3.0	NS (1.0)	2.5	13.4	NS (0.99)
7	CD3 이중 특이적 항체 + 항-4-1BB의 1회 투여량	-4.2	1.9	NS (0.98)	-2.6	2.9	*** (0.001)

[0295] 결론:

[0296] 종양 항원 MUC16(MUC16)을 표적으로 하는 CD3 이중 특이적 항체는 다수의 마우스 모델에서 전임상 효능을 나타낸다. 항-4-1BB와 병용했을 때의 MUC16xCD3은 지속적인 항종양 활성을 달성하여 마우스의 장기 생존을 유도하였

는데, 이는 공동 자극이, 진행된 병기의 고형 종양에 대해 MUC16xCD3 이중 특이적 항체의 효능을 강화시킬 수 있음을 입증한다. 이러한 효과는 마우스에서 체중 감소가 없는 상태로 관찰되었으며; 체중 감소는 독성의 관독 값으로서 사용되었다. 또한, MUC16 항원이 결여된 종양 세포의 재주입 시 기억 반응이 유도되었는데, 이는 MUC16 항원에 대한 반응에 의존하지 않는 강력한 항종양 반응을 입증하는 것이다.

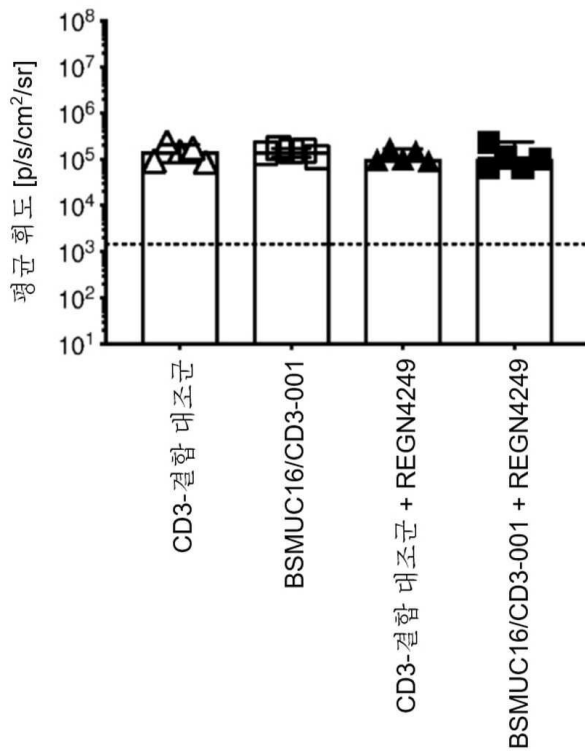
[0297]

본 발명은 본원에 기술된 특정 구현예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기술된 것들 외에, 본 발명의 다양한 변형은 전술된 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 이내에 포함되는 것으로 의도된다.

**도면**

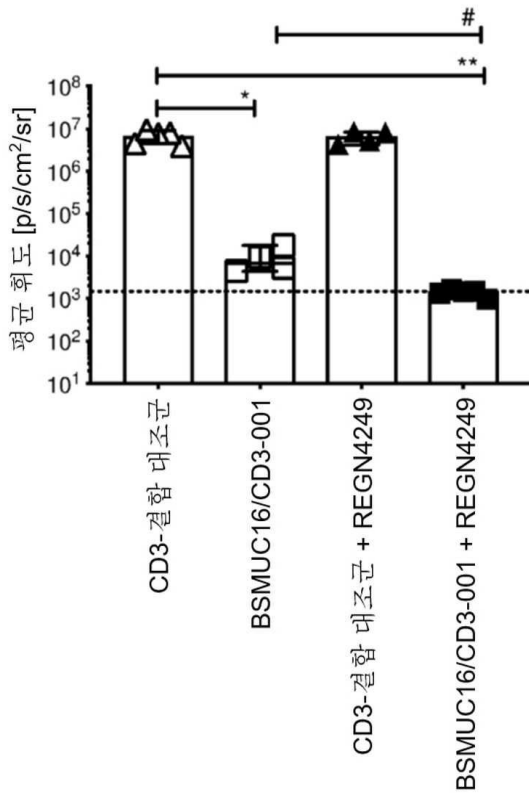
**도면1**

**OVCAR-3 모델 임상시험 1: 종양 이식 후 4 일차의 생물발광**



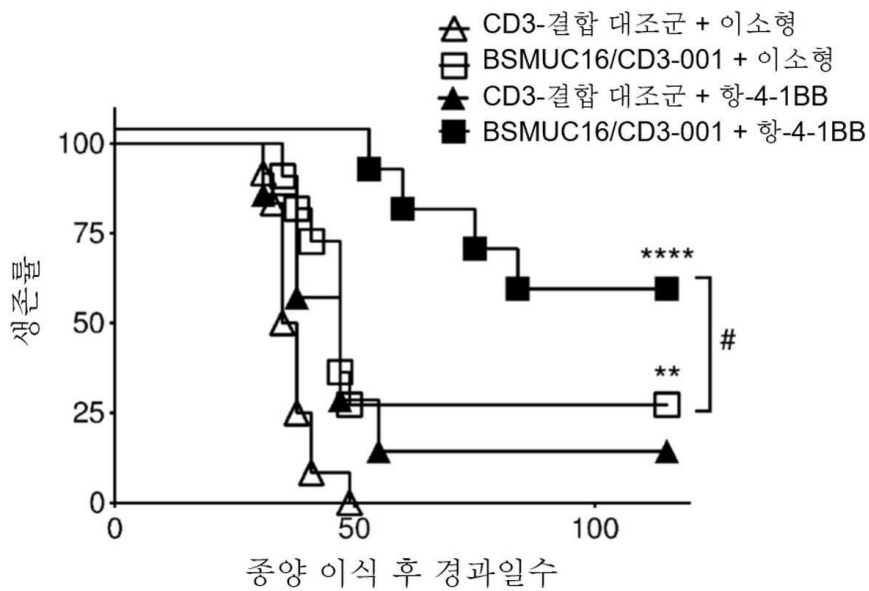
도면2

OVCAR-3 모델 임상시험 1: 종양 이식 후 25 일차의 생물발광



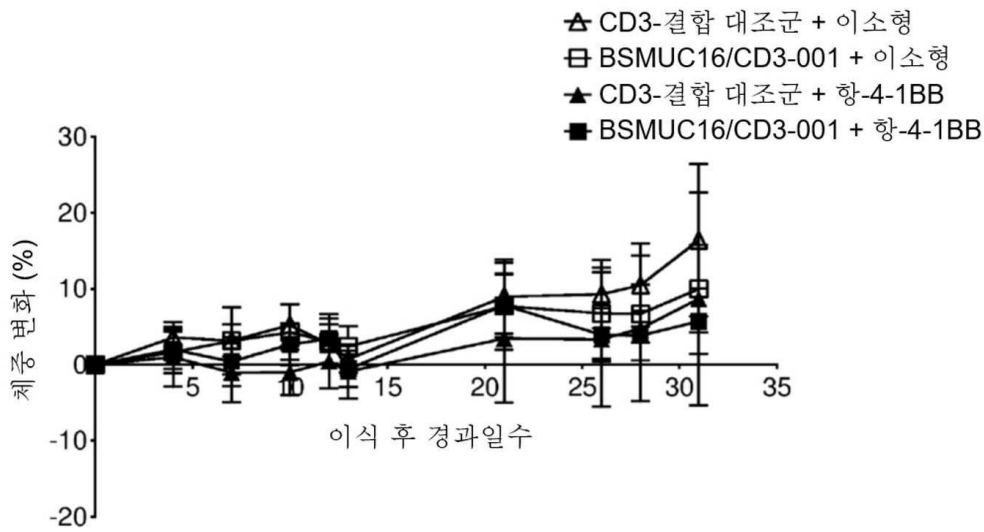
도면3

ID8-VEGF/huMUC16 모델 임상시험 2: 생존 곡선



도면4

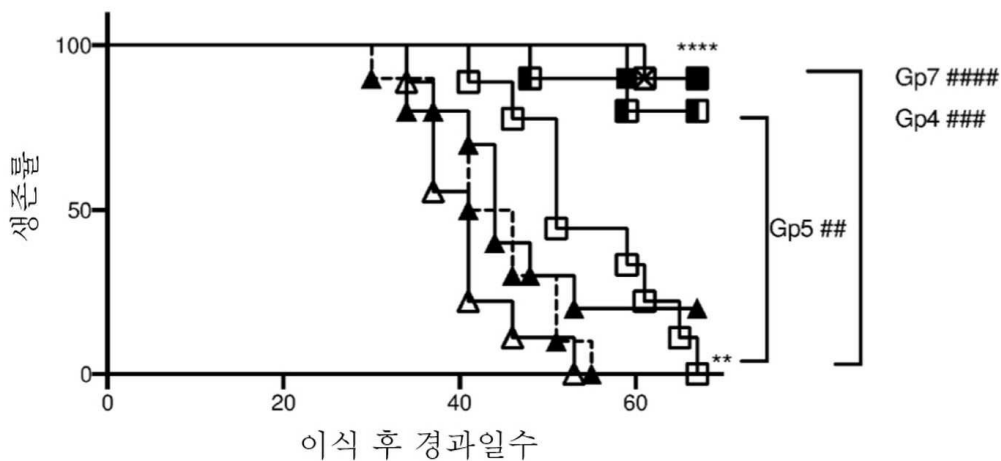
ID8-VEGF/huMUC16 모델 임상시험 2: 시간 경과에 따른 체중 변화



도면5

ID8-VEGF/huMUC16 모델 임상시험 3: 생존 곡선

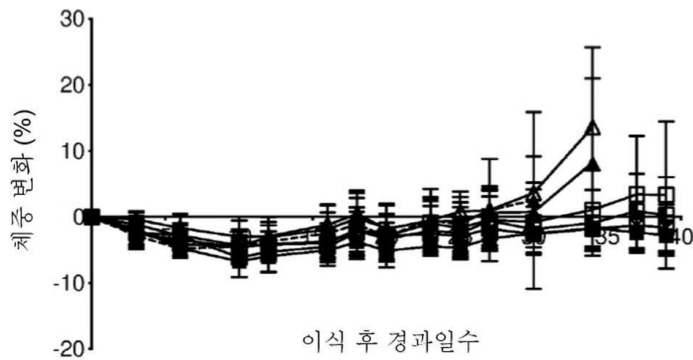
- ▲ Gp 1: CD3-결합 대조군 x3 + 이소형 x3
- Gp 2: BSMUC16/CD3-001 x3 + 이소형 x3
- ▲ Gp 3: CD3-결합 대조군 x3 + a41BB x3
- Gp 4: BSMUC16/CD3-001 x3 + a41BB x3
- ▣ Gp 5: BSMUC16/CD3-001 x3 + a41BB x1
- ▲ Gp 6: CD3-결합 대조군 x1 + a41BB x1
- ▣ Gp 7: BSMUC16/CD3-001 x1 + a41BB x1



도면6

ID8-VEGF/huMUC16 모델 임상시험 3: 체중 변화 (%)

- ▲ Gp 1: CD3-결합 대조군 x3 + 이소형 x3
- ▣ Gp 2: BSMUC16/CD3-001 x3 + 이소형 x3
- ▲ Gp 3: CD3-결합 대조군 x3 + a41BB x3
- Gp 4: BSMUC16/CD3-001 x3 + a41BB x3
- ▣ Gp 5: BSMUC16/CD3-001 x3 + a41BB x1
- ▲ Gp 6: CD3-결합 대조군 x1 + a41BB x1
- ▣ Gp 7: BSMUC16/CD3-001 x1 + a41BB x1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.  
Kirshner, Jessica R.  
Crawford, Alison  
Chiu, Danica
- <120> USE OF BISPECIFIC ANTIGEN-BINDING MOLECULES THAT BIND MUC16 AND CD3 IN COMBINATION WITH 4-1BB CO-STIMULATION
- <130> 10604W001
- <140> TBA
- <141> 2020-06-19
- <150> 62/864,960
- <151> 2019-06-21
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 117
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

                  20                    25                    30  
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45  
Ser Tyr Ile Ser Gly Arg Gly Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60  
Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe

65                    70                    75                    80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

                  85                    90                    95  
Val Lys Asp Arg Gly Gly Tyr Ser Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

                  100                    105                    110  
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

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  
Ser 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 Lys Gly Tyr Ala Asp Ser Val



<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

                  20                    25                    30  
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45  
Ser Tyr Ile Ser Gly Arg Gly Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60  
Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe

65                    70                    75                    80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

                  85                    90                    95  
Val Lys Asp Arg Gly Gly Tyr Ser Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

                  100                    105                    110  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

                  115                    120                    125  
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

                  130                    135                    140  
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145                    150                    155                    160  
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

                  165                    170                    175  
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

                  180                    185                    190  
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

                  195                    200                    205  
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210                    215                    220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 225                      230                      235                      240  
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
                                  245                      250                      255  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
                                  260                      265                      270  
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
                                  275                      280                      285  
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
                                  290                      295                      300  
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 305                      310                      315                      320  
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
                                  325                      330                      335  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
                                  340                      345                      350  
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
                                  355                      360                      365  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
                                  370                      375                      380  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
                                  385                      390                      395                      400  
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
                                  405                      410                      415  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
                                  420                      425                      430  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
                                  435                      440  
 <210> 5  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<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  
 Ser 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 Lys 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 Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr His Tyr Gly Leu Asp  
                   100                    105                    110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr 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  
 Ser 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 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
                   210                    215                    220  
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr

                  20                    25                    30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

                  35                    40                    45

Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

                  50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro

                  85                    90                    95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

                  100                    105                    110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

                  115                    120                    125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

                  130                    135                    140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145                    150                    155                    160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

                  165                    170                    175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

                  180                    185                    190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

                  195                    200                    205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

                  210                    215