



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월29일
(11) 등록번호 10-2283200
(24) 등록일자 2021년07월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7017530(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년03월13일
심사청구일자 2020년06월17일
(85) 번역문제출일자 2020년06월17일
(65) 공개번호 10-2020-0075896
(43) 공개일자 2020년06월26일
(62) 원출원 특허 10-2014-7027652
원출원일자(국제) 2013년03월13일
심사청구일자 2018년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/030636
(87) 국제공개번호 WO 2013/138400
국제공개일자 2013년09월19일
(30) 우선권주장
61/610,494 2012년03월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
US20100081796 A1*
W02009094561 A1*
Charlotte F. McDonagh et al., Molecular
Cancer Therapeutics, 11(3), pp.582-593,
2012.1.16.*
MK Robinson et al., British Journal of
Cancer, 99(9), pp.1415-1425, 2008.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리
버 로드 777
- (72) 발명자
파파도파올로스 니콜라스 제이.
미국 뉴욕 12540 라그랑지빌 헤리티지 레인 59
머피 앤드류 제이.
미국 뉴욕 10520 크로톤-온-허드슨 뉴턴 코트 10
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 18 항

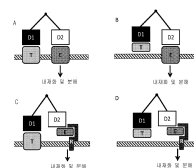
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 다중특이성 항원-결합 분자 및 그것의 용도

(57) 요약

본 발명은 다중특이성 항원-결합 분자 및 그것의 용도를 제공한다. 다중특이성 항원-결합 분자는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 첫 번째 항원-결합 도메인 및 내재화 이펙터 단백질에 특이적으로 결합하는 두 번째 항원-결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 어떤 구체예에서는, 표적 분자와 내재화 이펙터 (뒷면에 계속)

대표도



단백질 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이성 항체일 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 표적 분자와 내재화 이펙터 단백질의 동시 결합은 표적 분자 단독의 결합보다 큰 정도로 표적 분자의 활성의 약화를 유발한다. 발명의 다른 구체예에서, 표적 분자는 종양 관련된 항원이고, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 종양-관련 항원과 내재화 이펙터 단백질의 동시 결합은 종양 세포의 표적화된 사멸을 유발하거나 촉진한다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/1203 (2013.01)

C07K 16/22 (2013.01)

C07K 16/2866 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

(72) 발명자

이코노마이즈 아리스 엔.

미국 뉴욕 10591 테리타운 레그랜드 애비뉴 27

사이그너 캐서린 다이아나

미국 뉴욕 10017 뉴욕 이. 46 스트리트 140 아파트

먼트 7에스

(30) 우선권주장

61/721,831 2012년11월02일 미국(US)

61/751,286 2013년01월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

다중특이성 항원-결합 분자로서,

첫 번째 항원-결합 도메인(D1); 및

두 번째 항원-결합 도메인(D2)을 포함하고,

이때 D1은 표적 분자(T)에 특이적으로 결합하며; D2는 내재화 이펙터 단백질(E)에 특이적으로 결합하고,

T와 E는 상이한 항원이고,

E는 CD63이고,

D2는 다중특이성 항원-결합 분자가 우선적으로 T를 표적으로 하도록 D1이 T에 결합하는 것보다 저친화성으로 E에 결합하고,

다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 둘 다의 결합은 그것의 E에의 물리적 연쇄를 통한 T의 내재화 및 분해를 초래하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 2

제 1항에 있어서, E에 대한 D2의 결합 친화성이 T에 대한 D1의 결합 친화성보다 적어도 90% 더 약하거나, D2가 E와 25°C에서 표면 플라스몬 공명 분석으로 측정될 때 10 nM보다 큰 K_D 로 상호작용하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 3

제 2항에 있어서, D2는 E에 특이적으로 결합하는 리간드 또는 리간드의 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 4

제 2항에 있어서, T는 세포 표면-발현된 표적 분자인 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 5

제 1항에 있어서, T는 Nav1.7, GCGR, HLA-B27, 알레르기 유발 항원 및 종양-관련 항원(TAA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 6

제 5항에 있어서, T는 AFP, ALK, BAGE 단백질, β -카테닌, BORIS, CA9, 탄산 탈수 효소 IX, 카스파제-8, CD40, CEA, CTLA4, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질, GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질, MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, RAGE 단백질, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, 및 유로플라킨-3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 TAA인 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 7

제 4항에 있어서, D1은 T에 특이적으로 결합하는 리간드 또는 리간드의 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 8

제 1항에 있어서, T는 가용성 표적 분자인 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 9

제 8항에 있어서, T는 Fel D1 및 Betv1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 10

제 8항에 있어서, D1은 T에 특이적으로 결합하는 수용체 또는 수용체의 리간드-결합 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 11

제 1항에 있어서, D1은 그것의 항원에 대하여 pH-의존성 결합을 나타내거나, D2는 그것의 항원에 대하여 pH-의존성 결합을 나타내거나, D1과 D2 둘 다 그것들의 항원에 대하여 pH-의존성 결합을 나타내는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 12

제 11항에 있어서, D1은 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 더 낮은 친화성으로 T에 결합하거나, D2는 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 더 낮은 친화성으로 E에 결합하거나, 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 더 낮은 친화성으로 둘 다 D1은 T에 결합하고 D2는 E에 결합하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 13

제 1항에 있어서, D1은 적어도 하나의 항체 가변 영역을 포함하거나, D2는 적어도 하나의 항체 가변 영역을 포함하거나, D1과 D2 둘 다 적어도 하나의 항체 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 14

제 13항에 있어서, D1은 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하거나, D2는 HCVR 및 LCVR을 포함하거나, D1과 D2 둘 다 각각 HCVR 및 LCVR을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 15

제 14항에 있어서, 다중특이성 항원-결합 분자는 이중특이성 항체인 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 16

제 1항에 있어서, D1은 그 자체로 T에 결합하지만 T를 비활성화시키지 않는 항원-결합 분자로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 17

제 1항에 있어서, D2는 항-CD63 항체의 항원-결합 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 18

제 1항에 있어서, 다중특이성 항원-결합 분자는 약물, 독소 또는 방사성 동위원소에 포함되는 것을 특징으로 하는 다중특이성 항원-결합 분자.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 치료적 단백질, 및 특히 시험관 내 또는 생체 내에서 하나 또는 그 이상의 표적 분자를 비활성화시키거나, 차단하거나, 약화시키거나, 제거하거나 및/또는 농도를 감소시킬 수 있는 치료적 단백질의 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 치료적 치료는 자주 세포 상에서 또는 세포에 근접한 곳에서 작용하는 하나 또는 그 이상의 표적 분자의 비활성화 또는 차단을 필요로 한다. 예를 들어 항체-기초 치료제는 자주 세포 표면에서 발현된 특정 항원에, 또는 가용성 리간드에 결합하고, 그로써 항원의 정상적인 생물학적 활성을 간섭함으로써 기능한다. 예를 들어 다양한 사이토킨(예컨대 IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 등), 또는 그것들의 각각의 수용체에 대해 지시된 항체 및 다른 결합 구성물들은 광범위한 사람 질환 및 질병을 치료하는데 유용한 것으로 밝혀졌다. 이런 유형의 치료제제는 세포 신호화를 약화시키거나 억제하기 위하여 전형적으로 사이토킨과 그것의 수용체 사이의 상호작용을 차단함으로써 기능한다. 그러나 특정 맥락에서는 본질적으로 그것의 다른 성분과의 물리적 상호작용을 차단하는 것을 포함하지 않는 방식으로 표적 분자의 활성을 비활성화시키거나 억제하는 것이 유익할 수도 있다. 그런 표적 분자의 비-차단 약화가 이루어질 수 있는 한 가지 방법은 표적 분자의 세포외재성 또는 세포 표면 농도를 감소시키는 것일 수 있다. 비록 주어진 표적 분자의 양 또는 농도를 감소시키기 위한 유전자 및 핵산-기초 전략이 해당 기술분야에 공지되어 있긴 하지만, 그런 전략은 자주 치료적 환경에서 실질적인 기술적이고 복잡한 문제와 의도하지 않은 부작용이 많다. 따라서, 치료 목적에 대해 다양한 표적 분자의 비활성화 또는 약화를 촉진하기 위해 또 다른 비-차단 전략이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0003] 본 발명은 적어도 부분적으로는 표적 분자와 내재화 이펙터 단백질 사이의 물리적 연쇄를 촉진하거나 유발시킴으로써 표적 분자를 약화시키거나 비활성화시킨다는 개념을 토대로 한다. 이런 유형의 물리적인 분자간 연쇄를 통해서 표적 분자는 내재화 이펙터 단백질과 함께 세포 안으로 내재화되는 것에 박차를 가할 수 있고, 세포 내 분해기구에 의해 처리되거나 또는 그렇지 않으면 약화되거나, 격리되거나 또는 비활성화된다. 이런 메커니즘은 표적 분자와 그것의 결합 파트너 사이의 상호작용을 본질적으로 차단하지 않으면서 표적 분자의 활성을 비활성화시키거나 약화시키기 위한 신규하고 진보적인 전략을 나타낸다.

[0004] 따라서, 본 발명은 표적 분자(T) 및 내재화 이펙터 단백질(E)에 동시에 결합할 수 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 첫 번째 항원-결합 도메인(D1) 및 두 번째 항원-결합 도메인(D2)을 포함하는 다중특이성 항원-결합 분자를 제공하는데, 이때 D1은 T에 특이하게 결합하고, D2는 E에 특이하게 결합하며, 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합은 D1 단독에 의한 T의 결합보다 더 큰 정도로 T의 활성을 약화시킨다. T의 활성의 증대된 약화는 그것의 E에의 물리적 연쇄를 통한 T의 가압된 내재화/분해로 인한 것일 수 있지만, 그러나 다른 작용 메커니즘도 가능하고, 그것은 본 발명의 범주로부터 배제되지 않는다.

[0005] 또한, 본 발명은 표적 분자(T)의 활성을 비활성화시키거나 약화시키기 위하여 다중특이성 항원-결합 분자를 사용하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 T와 내재화 이펙터 단백질(E)을 다중특이성 항원-결합 분자와 접촉시킴으로써 T의 활성을 비활성화시키거나 약화시키는 방법을 제공하는데, 이때 다중특이성 항원-결합 분자는 첫 번째 항원-결합 도메인(D1) 및 두 번째 항원-결합 도메인(D2)을 포함하고, D1은 T에 특이적으로 결합하며, D2는 E에 특이적으로 결합하고; 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합은 T의 활성을 D1 단독에 의한 T의 결합보다 더 큰 정도로 약화시킨다.

[0006] 본 발명의 특정 구체예에서, D1 및/또는 D2는 적어도 하나의 항체 가변 영역을 포함한다. 예를 들어 다중특이성 항원-결합 분자는 어떤 구체예에서, 이중특이성 항체일 수 있는데, 이때 D1은 T에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 쌍을 포함하고, D2는 E에 특이적으로 결합하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함한다. 또는 다르게는 D1 및/또는 D2는 표적 분자(T) 및/또는 내재화 이펙터 단백질(E)와 특이하게 상호작용하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 만약 표적 분자가 세포 표면 수용체라면, D1은 세포 표면 수용체 표적 분자에 특이하게 결합하는 리간드의 부분을 포함할 수 있다. 유사하게, 만약 내재화 이펙터 단백질이 세포 표면 내재화 수용체라면, D2는 그 세포 표면 내재화 수용체에 특이하게 결합하는 리간드의 부분을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, D1은 T에 특이하게 결합하는 항체 가변 영역을 포함하고, D2는 E에 특이하게 결합하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 구체예에서, D1은 T에 특이하게 결합하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하고, D2는 E에 특이하게 결합하는 항체 가변 영역을 포함한다. 그러나, 어떠한 배치로든지 최종 결과는 T와 E가 직접 또는 간접적으로, 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합을 통해 물리적으로 연결될 수 있

다는 것이다.

[0007] 다른 구체예들은 다음의 상세한 설명의 개관으로부터 드러날 것이다.

도면의 간단한 설명

[0008] **도 1(패널 A 내지 D)**은 본 발명의 다중특이성 항원 결합 분자에 대한 일반적인 4가지의 예시적인 메커니즘의 개략도이다. 각각의 예시된 배치에서, D1은 첫 번째 항원-결합 도메인이고; D2는 두 번째 항원 결합 도메인이며; T는 표적 분자이고; E는 내재화 이펙터 단백질이며; R은 E에 결합할 때 내재화하는 수용체이다. **패널 A**는 T와 E가 둘 다 막-결합되어 있는 상황을 도시한다. **패널 B**는 T가 가용성이고 E가 막-결합되어 있는 상황을 도시한다. **패널 C**는 T가 막-결합되어 있고 E가 세포와 상호작용하고, E와 R의 상호작용을 통해 세포 안으로 내재화되는 가용성 단백질인 상황을 도시한다. **패널 D**는 T가 가용성이고 E가 세포와 상호작용하고, E와 R의 상호작용을 통해 세포 안으로 내재화되는 가용성 단백질인 상황을 도시한다.

도 2는 상이한 양의 시간(0, 15, 30 및 60분) 동안 DKK1-mFc 다중특이성 항원-결합 분자와의 인큐베이션 후에 두 개의 상이한 세포(FcγR1만을 발현하는 세포-1, 및 Krm2와 FcγR1을 발현하는 세포-2) 상에서 수행된 면역침전 실험의 결과를 도시한다.

도 3은 IL-4의 다양한 농도에서 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 항원 결합 단백질("ab 포함체") 또는 대조 구성물("대조표준 1" 및 "대조표준 2")의 존재 및 부재시에 Stat6-luc 리포터 HEK293 세포에 의해 생성된 상대적인 IL-4-유도된 발광을 도시한다.

도 4는 도 3에 도시된 실험과 동일한 방식으로 수행되지만, CD63 발현이 CD63에 대해 지시된 siRNA에 의해 리포터 셀라인에서 상당히 감소된 실험의 결과를 도시한다.

도 5는 도 3 및 도 4에서 도시된 실험과 유사한 방식으로 수행되지만, 리포터 세포가 다중특이성 항원 결합 단백질("Ab 포함체") 또는 대조 구성물("대조표준 1" 및 "대조표준 2")과 함께 IL-4 리간드를 첨가하기 전 2시간 또는 밤새 인큐베이션되는 실험의 결과를 도시한다. 막대 그래프의 상부 열은 정상적인 수준의 CD63을 발현하는 세포("형질전환되지 않은")에서 수행된 실험의 결과를 나타내는 반면, 막대 그래프의 아래 열은 CD63 발현이 CD63에 대해 지시된 siRNA에 의해 리포터 셀라인에서 상당히 감소된 실험의 결과를 도시한다.

도 6은 도 3 및 도 4에서 도시된 실험과 유사한 방식으로 수행되지만, 리포터 세포가 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 항원 결합 단백질("Ab 포함체") 또는 대조 구성물("대조표준 1" 및 "대조표준 2")과 함께 IL-4 리간드를 첨가하기 전 15분, 30분, 1시간 또는 2시간 동안 인큐베이션된 실험의 결과를 도시한다.

도 7은 Stat6-luc 리포터 세포가 항-IL-4R × 항-CD63 이중특이성 항체("이중특이성"), 또는 대조 구성물(항-IL-4R 단일특이성, 또는 IL-4R에만 결합하는 mock 이중특이성)의 다양한 희석물의 존재하에 10pM의 IL-4로 처리되는 실험의 결과를 도시한다.

도 8은 HEK293 세포가 도시된 바와 같은 다양한 단일특이성 및 이중특이성 항체와 함께, myc 태그 및 pH-민감성 표지(낮은 pH에서 형광 신호를 발생한다)로 표지된 SOST 구성물로 처리된 실험의 결과를 도시한다. 그 결과는 세포당 형광 반점(즉 표지된 소포)의 수의 측면으로 표시된다. **패널 A**는 3시간 동안 얼음 위에서 인큐베이션한 후의 결과를 도시하고, **패널 B**는 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후의 결과를 도시하며, **패널 C**는 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션한 후의 결과를 도시한다.

도 9는 HEK293 세포가 항-CD63 × 항-리포다당(LPS) 이중특이성 항체, 대조 항체, 또는 LPS 단독과 함께, 다양한 시간 동안 대장균(패널 A) 또는 S. 미네소타(패널 B)로부터의 형광-표지된 LPS로 처리된 후, 비-내재화된(즉 표면 결합된) 형광 발색단의 퀀칭이 이어지는 실험의 결과를 도시한다. 그러므로 형광 신호는 도시된 다양한 조건 하에서 내재화된 LPS를 반영한다. 결과는 세포당 형광 반점(즉 표지된 소포)의 수의 측면으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명을 설명하기 전에, 본 발명이 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않으며, 그런 방법 및 조건은 달라질 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구체예를 기술할 목적에 대한 것이며, 한정하는 것으로 의도되지 않은 것임이 인지되어야 하는데, 그 이유는 첨부되는 청구범위에 의해서만 본 발명의 범주가 한정될 것이기 때문이다.

[0010] 다르게 규정되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련

자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 사용된 것과 같이, 용어 "약"은 인용된 특정한 수치와 관련하여 사용될 때, 그 값이 1% 이하로 인용된 값과 다르지 않을 것임을 의미한다. 예를 들어 본원에 사용된 것과 같이, 표현 "약 100"은 99와 101을 포함하고 그 사이의 모든 값(예컨대 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)도 포함한다.

[0011] 비록 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 어떠한 방법 및 재료든지 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 본 발명에 바람직한 방법 및 재료를 이제 설명하기로 한다.

[0012] **다중특이성 항원-결합 분자**

[0013] 본 발명자들은 놀랍게도 표적 분자의 활성이 표적 분자를 다중특이성 항원-결합 분자를 경유하여 내재화 이펙터 단백질에 연결시킴으로써 약화될 수 있음을 발견하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 첫 번째 항원-결합 도메인(본원에서는 "D1"으로도 언급함), 및 두 번째 항원-결합 도메인(본원에서는 "D2"로도 언급함)을 포함하고 있는 다중특이성 항원 결합 분자를 제공한다. D1과 D2는 각각 상이한 분자에 결합한다. D1은 특이적으로 "표적 분자"에 결합한다. 표적 분자는 또한 본원에서 "T"로도 언급된다. D2는 특이적으로 "내재화 이펙터 단백질"에 결합한다. 내재화 이펙터 단백질은 본원에서 "E"로도 언급된다. 본 발명에 따르면, 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합은 T의 활성을 D1 단독에 의한 T의 결합보다 더 큰 정도로 약화시킨다. 본원에 사용되는 것과 같이, 다중특이성 항원-결합 분자의 맥락에서 "동시 결합"이라는 표현은 다중특이성 항원-결합 분자가 표적 분자(T)와 내재화 이펙터 단백질(E) 사이의 물리적 연쇄를 촉진하기 위하여 생리적으로 관련된 조건 하에서 적어도 일정 기간의 시간 동안 T와 E를 둘 다 접촉할 수 있음을 의미한다. 다중특이성 항원-결합 분자의 T 및 E 성분들의 결합은 순차적일 수 있다; 예를 들어 다중특이성 항원-결합 분자는 먼저 T에 결합한 후 E에 결합하거나, 또는 먼저 E에 결합한 후 T에 결합할 수 있다. 어떠한 경우든지, T와 E가 둘 다 다중특이성 항원-결합 분자에 의해 일정 기간의 시간 동안(결합의 순차적 순서와 관계없이) 결합되는 한, 다중특이성 항원-결합 분자는 본 개시내용의 목적에 대해 T와 E에 "동시에 결합"하는 것으로 보일 것이다. 이론적으로 구속되지는 않지만, T의 증대된 비활성화는 내재화 및 그것의 E에의 물리적 연쇄로 인한 세포 내부에서의 T의 내재화 및 분해성 경로변경에 의해 유발되는 것으로 여겨진다. 그러므로 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 표적 분자의 기능을 직접적으로 차단하거나 길항하지 않으면서 표적 분자의 활성의 비활성화 및/또는 감소 및/또는 세포 외재성 농도의 감소에 유용하다.

[0015] 본 발명에 따르면, 다중특이성 항원-결합 분자는 단일한 다중기능성 폴리펩티드일 수 있고, 또는 상호간에 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합되는 둘 또는 그 이상의 폴리펩티드의 다량체 복합체일 수 있다. 본 개시내용에 의해 명백해질 것과 같이, T 및 E 분자에 동시적으로 결합하는 능력을 가지고 있는 어떠한 항원 결합 구성물은 다중특이성 항원-결합 분자로서 간주된다. 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자, 또는 그것의 변이체 중 어느 것이든지 해당 기술분야에 통상적인 기술을 가진 사람에게 알려질 것과 같이, 표준 분자 생물 기법(예컨대 재조합 DNA 및 단백질 발현 기술)을 사용하여 구성될 수 있다.

[0016] **항원-결합 도메인**

[0017] 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 적어도 두 개의 별도의 항원-결합 도메인(D1 및 D2)을 포함한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 표현 "항원-결합 도메인"은 관심의 특별한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 어떠한 펩티드, 폴리펩티드, 핵산 분자, 스캐폴드-형 분자, 펩티드 디스플레이 분자 또는 폴리펩티드-함유 구성물을 의미한다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "특이적으로 결합하는" 등은 항원-결합 도메인이 500pM 또는 그 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 특정 항원과의 복합체를 형성하고, 통상적인 시험 조건 하에서 다른 미관련 항원에 결합하지 않는 것을 의미한다. "미관련 항원"은 상호간에 95% 미만의 아미노산 동일성을 가지는 단백질, 펩티드 또는 폴리펩티드이다.

[0018] 본 발명의 맥락에 사용될 수 있는 항원-결합 도메인의 예시적인 범주는 항체, 항체의 항원-결합 부분, 특정 항원(예컨대 펩티마이드)과 특이적으로 상호작용하는 펩티드, 특정 항원과 특이적으로 상호작용하는 수용체 분자, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 수용체의 리간드-결합 부분을 포함하는 단백질, 항원-결합 스캐폴드(예컨대 DARPs, HEAT 반복 단백질, ARM 반복 단백질, 테트라트라이코펩티드 반복 단백질, 및 자연 발생적인 반복 단백질을 토대로 한 다른 스캐폴드 등[예컨대 Boersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857, 및 본원에 인용된 참고문헌 참조]), 및 앵타머 또는 그것의 부분들을 포함한다.

[0019] 표적 분자 또는 내재화 이펙터 단백질이 수용체 분자인 특정 구체예에서, 본 발명의 목적에 대한 "항원-결합 도메인"은 수용체에 대해 특이적인 리간드 또는 리간드의 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 예를 들어

표적 분자(T)가 IL-4R이라면, 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 성분은 IL-4R과 특이적으로 상호작용할 수 있는 IL-4 리간드 또는 IL-4 리간드의 부분을 포함할 수 있고; 또는 내재화 이펙터 단백질(E)이 트랜스페린 수용체라면, 다중특이성 항원-결합 분자의 D2 성분은 트랜스페린 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있는 트랜스페린 또는 트랜스페린의 부분을 포함할 수 있다.

[0020] 표적 분자 또는 내재화 이펙터 단백질이 특별한 수용체(예컨대 가용성 표적 분자)에 의해 특이적으로 인지되는 리간드인 특정 구체예에서, 본 발명의 목적에 대한 "항원-결합 도메인"은 수용체 또는 수용체의 리간드-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 예를 들어 표적 분자(T)가 IL-6라면, 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 성분은 IL-6 수용체의 리간드-결합 도메인을 포함할 수 있고; 또는 만약 내재화 이펙터 단백질(E)이 간접적으로 내재화된 단백질(이 용어에 대해서는 다른 곳에서 정의된다)이라면, 다중특이성 항원-결합 분자의 D2 성분은 E에 대한 수용체의 리간드-결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0021] 두 개의 분자가 특이적으로 상호간에 결합하는지의 여부를 측정하기 위한 방법은 해당 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 평형 투석, 표면 플라스몬 공명 등을 포함한다. 예를 들어 본 발명의 맥락에서 사용된 항원-결합 도메인은 특별한 항원(예컨대 표적 분자[T] 또는 내재화 이펙터 단백질[E]) 또는 그것의 부분에, 표면 플라스몬 공명 분석으로 측정되는 바, 약 500pM 미만, 약 400pM 미만, 약 300pM 미만, 약 200pM 미만, 약 100pM 미만, 약 90pM 미만, 약 80pM 미만, 약 70pM 미만, 약 60pM 미만, 약 50pM 미만, 약 40pM 미만, 약 30pM 미만, 약 20pM 미만, 약 10pM 미만, 약 5pM 미만, 약 4pM 미만, 약 2pM 미만, 약 1pM 미만, 약 0.5pM 미만, 약 0.2pM 미만, 약 0.1pM 미만, 또는 약 0.05pM 미만의 K_D 로 결합하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0022] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "표면 플라스몬 공명"은 예컨대 BIAcore™ 시스템(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용하여, 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도의 변경의 검출에 의해 실시간 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 말한다.

[0023] 본원에 사용되는 것과 같이, 용어 " K_D "는 특별한 단백질-단백질 상호작용(예컨대 항체-항원 상호작용)의 평형 해리 상수를 의미한다. 다르게 표시되지 않는 한, 본원에 개시된 K_D 값은 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 25°C에서 측정된 K_D 값을 나타낸다.

[0024] 항체 및 항체의 항원-결합 단편

[0025] 상기에서 표시된 것과 같이, "항원-결합 도메인"(D1 및/또는 D2)은 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 본원에 사용된 것과 같은 용어 "항체"는 특정 항원(예컨대 T 또는 E)과 특이적으로 결합하거나 상호작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하고 있는 어떠한 항원-결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이항화 결합에 의해 상호 연결된 두 개의 무거운(H) 및 가벼운(L) 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자, 뿐만 아니라 그것의 다량체(예컨대 IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H 로 약칭됨)과 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, C_H1 , C_H2 및 C_H3 를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L 로 약칭됨)과 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인을 포함한다(C_L1). V_H 와 V_L 영역은 추가로 더 보존되고 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 영역들이 중간에 끼어 있는, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 다시 나누어질 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 세 개의 CDR과 네 개의 FR을 포함하며, 아미노-말단으로부터 카르복시-말단 쪽으로 다음 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명의 상이한 구체예에서, 발명의 항체(또는 그것의 항원-결합 부분)의 FR은 사람 생식선 서열에 동일하거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 일치 서열은 둘 또는 그 이상의 CDR의 병렬 분석을 토대로 규정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 및/또는 D2 성분은 전체 항체 분자의 항원-결합 단편을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 항체의 "항원-결합 부분", 항체의 "항원-결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 어떠한 자연적으로 발생하는, 또는 효소적으로 얻을 수 있는, 또는 유전적으로 공학처리된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은 어떠한 적당한 표준 기법, 예컨대 단백질 가수분해성 소화 또는 항체 가변 및 임의로 불변 도메인을 코드화하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 재조합 유전자 공학처리 기법을 사용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 그런 DNA는 공지되어 있거나 및/또는 예를 들면 상업적인 공급원, DNA 라이브러리(이를테면 예컨대 파지-항체 라이브

러리)로부터 쉽게 활용할 수 있거나, 또는 합성될 수 있다. DNA는 서열화되고 예를 들면 하나 또는 그 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적당한 형태로 배열하기 위해, 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하며, 아미노산을 변형, 첨가 또는 결실시키기 위해서 등의 목적을 위해 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0027] 항원-결합 단편의 비-제한적인 실례는 다음의 것들을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일-사슬 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 추가변성 영역을 모방하는 아미노산으로 구성되는 최소 인지 단위(예컨대 분리된 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들면 CDR3 펩티드), 또는 규제된 FR3-CDR3-FR4 펩티드. 다른 공학처리된 분자, 예를 들면 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결합된 항체, 키메릭 항체, CDR-그래프트된 항체, 이중체, 삼중체, 사중체, 미니바디, 나노바디(예컨대 1가의 나노바디, 2가의 나노바디 등), 작은 모듈의 면역의약품(SMIP) 및 상어 가변성 IgNAR 도메인도 또한 본원에서 사용되는 것과 같은 표현 "항원-결합 단편"에 포함된다.

[0028] 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 어떠한 크기 또는 아미노산 조성물의 것일 수 있고, 일반적으로 하나 또는 그 이상의 프레임워크 서열에 인접한 또는 그것과 한 프레임에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 결합된 V_H 도메인을 가지는 항원-결합 단편에서, V_H 및 V_L 도메인은 어떠한 적당한 배열로 상호간에 관련하여 위치할 수 있다. 예를 들어 가변 영역은 이량체일 수 있고, V_H-V_H, V_H-V_L 또는 V_L-V_L 이량체를 함유할 수 있다. 또는 다르게는, 항체의 항원-결합 단편은 단량체의 V_H 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0029] 특정 구체예에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 영역에 공유적으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원-결합 단편 내에서 찾아볼 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비-제한적이고 예시적인 형태는 다음의 것들을 포함한다: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L-C_L. 상기에서 열거된 어떠한 예시적인 형태를 포함하여, 가변 및 불변 도메인의 어떠한 형태에서든지, 가변 및 불변 도메인은 직접 상호간에 연결되거나 또는 전체 또는 부분적인 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개(예컨대 5, 10, 15, 20, 40, 60 또는 그 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있어서, 단일 폴리펩티드 분자의 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 또는 반-가요성 연쇄를 유발한다. 더욱이, 항원-결합 단편은 상기에서 열거된 어떠한 가변 및 불변 도메인 형태의 동종-이량체 또는 이종-이량체(또는 다른 다량체)를 상호간에 및/또는 하나 또는 그 이상의 단량체 V_H 또는 V_L 도메인과의 비-공유 결합으로(예컨대 이황화 결합(들)에 의하여) 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 사람 항체 및/또는 재조합 사람 항체, 또는 그것들의 단편을 포함하거나 그것들로 구성될 수 있다. 용어 "사람 항체"는 본원에서 사용되는 것과 같이, 사람 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 가지는 항체를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 사람 항체는, 예를 들면 CDR 및 특히 CDR3에 사람 생식선 면역글로불린 서열에 의해 코드화되지 않는 아미노산 잔기(예컨대 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이생성에 의해 또는 생체 내 체세포성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함한다. 그러나, 용어 "사람 항체"는 본원에서 사용되는 것과 같이, 다른 포유류 종, 예를 들면 마우스의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 사람 프레임워크 서열 위로 그래프트되어 있는 항체를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0031] 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 재조합 사람 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 용어 "재조합 사람 항체"는 본원에서 사용된 것과 같이, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 사람 항체, 예를 들면 숙주 세포 안에 형질전환된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 재조합된 조합 사람 항체 라이브러리로부터 분리된 항체(아래에서 상세하게 설명됨), 사람 면역글로불린 유전자에 대해 유전자가 도입된 동물(예컨대 마우스)로부터 분리된 항체(예컨대 Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 참조) 또는 다른 DNA 서열에 대해 사람 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 어떠한 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 그런 재조합 사람 항체는 사람 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 가진다. 그러나 특정 구체예에서, 그런 재조합 사람 항체는 시험관 내 돌연변이생성(또는 사람 Ig 서열에 대해 유전자가 도입된 동물이 사용될 때에는 생체 내 체세포성 돌연변이생성)이 이

루어지고, 그로써 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 사람 생식선 V_H 및 V_L 서열로부터 유도되고 그것과 관련되는 한편, 생체 내에서 사람 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재할 수는 없을 것이다.

[0032] **이중특이성 항체**

[0033] 특정 구체예에 따르면, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 이중 특이성 항체, 예를 들면 표적 분자(T)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 아암 및 내재화 이펙터 단백질(E)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 아암을 포함하고 있는 이중특이성 항체이다. 이중특이성 항체를 제조하는 방법은 해당 기술분야에 알려져 있고, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자를 구성하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 이중특이성 형식으로는, 제한 없이 예를 들어 scFv-기초 또는 이중체 이중특이성 형식, IgG-scFv 융합, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, 콰드로마, 구멍에 손잡이(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예컨대 구멍에 손잡이를 가지는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)바디, 로이신 지퍼, 듀오바디, IgG1/IgG2, 이중으로 작용하는 Fab (DAF)-IgG 및 Mab² 이중특이성 형식(전술한 형식의 개관을 위해서는 예컨대 Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, 및 여기에 인용된 참고문헌 참조)을 포함한다.

[0034] **다량체화 성분**

[0035] 특정 구체예에서, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 또한 하나 또는 그 이상의 다량체화 성분(들)을 포함할 수 있다. 다량체화 성분은 항원-결합 도메인들(D1 및 D2) 사이의 결합을 유지하는 기능을 할 수 있다. 본원에서 사용된 것과 같이, "다량체화 성분"은 동일하거나 유사한 구조 또는 구성의 두 번째 다량체화 성분과 결합하는 능력을 가지는 어떠한 거대분자, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 아미노산이다. 예를 들어 다량체화 성분은 면역글로불린 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다량체화 성분의 비-제한적 실례는 면역글로불린의 Fc 부분, 예컨대 아이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 각 아이소타입 그룹 내에서의 어떠한 알로타입으로부터 선택된 IgG의 Fc 도메인이다. 특정 구체예에서, 다량체화 성분은 Fc 단편 또는 적어도 하나의 시스테인 잔기를 함유하고 있는 1 내지 약 200 아미노산 길이의 아미노산 서열이다. 다른 구체예에서, 다량체화 성분은 시스테인 잔기, 또는 짧은 시스테인-함유 펩티드이다. 다른 다량체화 도메인은 로이신 지퍼, 나선-루프 모티프 또는 이중 코일 모티프를 포함하는 또는 그것으로 구성되는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0036] 특정 구체예에서, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 두 개의 다량체화 도메인, 즉 M1 및 M2를 포함하는데, 이때 D1은 M1에 부착되고 D2는 M2에 부착되며, M1의 M2와의 결합은 단일 다중특이성 항원-결합 분자에서 D1 및 D2의 상호간의 물리적 연쇄를 촉진한다. 특정 구체예에서, M1과 M2는 서로에 대해 동일하다. 예를 들어 M1은 특별한 아미노산 서열을 가지는 Fc 도메인일 수 있고, M2는 M1과 동일한 아미노산 서열을 가지는 Fc 도메인이다. 또는 다르게는, M1과 M2는 하나 또는 그 이상의 아미노산 위치에서 상호간에 다를 수 있다. 예를 들어 M1은 첫 번째 면역글로불린(Ig) C_H3 도메인을 포함할 수 있고, M2는 두 번째 Ig C_H3 도메인을 포함할 수 있으며, 이때 첫 번째 및 두 번째 Ig C_H3 도메인은 상호간에 적어도 하나의 아미노산만큼 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 동일한 M1과 M2 서열을 가지는 참조 구성물에 비교하여 단백질 A에 대한 표적화 구성물의 결합을 감소시킨다. 한 구체예에서, M1의 C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고, M2의 Ig C_H3 도메인은 H95R 변형(IMGt에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)과 같은 단백질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이를 함유한다. M2의 C_H3은 추가로 Y96F 변형(IMGt에 의함; EU에 의하며 Y436F)을 포함할 수 있다. M2의 C_H3 내에서 발견될 수 있는 추가의 변형으로는 다음과 같은 것들이 있다: IgG1 Fc 도메인의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGt에 의함; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 Fc 도메인의 경우 N44S, K52N 및 V82I (IMGt에 의함; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 Fc 도메인의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGt에 의함; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I).

[0037] **내재화 이펙터 단백질(E)**

[0038] 본 발명의 맥락에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 D2 성분은 내재화 이펙터 단백질("E")에 특이적으로 결합한다. 내재화 이펙터 단백질은 세포 안에 내재화될 수 있는 또는 그렇지 않으면 역행하는 막 트래피킹(membrane trafficking)에 관여하는 또는 그것에 기여하는 단백질이다. 어떤 경우에, 내재화 이펙터 단백질은 통과세포외 배출을 진행하는 단백질이다; 즉 단백질은 세포의 한 쪽에 내재화되고 세포의 다른 쪽으로 운반된다(예컨대 정점에서 바닥으로). 많은 구체예에서, 내재화 이펙터 단백질은 세포 표면-발현된 단백질 또는 가용성 세포외재성 단백질이다. 그러나 본 발명은 또한 내재화 이펙터 단백질이 엔도솜, 소포체, 골지, 리소솜 등과 같은 세포 내

구획 내에서 발현되는 구체에도 포함한다. 예를 들어 역행하는 막 트래피킹(예컨대 초기/재순환 엔도솜으로부터 트랜스-골지 네트워크까지의 경로)에 포함된 단백질은 본 발명의 다양한 구체예에서, 내재화 이펙터 단백질로서 작용할 수 있다. 어떠한 경우에서든지, D2의 내재화 이펙터 단백질에의 결합은 전체 다중특이성 항원-결합 분자, 및 그것과 결합되어 또한 세포 안으로 내재화되는 어떠한 분자(예컨대 D1에 의해 결합된 표적 분자)를 유발한다. 아래에서 설명되는 것과 같이, 내재화 이펙터 단백질은 세포 안으로 직접 내재화되는 단백질 뿐 아니라 세포 안으로 간접적으로 내재화되는 단백질도 포함한다.

[0039] 세포 안으로 직접 내재화되는 내재화 이펙터 단백질은 적어도 하나의 세포외재성 도메인을 가지는 막-결합된 분자(예컨대 경막 단백질, GPI-고착 단백질 등)를 포함하는데, 그것들은 세포 내재화를 진행하고, 바람직하게는 세포 내 분해 및/또는 재순환 경로를 통해 처리된다. 세포 안으로 직접 내재화되는 내재화 이펙터 단백질의 구체적인 비-제한적 실례로는 다음과 같은 것들이 있다: CD63, MHC-I (예컨대, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, 트랜스페린 수용체, LDL-수용체, LDL-관련 단백질 1 수용체, ASGR1, ASGR2, 아밀로이드 전구체 단백질-유사 단백질 2(APLP2), 아펠린 수용체(APLNR), MAL(미엘린 및 림프구 단백질, a.k.a. VIP17), IGF2R, 액포-형 H^+ ATPase, 디프테리아 독소 수용체, 엽산 수용체, 글루타메이트 수용체, 글루타티온 수용체, 랩틴 수용체, 스캐빈저 수용체(예컨대 SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) 등.

[0040] E가 직접적으로 내재화된 이펙터 단백질인 구체예에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 D2 성분은 예를 들면 E에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편, 또는 이펙터 단백질과 특이적으로 상호작용하는 리간드 또는 리간드의 부분일 수 있다. 예를 들어 만약 E가 Kremen-1 또는 Kremen-2인 경우, D2 성분은 Kremen 리간드(예컨대 DKK1) 또는 그것의 Kremen-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 다른 실례로서, 만약 E가 ASGR1과 같은 수용체 분자라면, D2 성분은 수용체(예컨대 아시알로오소뮤코이드 [ASOR] 또는 베타-GalNAc)에 특이적인 리간드 또는 그것의 수용체-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다.

[0041] 세포 안에 간접적으로 내재화된 내재화 이펙터 단백질은 그 자체 상으로는 내재화하지 않지만, 결합 후에 또는 그렇지 않으면 세포 안으로 직접 내재화되는 두 번째 단백질 또는 폴리펩티드와 결합한 후에 세포 안으로 내재화되는 단백질 및 폴리펩티드를 포함한다. 세포 안으로 간접적으로 내재화되는 단백질의 예를 들면 내재화 세포 표면-발현된 수용체 분자에 결합할 수 있는 가용성 리간드를 포함한다. 내재화 세포 표면-발현된 수용체와의 상호작용을 통하여 세포 안으로 (간접적으로) 내재화되는 가용성 리간드의 비-제한적인 실례는 트랜스페린이다. E가 트랜스페린(또는 다른 간접적으로 내재화된 단백질)인 구체예에서, D2의 E에의 결합, 및 E와 트랜스페린 수용체(또는 다른 내재화 세포-표면 발현된 수용체 분자)와의 상호작용은, E와 그것의 결합 파트너의 내재화와 동시에 세포 안으로 내재화되는 전체 다중특이성 항원-결합 분자, 및 그것들과 결합된 어떠한 분자를 유발한다.

[0042] E가 가용성 리간드와 같이 간접적으로 내재화된 이펙터 단백질인 구체예에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 D2 성분은 예를 들면 E에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편, 또는 가용성 이펙터 단백질과 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 수용체의 일부분일 수 있다. 예를 들어 만약 E가 사이토킨이면, D2 성분은 해당하는 사이토킨 수용체 또는 그것의 리간드-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다.

[0043] **표적 분자(T)**

[0044] 본 발명의 맥락 내에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 성분은 특이적으로 표적 분자("T")에 결합한다. 표적 분자는 그것의 활성 또는 세포외재성 농도가 약화되거나, 감소되거나 제거되는 어떠한 단백질, 폴리펩티드 또는 다른 거대분자이다. 많은 경우에, 그것에 D1이 결합하는 표적 분자는 단백질 또는 폴리펩티드[즉 "표적 단백질"]이지만, 본 발명은 또한 표적 분자("T")가 탄수화물, 당단백질, 지질, 리포단백질, 리포다당 또는 그것에 D1이 결합하는 다른 비-단백질 중합체 또는 분자인 구체예들을 포함한다. 본 발명에 따르면, T는 세포 표면-발현된 표적 단백질 또는 가용성 표적 단백질일 수 있다. 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 표적 결합은 세포외재성 또는 세포 표면 맥락에서 일어날 수 있다. 그러나 특정 구체예에서, 다중특이성 항원-결합 분자는 세포 내부에서, 예를 들면 소포체, 골지, 엔도솜, 리소솜 등과 같은 세포내 구획 내에서 표적 분자와 결합한다.

[0045] 세포 표면-발현된 표적 분자의 실례로는 세포 표면-발현된 수용체, 막-결합 리간드, 이온 채널 및 어떠한 다른 단량체 또는 세포막에 부착되거나 그것과 결합된 세포외재성 부분을 가지는 다량체 폴리펩티드 성분을 포함한다. 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자에 의해 표적화될 수 있는 비-제한적이고 예시적인 세포 표면-발현된 표적 분자로는, 예를 들면 사이토킨 수용체(예컨대 IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 등에 대한 수용체)뿐만 아니라, 세포표면 표적, 이를테면 다른 유형 1 경막 수용체, 예컨대 PRLR, G-단백질 결합된 수용체, 예를 들면 GCGR, 이온 채널, 예를 들면 Nav1.7, ASIC1 또는 ASIC2, 비-수용체 표면 단백질, 예를 들

면 MHC-1(예컨대 HLA-B*27) 등이 있다.

[0046] T가 세포 표면-발현된 표적 단백질인 경우, 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 성분은 예를 들면 T에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편, 또는 세포 표면-발현된 표적 단백질과 특이적으로 상호작용하는 리간드 또는 리간드의 부분일 수 있다. 예를 들어 만약 T가 IL-4R이라면, D1 성분은 IL-4 또는 그것의 수용체-결합 부분을 포함하거나 또는 그것으로 구성될 수 있다.

[0047] 가용성 표적 분자의 실례로는 사이토킨, 성장 인자 및 다른 리간드 및 신호화 단백질을 포함한다. 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자에 의해 표적화될 수 있는 비-제한적인 예시적인 가용성 표적 단백질은 예를 들면 IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, SOST, DKK1 등을 포함한다. 가용성 표적 분자는 또한 예를 들면 알레르기 유발 항원과 같은 비-사람 표적 분자(예컨대 Fel D1, Betv1, CryJ1), 병원체(예컨대 칸디다 알비칸스, S. aureus 등), 및 병원성 분자(예컨대 리포다당[LPS], 리포테이코산[LTA], 단백질 A, 독소 등)를 포함한다. T가 가용성 표적 분자인 구체예에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 D1 성분은 예를 들면 T에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편, 또는 가용성 표적 분자와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 수용체의 부분일 수 있다. 예를 들어 만약 T가 IL-4라면, D1 성분은 IL-4R 또는 그것의 리간드-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다.

[0048] 표적 분자는 또한 본원의 다른 곳에서 기술되는 것과 같이, 종양-관련 항원을 포함한다.

[0049] pH-의존성 결합

[0050] 본 발명은 첫 번째 항원-결합 도메인(D1) 및 두 번째 항원-결합 도메인(D2)을 포함하는 다중특이성 항원-결합 분자를 제공하는데, 이때 하나 또는 둘 다의 항원-결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 그것의 항원(T 또는 E)에 pH-의존성 방식으로 결합한다. 예를 들어 항원-결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 그것의 항원에 대해 감소된 결합을 나타낼 수 있다. 또는 다르게는, 항원-결합 도메인(D1 및/또는 D2)은 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 그것의 항원에 대해 증대된 결합을 나타낼 수 있다. pH-의존성 결합 특징을 가지는 항원-결합 도메인은 예를 들면 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 특별한 항원에 대한 감소된(또는 증대된) 결합에 대해 항체의 집단을 선별함으로써 얻어질 수 있다. 추가로, 아미노산 수준에서의 항원-결합 도메인의 변형은 pH-의존성 특징을 가지는 항원-결합 도메인을 생성할 수 있다. 예를 들어 항원-결합 도메인(예컨대 CDR 내부의) 항원-결합 도메인의 하나 또는 그 이상의 아미노산을 히스티딘 잔기로 치환함으로써, 중성 pH와 관련하여 산성 pH에서 감소된 항원-결합을 나타내는 항원-결합 도메인이 얻어질 수 있다.

[0051] 특정 구체예에서, 본 발명은 중성 pH에서 그것의 각각의 항원(T 또는 E)에의 결합에 대한 D1 및/또는 D2의 K_D 보다 적어도 약 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 그 이상의 배수만큼 더 큰 K_D 로 산성 pH에서 그것의 각각의 항원에 결합하는 D1 및/또는 D2 성분을 포함하고 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 포함한다. pH 의존성 결합은 또한 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 그것의 항원에 대한 항원-결합 도메인의 $t_{1/2}$ 의 관점으로 표시될 수 있다. 예를 들어 본 발명은 중성 pH에서 그것의 각각의 항원(T 또는 E)에의 결합에 대한 D1 및/또는 D2 성분의 $t_{1/2}$ 보다 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 또는 그 이상의 배수만큼 더 짧은 $t_{1/2}$ 로 산성 pH에서 그것의 각각의 항원에 결합하는 D1 및/또는 D2 성분을 포함하는 다중특이성 항원-결합 분자를 포함한다.

[0052] 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 감소된 항원 결합을 나타내는 D1 및/또는 D2 성분을 포함하는 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 동물 대상에게 투여될 때, 특정 구체예에서 pH-의존성 결합 특징을 나타내지 않는 비교할만한 분자에 비교하여 순환계로부터 더 느린 소멸을 나타낼 수 있다. 본 발명의 이런 측면에 따르면, 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 감소된 항원 결합을 갖지 않는 비교할만한 항원-결합 분자와 관련하여 순환계로부터 적어도 2배 더 느린 소멸을 나타내는, 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 T 및/또는 E의 어느 하나에 감소된 항원 결합을 가지는 다중특이성 항원-결합 분자가 제공된다. 소멸 속도는 항체의 반감기의 관점으로 표시될 수 있는데 이때 더 느린 소멸이 더 긴 반감기와 상관관계가 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 것과 같이, 표현 "산성 pH"는 6.0 또는 그 이하의 pH를 의미한다. "산성 pH"란 표현은 약 6.0, 5.95, 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. 본원에서 사용되는 것과 같이, 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.

[0054] **표적 분자 활성의 약화**

[0055] 본원의 다른 곳에서 주지되는 것과 같이, 그리고 아래의 실시예에 의해 증명되는 것과 같이, 본 발명자들은 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 표적 분자(T)와 내재화 이펙터 분자(E)의 동시 결합이 T의 활성을 다중특이성 항원-결합 분자 단독의 첫 번째 항원-결합 도메인(D1)에 의한 T의 결합보다 더 큰 정도로 약화시킨다는 것을 발견하였다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 표현 "D1 단독에 의한 결합보다 더 큰 정도로 T의 활성을 약화시킨다"는 것은 T의 활성이 E를 발현하는 세포를 사용하여 측정될 수 있는 분석에서, 다중특이성 항원-결합 분자의 존재 하에 측정된 T 활성의 수준이 D1 자체만을 함유하고 있는(즉 두 번째 항원-결합 도메인(D2)에 물리적으로 연결되지 않은) 대조 구성물의 존재 하에 측정된 T 활성의 수준보다 적어도 10% 더 적은 것을 의미한다. 예를 들어 다중특이성 항원-결합 분자의 존재하에 측정된 T 활성의 수준은 D1 자체만을 함유하고 있는 대조 구성물의 존재하에 측정된 T 활성의 수준보다 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 더 낮다.

[0056] 다중특이성 항원-결합 분자가 D1 도메인 단독에 의한 표적 분자의 결합보다 더 큰 정도로 표적 분자의 활성을 약화시키는지의 여부를 측정하기 위한 비-제한적이고 예시적인 분석 형식이 아래의 실시예 1 및 2에 제시된다. 예를 들어 실시예 1에서, "T"는 인터류킨-4 수용체(IL-4R)이고, "E"는 CD63이다. 실시예 1의 다중특이성 항원-결합 분자는 스트렙트아비딘/비오틴 링커를 경유하여 항-CD63 mAb에 연결된 항-IL-4R mAb를 포함하는 2-항체 포합체이다. 그러므로, 이 예시적인 구성물에서 "D1"은 항-IL-4R 항체의 항원-결합 도메인(HCVR/LCVR 쌍)이고, "D2"는 항-CD63 항체의 항원-결합 도메인(HCVR/LCVR 쌍)이다. 실시예 1 및 2의 실험을 위해서, IL-4R 활성이 외인성 IL-4 리간드의 첨가에 의해 자극될 때 리포터 신호를 생성하는 세포-기저 분석 형식이 사용되었다. 다중특이성 항원-결합 분자의 존재 하에 검출된 IL-4-유도된 리포터 활성의 양은 무관한 대조 면역글로불린(대조표준 1)에 연관되거나, 또는 물리적으로 연결되지는 않지만 항-CD63 항체(대조표준 2)와 조합된 항-IL-4R 항체를 함유하고 있는 대조 구성물의 존재 하에 검출된 IL-4-유도된 리포터 활성의 양과 비교되었다. 그로써 대조 구성물은 T가 D1 단독에 의해 결합되는(즉 D1은 다중특이성 항원-결합 분자 자체의 일부가 아니다) 상태를 유발한다. 만약 다중특이성 항원-결합 분자의 존재 하에 관찰된 표적 분자 활성의 크기(리포터 신호에 의해 나타냄)가 D2 성분에 물리적으로 연결되지 않은 D1 성분을 포함하고 있는 대조 구성물(예컨대 대조표준 1 또는 대조표준 2)의 존재 하에 관찰된 표적 분자의 양보다 적어도 10% 더 적다면, 본 발명의 목적에 대해, "다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합은 D1 단독에 의한 T의 결합보다 더 큰 정도로 T의 활성을 약화시킨다"고 결론지을 수 있다.

[0057] D1 단독에 의한 T의 결합은 어떤 구체예에서는, T의 활성의 부분적인 약화를 유발한다(리포터 세포의 항-IL-4R 항체 단독[즉 대조표준 1 및 2]으로의 처리는 미처리 세포에 비교하여 IL-4 신호화의 작은 수준의 약화를 유발하였다). 다른 구체예에서, D1 단독에 의한 T의 결합은 T의 활성의 검출할 수 없을 정도의 약화를 유발할 것이다; 즉 T의 생물학적 활성은 D1 단독에 의한 T의 결합에 의해 영향을 받지 않을 수 있다. 그러나 어떤 경우든, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T와 E의 동시 결합은 D1 단독에 의한 T의 결합보다 큰 정도로 T의 활성을 약화시킬 것이다.

[0058] 본원에서 예시된 분석 형식(들)에 대한 대체 분석 형식 및 변화는 그것에 대해 어떠한 주어진 다중특이성 항원-결합 분자가 지시될 수 있는 특이한 표적 분자 및 이펙터 단백질의 특성을 고려하여 해당 기술분야의 숙련자들에게 분명해질 것이다. 어떠한 그러한 형식은 본 발명의 맥락에서, 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 T 및 E의 동시 결합이 D1 단독에 의한 T의 결합보다 큰 정도로 T의 활성을 약화시키는 지를 측정하기 위하여 사용될 수 있다.

[0059] **종양 표적화**

[0060] 본 발명의 다른 측면으로, 다중특이성 항원-결합 분자는 종양 세포를 표적화하는 데 유용하다. 본 발명의 이런 측면에 따르면, D1이 결합하는 표적 분자 "T"는 종양-관련 항원이다. 특정한 경우에, 종양-관련 항원은 통상적으로 내재화되지 않는 항원이다. D2가 결합하는 내재화 이펙터 단백질은 종양 특이적일 수 있거나, 또는 개체의 종양 및 비-종양 세포 둘 다에서 발현될 수 있다. 본원의 다른 곳에서 언급된 어떠한 내재화 이펙터 단백질이든 지 본 발명의 항-종양 용도에 대해 표적화될 수 있다.

[0061] 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "종양-관련 항원"은 종양 세포의 표면에서 우선적으로 발현되는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다. 본 맥락에서 사용되는 것과 같은 표현 "우선적으로 발현되는"은 항원이 비-종양 세포 상에서의 항원의 발현 수준보다 적어도 10% 더 큰(예컨대 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 150%, 200%, 400% 또는 그 이상) 수준으로 종양 세포상에서 발현되는 것을 의미한다. 특정 구체예

에서, 표적 분자는 망막 종양 세포, 결장 종양 세포, 유방 종양 세포, 난소 종양 세포, 피부 종양 세포, 폐 종양 세포, 전립선 종양 세포, 췌장 종양 세포, 교아세포종 세포, 두경부 종양 세포 및 흑색종 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 세포의 표면상에서 우선적으로 발현된다. 특이한 종양-관련 항원의 비-제한적인 실례로는 예를 들면 다음과 같은 것들이 있다: AFP, ALK, BAGE 단백질, β -카테닌, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산 탈수 효소 IX, 카스파제-8, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(예컨대 GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(예컨대, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 및 -12), MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ES01, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, 서바이빈, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, 티로시나제 및 유로플라킨-3.

[0062] 본 발명의 이 측면에 따르는 다중특이성 항원-결합 분자는 약물, 독소, 방사성 동위원소 또는 세포의 생존성에 해로운 다른 물질에 포함될 수 있다. 또는 다르게는, 약물 또는 독소는 세포를 직접적으로 사멸하지는 않지만, 세포를 다른 외부 제제에 의한 사멸에 보다 취약하게 만드는 물질일 수 있다. 종양 표적화를 포함하는 또 다른 구체예에서, 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자는 그 자체로는 약물, 독소 또는 방사성 동위원소에 포함되지 않지만, 대신 표적(T)에 특이적인 두 번째 항원-결합 분자(본원에서는 "공모 분자(accomplice molecule)"로 언급됨)와 조합하여 투여되며, 이때 그 공모 분자는 약물, 독소 또는 방사성 동위원소에 포함된다. 그런 구체예에서, 다중특이성 항원 결합 분자는 바람직하게는 공모 분자에 의해 인지된 에피토프와 구별되거나 및/또는 중복되지 않는 표적 분자(T) 상의 에피토프에 결합할 것이다(즉 다중특이성 항원-결합 분자와 공모 분자의 표적에의 동시 결합을 허용하기 위해).

[0063] 관련된 구체예에서, 본 발명은 또한 항-종양 조합 및 치료 방법을 포함하는데, 그것은 (a) 종양-관련 항원에 특이적으로 결합하는 독소- 또는 약물-포함된 항원-결합 분자; 및 (b) (i) 내재화 이펙터 단백질에 특이적으로(예컨대 낮은 친화성으로) 결합하는 첫 번째 결합 도메인 및 (ii) 독소- 또는 약물-포함된 항원-결합 분자에 특이적으로 결합하는 두 번째 결합 도메인을 포함하고 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 포함한다. 이 구체예에서, 다중특이성 항원-결합 분자는 독소- 또는 약물-포함된 항원-결합 분자를 내재화 이펙터 단백질에 연결시키는 기능을 하고, 그로써 종양 관련된 항원을 내재화 이펙터 단백질에 물리적으로 연결시키는 기능을 한다. 독소-표지된 항-종양-관련 항원 항체의 그것의 내재화 이펙터 단백질에의 연결을 통한 내재화는 결과적으로 표적화된 종양 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0064] 본 발명의 종양-표적화 측면의 특정 구체예에 따르면, 다중특이성 항원-결합 분자(또는 공모 항체)는 다음의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 세포독성 약물에 포함될 수 있다: 칼리케아미신, 에스페라미신, 메소트렉세이트, 독소루비신, 펠팔란, 클로르암부실, ARA-C, 빈데신, 미토마이신 C, 시스-플라티늄, 에토포시드, 블레오마이신, 5-플루오로우라실, 에스트라무스틴, 빈크리스틴, 에토포시드, 독소루비신, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀, 오라탁셀, 도세탁셀, 돌라스타틴 10, 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 PHE 및 마이탄신-기초 화합물(예컨대 DM1, DM4 등). 다중특이성 항원-결합 분자(또는 공모 항체)는 또한, 또는 다르게는, 디프테리아 독소, 슈도모나스 아에루기노사 외독소 A, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레유라이테스 포르디이 단백질, 다이안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나 단백질 등과 같은 독소에 포함될 수 있다. 다중특이성 항원-결합 분자(또는 공모 항체)는 또한, 또는 다르게는, ^{225}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{186}Rh , ^{188}Rh , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}Y , ^{67}Cu , ^{125}I , ^{123}I , ^{77}Br , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{64}Cu , ^{121}Pb , ^{224}Ra 및 ^{223}Ra 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 방사성 동위원소에 포함될 수 있다. 그러므로 본 발명의 이 측면은 항체-약물 포함체(ADC) 또는 항체-방사성 동위원소 포함체(ARC)인 다중특이성 항원-결합 분자를 포함한다.

[0065] 종양 사멸 용도의 맥락에서, D2 성분은 특정 상황에서, 내재화 이펙터 단백질 "E"에 저친화성으로 결합할 수 있다. 그러므로, 다중특이성 항원-결합 분자는 우선적으로 종양-관련 항원을 발현하는 종양 세포를 표적으로 할 것이다. 본원에서 사용된 것과 같이, "저친화성" 결합은 내재화 이펙터 단백질(E)에 대한 D2 성분의 결합 친화성이 표적 분자(T)에 대한 D1 성분의 결합 친화성보다 적어도 10% 더 약한(예컨대 15% 더 약한, 25% 더 약한, 50% 더 약한, 75% 더 약한, 90% 더 약한, 등등) 것을 의미한다. 특정 구체예에서, "저친화성" 결합은 D2 성분이 내재화 이펙터 단백질(E)과 약 25°C에서 표면 플라즈몬 공명 분석으로 측정되는 것과 같이, 약 10nM 내지 약 1 μM 보다 큰 K_D 로 상호작용하는 것을 의미한다.

[0066] 내재화 이펙터 단백질과 종양-관련 항원에 대한 다중특이성 항원-결합 분자의 동시 결합은 종양 세포 안으로의

다중특이성 항원-결합 분자의 우선적인 내재화를 유발할 것이다. 만약 예를 들어 다중특이성 항원-결합 분자가 약물, 독소 또는 방사성 동위원소에 포함된다면(또는 만약 다중특이성 항원-결합 분자가 약물, 독소 또는 방사성 동위원소에 포함된 공모 항체와 조합하여 투여된다면), 종양-관련 항원의 그것의 다중특이성 항원-결합 분자에의 연쇄를 통한 종양 세포 안으로의 표적화된 내재화는 매우 특이한 종양 세포 사멸을 유발할 것이다.

[0067] 약제학적 조성물 및 투여 방법

[0068] 본 발명은 다중특이성 항원-결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적당한 담체, 부형제 및 개선된 수술, 전달, 내성 등을 제공하는 다른 제제와 함께 제형될 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 표적 분자(T)의 활성을 비활성화 또는 약화시키기 위한 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 본원에 기술된 것과 같은 다중특이성 항원-결합 분자와 표적 분자를 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 이 측면에 따르는 방법은 환자를 위해 표적 분자의 세포외재성 농도를 비활성화, 약화 또는 그렇지 않으면 감소시키는 것이 바람직하거나 및/또는 유익한 환자에게 다중특이성 항원-결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것으로 이루어진다.

[0070] 다양한 전달 시스템이 해당 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 투여 방법으로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강 내, 경막 외 및 구강 경로를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 어떠한 편리한 경로에 의해, 예를 들면 주입 또는 거환 주사에 의해, 상피 또는 점막피부의 라이닝(예컨대 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성 제제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성일 수도 있고 국소적일 수도 있다. 예를 들어 본 발명의 약제학적 조성물은 표준 바늘 및 주사기를 사용하여 피하로 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 또한 피하 전달과 관련하여, 본 발명의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하기 위해 펜 전달 장치가 사용될 수 있다.

[0071] 실시예

[0072] 다음의 실시예는 해당 기술분야의 숙련자들에게 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간조하는 것의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 수(예컨대 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 많은 노력이 기울여졌지만 약간의 실험적 실수와 편차는 확인되어야 한다. 다르게 표시되지 않는 한, 부는 중량 부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0073] 실시예 1. 내재화 이펙터 단백질과의 연쇄를 통하여 세포 표면 수용체의 분해를 유도하기 위한 다중특이성 항원-결합 분자의 사용

[0074] 초기의 개념 입증 실험으로서, (a) 내재화 이펙터 분자와 (b) 세포 표면 수용체 표적 분자를 결합시킬 수 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 만들었다. 이 실시예에서, 내재화 이펙터 단백질은 Kremen-2(Krm2)이고, 세포 표면 수용체 표적 분자는 Fc 수용체(Fc γ R1[Fc-감마-R1])이다.

[0075] Kremen 분자(Krm1 및 Krm2)는 분자 LRP5 및 LRP6을 신호화하는 WNT 경로의 내재화 및 분해를 지시함으로써 WNT 신호화를 중재하는 것으로 알려져 있는 세포-표면 단백질이다. LRP5/6의 내재화는 가용성 상호작용 단백질 DKK1을 통하여 이루어진다. 특히 DKK1은 Kremen을 세포 표면 상에서 LRP5/6에 연결시키고, 이 연쇄로 인하여 Kremen의 내재화는 LRP5 및 LRP6의 내재화 및 분해를 가동시킨다(Li et al., PLoS One 5(6):e11014).

[0076] 본 발명자들은 Fc γ R1의 내재화를 유도하기 위하여 DKK1의 Kremen-결합 특성과 Kremen의 내재화 특성을 이용하려고 노력하였다. Fc γ R1의 Kremen-중재된 내재화/분해를 촉진하기 위하여, 마우스 Fc에 융합된 DKK1으로 구성된 다중특이성 항원-결합 분자를 구성하였다(DKK1-mFc, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 가짐). 본원의 다른 곳에서 설명되는 것과 같이, 다중특이성 항원-결합 분자는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 첫 번째 항원-결합 도메인(D1) 및 내재화 이펙터 단백질에 특이적으로 결합하는 두 번째 항원-결합 도메인(D2)을 포함하는 분자로서 규정된다. 이 개념 입증 실시예에서, "첫 번째 항원-결합 도메인"은 표적 분자 Fc γ R1에 특이적으로 결합하는 mFc 성분이고, "두 번째 항원-결합 도메인"은 내재화 이펙터 단백질 Kremen에 특이적으로 결합하는 DKK1 성분이다.

[0077] DKK1-mFc가 Kremen-의존성 방식으로 세포 안으로 이물질로서 흡수될 수 있는 지를 측정하기 위한 실험을 먼저 수행하였다. 이 실험을 위하여, 두 개의 셀라인을 사용하였는데, 세포-1은 Fc γ R1을 발현하지만 Kremen-2는 발현하지 않는 HEK293 셀라인이고, 세포-2는 Fc γ R1과 Kremen-2를 둘 다 발현하도록 공학처리된 HEK293 셀라인이

다. DKK1-mFc 조건 배지의 1:10 희석액을 각각의 셀라인에 첨가하고, 37℃에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 90분의 인큐베이션 후에, 세포를 Alexa-488-표지된 항-마우스 IgG 항체로 염색하여 DKK1-mFc 분자를 검출하였다. 형광 현미경을 사용하여 실제로 DKK1-mFc 분자가 세포-1(Kremen이 없음) 내부에 위치하지 않았음을 관찰하였다; 그러나, Kremen-2를 발현하는 세포-2 내부에서는 실질적인 양의 DKK1-mFc가 검출되었다. 그러므로 이들 결과는 다중특이성 항원-결합 분자 DKK1-mFc가 Kremen-의존성 방식으로 세포 내에 내재화될 수 있음을 보여준다.

[0078] 다음으로, 시간-경과 실험을 수행하여 DKK1-mFc가 Kremen-의존성 방식으로 Fc γ R1 분해를 유도할 수 있는지를 측정하였다. 실험 프로토콜을 간단하게 설명하면 다음과 같다: 세포-1(Fc γ R1만을 발현함) 및 세포-2(Kremen-2와 Fc γ R1을 발현함)를 2mg/ml의 NHS-Sulfo-비오틴으로 15분 동안 얼음 위에서 처리하여 모든 세포 표면 발현 단백질을 표지하였다. 그런 다음 세포를 세척하고 400 μ l의 배지로 재현탁한 후, 100 μ l씩의 일정액으로 넷으로 나누어 다른 시간 동안(0분, 15분, 30분 및 60분) 37℃에서 DKK1-mFc로 처리하였다. DKK1-mFc 인큐베이션 후에, 세포를 펠릿화하고 프로테아제 억제제로 처리하였다. 상이한 인큐베이션 시간 지점으로부터의 세포 용해물을 Fc γ R1 면역침전화하였다. Fc γ R1 면역침전을 위하여, 마우스 항-Fc γ R1 항체를 세포 용해물에 첨가하고, 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 단백질을 G 비드를 첨가하고 그 혼합물을 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 비드를 세척하고 단백질을 용출시킨 후 SDS-PAGE를 수행하였다. 단백질을 막에 옮기고 HRP-표지된 스트렙타비딘으로 프로브하여 각 샘플 중에 남아있는 표면-노출된 Fc γ R1 단백질의 상대적인 양을 드러냈다. 그 결과를 도 2에 나타낸다.

[0079] 도 2에 예시된 것과 같이, 세포-1 샘플(Fc γ R1을 발현하지만 Kremen-2는 발현하지 않음) 중의 표면-노출된 Fc γ R1 단백질의 양은 DKK1-mFc에 노출된 세포의 시간과 무관하게 상대적으로 일정하게 유지되었다. 대조적으로, 세포-2 샘플(Kremen-2와 Fc γ R1을 둘 다 발현함)중의 표면-노출된 Fc γ R1 단백질의 양은 실질적으로 DKK1-mFc의 인큐베이션 시간이 증가함에 따라 감소하였다. 그러므로 이 실험은 DKK1-mFc가 Kremen-2 의존성 방식으로 세포 표면 발현된 Fc γ R1의 분해를 유도하는 것을 입증한다.

[0080] 이것들을 함께 고려하면, 전술한 결과는 세포 표면 표적 분자(Fc γ R1)와 내재화 이펙터 단백질(Kremen-2)에 특이적으로 결합하는 다중특이성 항원-결합 분자가 이펙터 단백질-의존성 방식으로 표적 분자의 분해를 유도할 수 있음을 보여준다.

[0081] **실시예 2. IL-4R 활성화는 IL-4R 및 CD63에 대한 특이성을 가지는 다중특이성 항원-결합 분자를 사용하여 약화된다**

[0082] 추가의 개념 입증 실험 세트에서, 세포 표면-발현된 표적 분자(즉 IL-4R) 및 세포 표면-발현된 내재화 이펙터 단백질(즉 CD63)에 동시에 결합할 수 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 구성하였다. 이 실험의 목적은 세포 상에서의 IL-4R 활성화가 리소좀 내부에 내재화되고 분해에 대한 표적이 되는 이펙터 분자에 IL-4R을 물리적으로 연결시킴으로써 더 큰 정도로 약화될 수 있는지의 여부를 측정하는 것이었다. 달리 표현하면, 이 실시예는 CD63의 정상적인 내재화 및 분해가 세포 내부에서 IL-4R의 내재화 및 분해성 경로변경을 압박하기 위해 사용될 수 있는지를 시험하기 위해 고안되었다.

[0083] 먼저, IL-4R과 CD63에 둘 다 결합할 수 있는 다중특이성 항원-결합 분자를 구성하였다. 구체적으로, 스트렙타비딘-포함된 항-IL-4R 항체와 비오틴화된 항-CD63 항체를 1:1 비율로 조합하여 항-IL-4R:항-CD63 포함체(즉 IL-4R과 CD63에 특이적으로 결합하는 다중특이성 항원-결합 분자)를 만들었다. 이 실험에 사용한 항-IL-4R 항체는 IL-4R 세포외재성 도메인에 대해 발생한 전체 사람 mAb이다. (항-IL-4R 항체는 SEQ ID NO:3을 가지는 중쇄 가변 영역과 SEQ ID NO:4를 가지는 경쇄 가변 영역으로 구성되었다). 이 실험에 사용한 항-CD63 항체는 Biolegend(San Diego, CA), 카탈로그 번호 312002로부터 얻어진 마우스 항-사람 CD63 mAb 클론 MEM-259이다.

[0084] 두 개의 대조 구성물을 또한 만들었다: 대조표준-1= 비오틴화된 대조 마우스 IgG1과 항체와 1:1 비율로 조합된 스트렙타비딘-포함된 항-IL-4R 항체; 및 대조표준-2= 비-비오틴화된 항-CD63 항체와 1:1 비율로 조합된 스트렙타비딘-포함된 항-IL-4R 항체. 실험에 사용한 항-IL-4R 항체 및 이 실시예에 대한 대조 구성물은 IL-4R에 특이적으로 결합하고 IL-4-중재된 신호화를 부분적으로만 차단하는 것으로 알려져 있는 항체이다.

[0085] 이 실시예에서 사용한 실험 셀라인은 STAT6-루시페라제 리포터 구성물 및 추가의 STAT6을 함유하고 있는 HEK293 셀라인이다("HEK293/STAT6-luc 세포"). 이 실험에 사용한 세포는 그것의 표면 상에 IL-4R과 CD63을 둘 다 발현한다. 어떠한 억제제 없이 IL-4로 처리할 때 이 셀라인은 IL-4-중재된 신호화를 반영하는 용량-의존성 검출가능한 화학발광 신호를 생산한다.

[0086] 초기 실험에서, 실험적인 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자 또는 대조 구성물을 HEK293/STAT6-luc 세포에 첨가

하여 배지 중의 항-IL-4R 항체의 최종 농도가 12.5nM가 되도록 하였다. 리포터 신호를 실험 및 대조 구성물의 존재 및 부재사에 IL-4의 증가하는 농도에서 측정하였다(도 3). 도 3에서 알 수 있는 것과 같이, 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자("ab 포합체")는 각각의 대조 구성물보다 상당히 큰 정도로 IL-4-중재된 신호화를 억제하였다.

[0087] 도 3에서 관찰된 효과가 CD63에 의존적인지를 확인하기 위하여, 상기에서 설명된 것과 동일한 실험을 수행하되, CD63 발현을 CD63에 대해 지시된 siRNA를 사용하여 리포터 셀라인에서 상당히 감소시켰다. CD63 발현이 상당히 감소되면, 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자의 증대된 억제 활성은 더 이상 관찰되지 않았다(도 4). 이 결과는 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자의 IL-4-중재된 신호화를 약화시키는 능력이 다중특이성 분자의 IL-4R 및 CD63에의 동시 결합 및 그 결과로 전체 항체-IL-4R-CD63 복합체의 내재화 및 분해로 인한 것임을 시사한다.

[0088] 다음에, 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자 또는 대조 구성물을 다양한 시간 동안 HEK293/STAT6-luc 리포터 셀라인과 함께 인큐베이션한 후에 IL-4를 첨가하는 유사한 실험을 수행하였다. 그런 실험의 첫 번째 세트에서, 분자를 리포터 셀라인과 함께 0시간 동안(즉 IL-4를 동시에 첨가함), 2시간 동안 또는 밤새 인큐베이션한 후에 50pM의 IL-4를 첨가하였다. IL-4를 첨가하고 6시간 후에 루시페라제 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 5, 상부 패널("형질전환되지 않음")에 나타낸다. 실험의 추가 세트에서, 유사한 프로토콜을 수행하되, 실험 또는 대조 분자를 리포터 셀라인과 함께 15분, 30분, 1시간 또는 2시간 동안 인큐베이션한 후에 50pM의 IL-4를 첨가하였다. 그 결과를 도 6에 나타낸다.

[0089] 도 5 및 도 6에 요약한 결과는 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자가 IL-4-중재된 신호화를 억제할 수 있고, 이 억제 효과는 인큐베이션 시간이 길어질수록 증대되는 것을 보여준다. 실험의 초기 세트와 같이, CD63 siRNA를 사용하여 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자의 억제 효과가 CD63 발현에 의존적이었음을 확인하였다(도 5 하부 패널["CD63 siRNA"]).

[0090] 요약하면, 이 실시예는 표적 분자(이 경우 IL-4R)와 내재화 이펙터 단백질(이 경우 CD63) 둘 다에 동시에 결합할 수 있고 그로써 세포 내부에서 표적 분자의 내재화 및 분해 경로변경을 유발하는 다중특이성 항원-결합 분자의 사용을 통해 표적 분자 활성의 억제를 위한 추가의 개념 입증을 제공한다. 다르게 진술하자면, 예시적인 다중특이성 항원-결합 분자에 의한 IL-4R과 CD63의 동시 결합은, 대조 구성물 단독에 의한 IL-4R의 결합보다 실질적으로 더 큰 정도로(즉 >10%) IL-4R의 활성을 약화시켰다.

[0091] **실시예 3. 항-IL-4R×항-CD63 이중특이성 항체는 CD63-의존성 방식으로 IL-4R 활성을 약화시킨다**

[0092] 본원에서 실시예의 실험은 항-IL-4R/항-CD63 다중특이성 분자가 CD63-의존성 방식으로 IL-4-중재된 신호화를 억제하는 것을 보여준다. 그런 실험에서, 다중특이성 항원-결합 분자는 비오틴-스트렙타비딘 연쇄를 통해 연결된 두 개의 별도의 단클론성 항체(항-IL-4R 및 항-CD63)로 구성되었다. 개념 입증 다중특이성 항원-결합 분자가 다른 다중특이성 항원-결합 분자 형식으로 일반화되는 것으로 관찰된 결과를 확인하기 위하여, 실제 이중특이성 항체를 구성하였다.

[0093] 표준 이중특이성 항체 기술을 사용하여 IL-4R에 특이적인 첫 번째 아암과 CD63에 특이적인 두 번째 아암으로 구성되는 이중특이성 항체를 구성하였다. IL-4R-특이적 아암은 CD63-특이적 경쇄와 짝을 이룬 항-IL-4R 중쇄를 함유하였다. CD63-특이적 경쇄는 구성의 편리함의 목적을 위해 IL-4R 특이적 중쇄와 단독으로 짝을 이루었고; 그럼에도 불구하고, 항-IL-4R 중쇄의 항-CD63 경쇄와의 짝짓기는 IL-4R에 대한 전체 특이성을 보유하였고, CD63에 대한 결합을 나타내지 않았다. CD63-특이적 아암은 항-CD63 경쇄(IL-4R 아암에 사용된 것과 동일한 경쇄)와 짝을 이룬 항-CD63 중쇄를 함유하였다. 항-IL-4R 중쇄(SEQ ID NO:3을 포함함)를 실시예 2에서 사용된 것과 같은 전체 항-IL-4R 항체로부터 유도하였다; 그러나, 항-CD63 중쇄 및 경쇄는 Developmental Studies Hybridoma Bank(University of Iowa Department of Biology, Iowa City, IA)로부터 얻은, H5C6로 표시된 항-CD63 항체로부터 유도하였다. 실시예 2에서 사용된 전체 항-IL-4R 항체와 같이, 이 실시예에서 사용한 이중특이성 항체의 항-IL-4R 성분은 그 자체에 대한 중간 정도의 IL-4R 차단 활성만을 나타냈다.

[0094] 항-IL-4R×항-CD63 이중특이성 항체의 차단 활성을 평가하기 위하여 IL-4 루시페라제 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, 항-IL-4R×항-CD63 이중특이성 항체 또는 대조 분자의 일련의 희석물을 HEK293/STAT6-luc 리포터 세포에 첨가하였다(실시예 2 참조). 정상적인 조건 하에서, 이들 세포는 IL-4로 처리될 때 검출가능한 루시페라제 신호를 발생한다. 이 실험을 위해 10pM의 IL-4를 세포에 첨가하고, 루시페라제 활성을 사용한 항체의 각 희석액에 대해 정량하였다. 이 분석에서 사용한 대조표준은 다음과 같았다: (a) 하나의 아암으로 IL-4R과 결합하고 비-기능성 항CD63 아암을 가지는 mock 이중특이성 항체(즉 하나의 항-IL-4R 중쇄 및 하나의 항-CD63 중쇄를

함유하고 있으며, 둘 다 항-IL-4R 경쇄와 짝을 이루고 있음); (b) 항-IL-4R 단일특이성 항체; 및 (c) 완충액 (PBS) 단독(항체 없음). 그 결과를 도 7에 나타낸다. 도 7에서 알 수 있는 것과 같이, 사용한 대조 샘플에 대해서, 루시페라제 활성은 가장 높은 항체 농도에서도 상대적으로 높게 유지된 반면, 이중특이성 항체에 대해서, 루시페라제 활성은 항체 농도가 증가함에 따라 상당히 감소하였다. 이들 결과는 이중특이성 항체에 의한 IL-4R 및 CD63의 동시 결합이 IL-4R 활성의 실질적인 억제를 유발하는 것을 확인하여준다.

[0095] **실시예 4. SOST 및 CD63에 동시에 결합하는 다중특이성 항원-결합 분자를 사용하는 SOST의 내재화**

[0096] 이 실시예에서는, 가용성 표적 분자 SOST(스클레로스틴, sclerostin)의 내재화를 촉진하는 다중특이성 항원-결합 분자의 능력을 평가하였다. 이들 실험을 위하여, 표적 분자는 pHrodoTM 부분으로 태그된 사람 SOST 단백질 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 및 myc 태그로 구성되는 융합 단백질이었다. pHrodoTM 부분은 실제로 중성 pH에서 비-형광성이고 엔도솜과 같은 산성 환경에서 밝게 빛나는 pH-민감성 염료이다. 그러므로 형광 신호는 SOST 융합 단백질의 세포 내재화의 표시자로서 사용될 수 있다. 이들 실험에 대한 다중특이성 항원-결합 분자는 아래에서 보다 상세하게 설명되는 것과 같이, CD63(내재화 이펙터 단백질) 및 SOST 융합 단백질(가용성 표적 분자) 둘 다에 대해 결합 특이성을 가지고 있는 이중특이성 항체였다.

[0097] 실험을 다음과 같이 수행하였다: 간단하게 설명하면, HEK293 세포를 폴리-D-라이신 코팅된 96 웰 플레이트 (Greiner Bio-One, Monroe, NC)에 10,000 세포/웰로 플레이팅하였다. 세포가 밤새 정착하도록 허용한 후에, 배지를 항체(5 μ g/mL, 아래에서 기술되는 것과 같음), pHrodoTM-myc-태그된 SOST(5 μ g/mL), 헤파린(10 μ g/mL) 및 Hoechst 33342를 함유하고 있는 배지로 교체하였다. 그런 다음 세포를 얼음 위에서 3시간 또는 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 인큐베이션하였다. 그런 다음 모든 세포를 2회 세척한 후에 PBS 중에서 영상화하고, 세포당 형광 반점의 수뿐 아니라 해당하는 형광 세기를 계수하여 다양한 항체 구성물의 존재하에 pHrodo-myc-태그된 SOST 세포 내재화의 정도를 수립하였다.

[0098] 이 실시예에서 사용한 항체는 다음과 같았다: (1) 항-CD63 단일특이성 항체(클론 H5C6, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa Department of Biology, Iowa City, IA); (2) 항-myc 항체(클론 9E10, Schiweck et al., 1997, FEBS Lett. 414(1):33-38); (3) 항-SOST 항체(미국 특허 제 7,592,429호에서 "Ab-B"로 표시된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 가지는 항체); (4) 항-CD63 \times 항-myc 이중특이성 항체(즉 항체 H5C6로부터 유도된 항-CD63 아암 및 9E10으로부터 유도된 항-myc 아암을 포함하고 있는 다중특이성 항원-결합 분자); (5) 항-CD63 \times 항-SOST 이중특이성 항체 #1(즉 항체 H5C6로부터 유도된 항-CD63 아암 및 "Ab-B"로부터 유도된 항-SOST 아암을 포함하고 있는 다중특이성 항원-결합 분자) 및 (6) 항-CD63 \times 항-SOST 이중특이성 항체 #2(즉 항체 H5C6로부터 유도된 항-CD63 아암 및 미국 특허 제 7,592,429호에서 "Ab-20"으로 표시된 항체로부터 유도된 항-SOST 아암을 포함하고 있는 다중특이성 항원-결합 분자). 이들 실험에 사용한 이중특이성 항체를 소위 "구멍에 손잡이" 방법(예컨대 Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9(7):617-621 참조)을 사용하여 조립하였다.

[0099] 내재화 실험의 결과를 도 8에 나타낸다. 도 8은 시험한 다양한 처리 조건 하에서의 세포당 반점(표지된 소포)의 수를 나타낸다. 이들 실험의 결과를 함께 고려하면, CD63 및 SOST에 동시에 결합하는(직접적으로 또는 myc 태그를 경유하여) 이중특이성 구성물은 37 $^{\circ}$ C에서 시간이 경과함에 따라 형광 세기 및 세포당 형광 반점의 수에 의해 반영되는 것과 같이, 가장 많은 양의 SOST 내재화를 유발하였다. 그러므로, 이 실시예에서 사용한 다중특이성 항원-결합 분자는 가용성 표적 분자의 내재화를 효과적으로 지시할 수 있다.

[0100] **실시예 5. CD63 및 SOST에 결합하는 다중특이성 항원-결합 분자로 처리된 마우스에서의 골밀도 변화**

[0101] 다음 단계로, 실시예 4에서 기술된 것과 같은 항-CD63 \times 항-SOST 다중특이성 항원-결합 분자를 마우스에서의 골밀도를 증가시키는 그것의 능력에 대해 시험한다. 이 실험에 5 그룹의 마우스(그룹당 약 6마리의 마우스)를 사용한다. 처리 그룹은 다음과 같다: (I) 미처리 네거티브 대조 마우스; (II) 그 자체로 골밀도를 증가시키는 것으로 알려져 있는 차단 항-SOST 단일특이성 항체로 처리된 마우스(포지티브 대조표준); (III) CD63과 SOST에 특이적으로 결합하지만 그 자체로 SOST 활성을 억제하지 않거나 그 자체로 SOST 활성을 단지 경미하게 억제하는 이중특이성 항체로 처리된 마우스; (IV) 항-CD63 원래의 항체(즉 이중특이성 항체에서와 동일한 항-CD63 항원-결합 도메인을 함유하고 있는 단일특이성 항체)로 처리된 마우스; 및 (V) 항-SOST 원래의 항체(즉 이중특이성 항체에서와 동일한 항-SOST 항원-결합 도메인을 함유하고 있는 단일특이성 항체)로 처리된 마우스. 각 그룹에서 마우스에 투여된 항체의 양은 약 10 내지 25mg/kg이다.

[0102] 이중특이성 항체의 항-SOST 성분은 그 자체로는 SOST 활성을 억제하지 않지만(골밀도 증가를 나타내지 않는 것

으로 예상되는 그룹 V의 마우스에 의해 확인됨), 그룹 III의 마우스(항-SOST×항-CD63 이중특이성 항체로 처리됨)가 적어도 그룹 II의 마우스(공지된 차단 항-SOST 항체로 처리됨)에서 관찰된 것과 비교할만한 골밀도 증가를 나타낼 것으로 예상되었다. 그룹 III의 마우스에서 예상된 골밀도의 증가는 상기 실시예 4의 세포 실험에서 관찰된 것과 같이, SOST의 CD63-중재된 내재화에 의해 가동되는 것으로 여겨진다.

[0103] 실시예 6. 리포다당(LPS)와 CD63에 동시에 결합하는 다중특이성 항원-결합 분자에 의해 중재된 LPS의 세포 내재화

[0104] 이 실시예는 비-단백질 표적 분자, 즉 리포다당(LPS)의 내재화를 지시하기 위하여 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자를 사용하는 것을 예시한다. LPS는 그람-네거티브 박테리아의 외막 성분이고 패혈증 쇼크의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 항-LPS 항체는 패혈증에 대한 가능한 치료제로서 연구조사가 이루어져 왔다. 본 실시예의 실험을 LPS의 내재화를 촉진하는 다중특이성 항원-결합 분자의 능력을 평가하기 위하여 디자인하였다.

[0105] 이 실시예에서 사용한 다중특이성 항원-결합 분자는 LPS(표적)에 대해 지시된 하나의 아암과 CD63(내재화 이펙터 단백질)에 대해 지시된 다른 아암을 가지고 있는 이중특이성 항체였다. 항-LPS 아암은 WN1 222-5로 알려져 있는 항체로부터 유도하였다(DiPadova et al., 1993, *Infection and Immunity* 61(9):3863-3872; Muller-Loennies et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278(28):25618-25627; Gomery et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 109(51):20877-20882; US 5,858,728). 항-CD63 아암은 H5C6 항체로부터 유도하였다(실시예 4 참조). 항-LPS×항-CD63 이중특이성 항체(즉 다중특이성 항원-결합 분자)를 소위 "구멍에 손잡이" 방법(예컨대 Ridgway et al., 1996, *Protein Eng.* 9(7):617-621 참조)을 사용하여 조립하였다.

[0106] 이들 실험에 사용한 두 개의 LPS 종은 대장균 LPS와 살로넬라 미네소타 LPS였다. 두 버전을 모두 형광-표지된 분자로서 얻었다(ALEXA-FLUOR®-488-표지된 LPS, Life Technologies, Carlsbad, CA).

[0107] 실험을 다음과 같이 수행하였다: HEK293 세포를 96-웰 PDL-코팅된 영상화 플레이트에 플레이팅하였다. 그것을 밤새 놓아둔 후, 배지를 새로운 배지로 교체하였다. 형광 표지된 LPS(대장균- 또는 S. 미네소타-유도된 것 중 어느 하나)를 정균 배지에 첨가하였다. 다음에, 항-LPS×항-CD63 이중특이성 항체, 또는 모조 Fc와 짝을 이룬 대조 반-항체를 샘플에 첨가하였다. 37°C에서(1시간 및 3시간) 또는 얼음 위에서(3시간) 다양하게 인큐베이션한 후에, LPS-처리 샘플로부터의 세포를 다음과 같이 처리하였다: 세척 - 항-ALEXA-FLUOR®-488 항체로 퀀칭 - 세척 및 고정. 항-ALEXA-FLUOR®-488 항체는 내재화되지 않은(즉 표면 결합된) 형광 발색단으로부터의 형광을 퀀칭한다. 그러므로 퀀칭 항체로 처리된 샘플에서 관찰된 어떠한 형광이든지 내재화된 LPS로 인한 것이다. 다양한 시간 지점에서 각 샘플로부터의 형광 수준을 측정하였다.

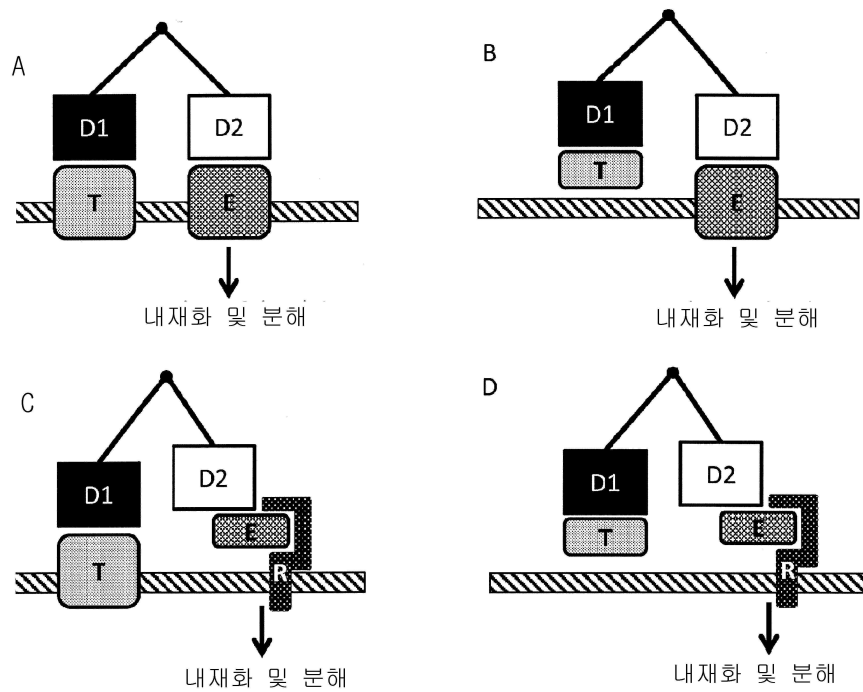
[0108] 도 9는 세포당 표지된 소포의 측면으로 이들 실험 결과를 나타낸다. 도 9에서 알 수 있는 것과 같이, 항-CD63×항-LPS 이중특이성 항체로 처리된 세포만이 시간에 따라 증가한 상당한 수의 표지된 소포를 입증하였다. 표지된 LPS와 대조 항체로 처리된 마우스는 인지할만한 수의 형광 소포를 나타내지 못하였고, 그것은 LPS가 그런 처리 조건 하에서 내재화되지 않았음을 가리킨다.

[0109] 그러므로 이 실시예는 항-LPS×항-CD63 이중특이성 항체가 LPS와 CD63의 동시 결합을 필요로 하는 방식으로 세포 안으로 LPS의 내재화를 유발하는 것을 증명한다. 따라서 이들 결과는 패혈증과 같은 질병 및 장애의 치료를 위해 LPS와 같은 표적 분자의 세포성 내재화를 촉진하기 위해 본 발명의 다중특이성 항원-결합 분자를 사용하는 것을 지시한다.

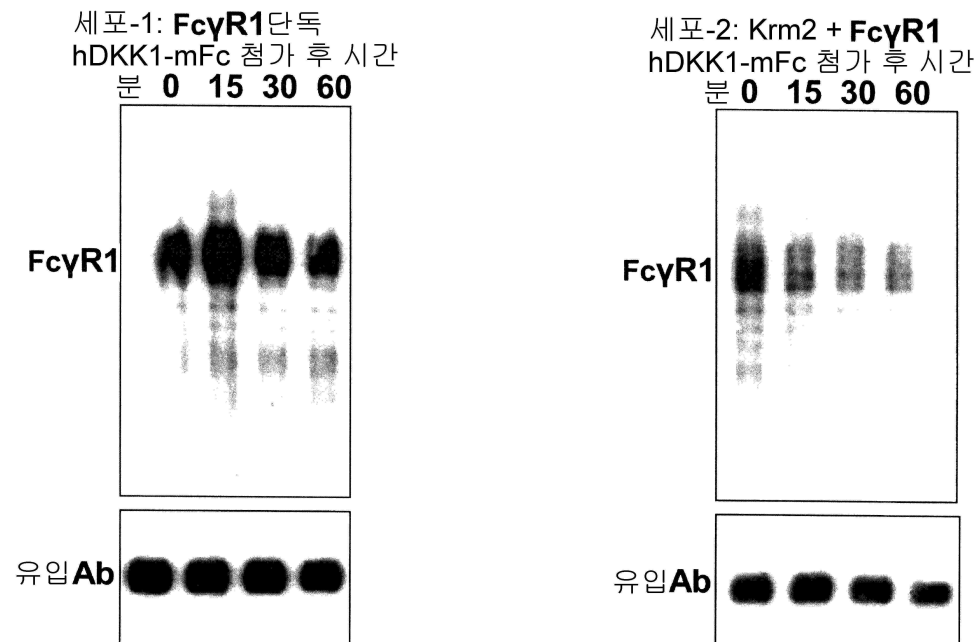
[0110] 본 발명은 본원에 기술된 특정 구체예들에 의해 범주가 제한되지 않는다. 실제로 본원에 기술된 것들 외에 본 발명의 다양한 변형이 전술한 설명과 수반되는 도면으로부터 해당 기술분야의 숙련자들에게 명백해질 것이다. 그런 변형은 첨부되는 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

도면

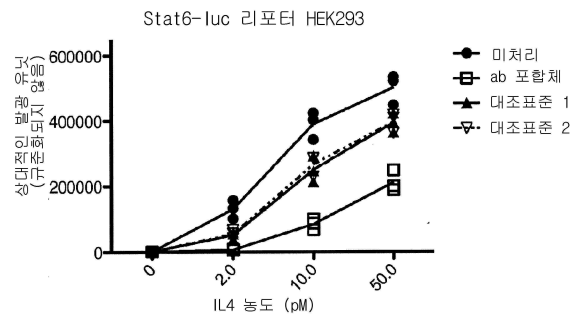
도면1



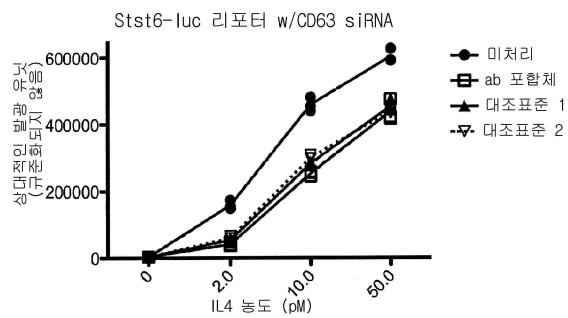
도면2



도면3

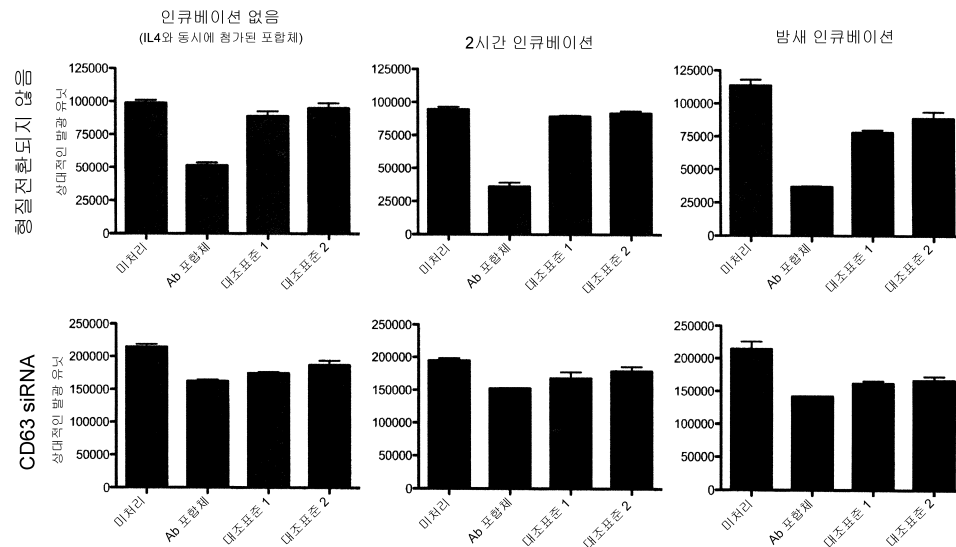


도면4



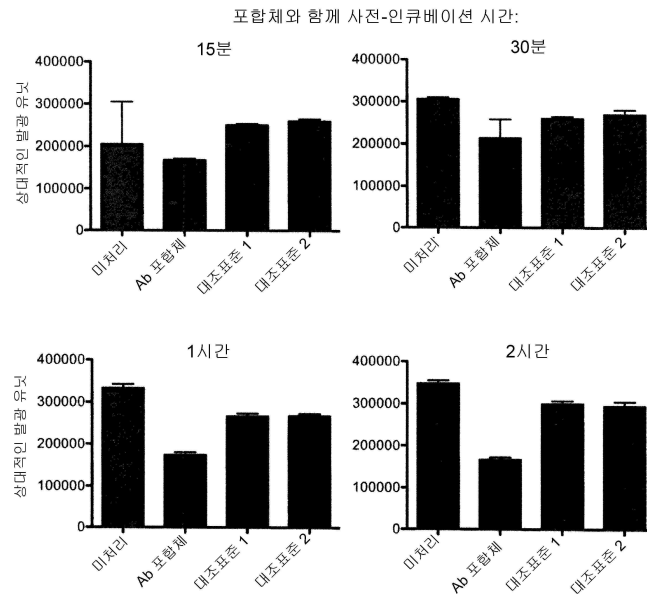
도면5

HEK293 STAT6-Luc 세포 + CD63 siRNA 형질전환 → 세포를 96 웰 플레이트에 스프레딩 → Ab 포함체 또는 Mock 포함체 추가 → 인큐베이션: 1) 밤새, 2) 2시간, 3) 인큐베이션 없음 → IL4 (50pM) 추가 6시간 인큐베이션 → 루시페라제 분석

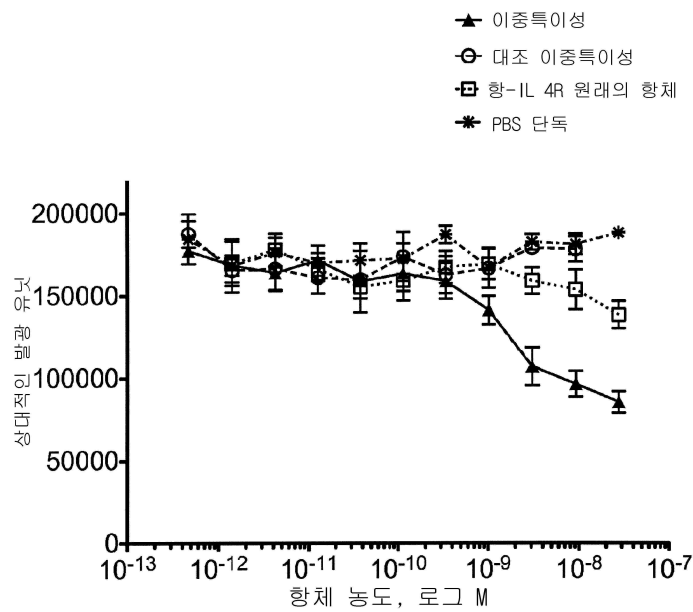


도면6

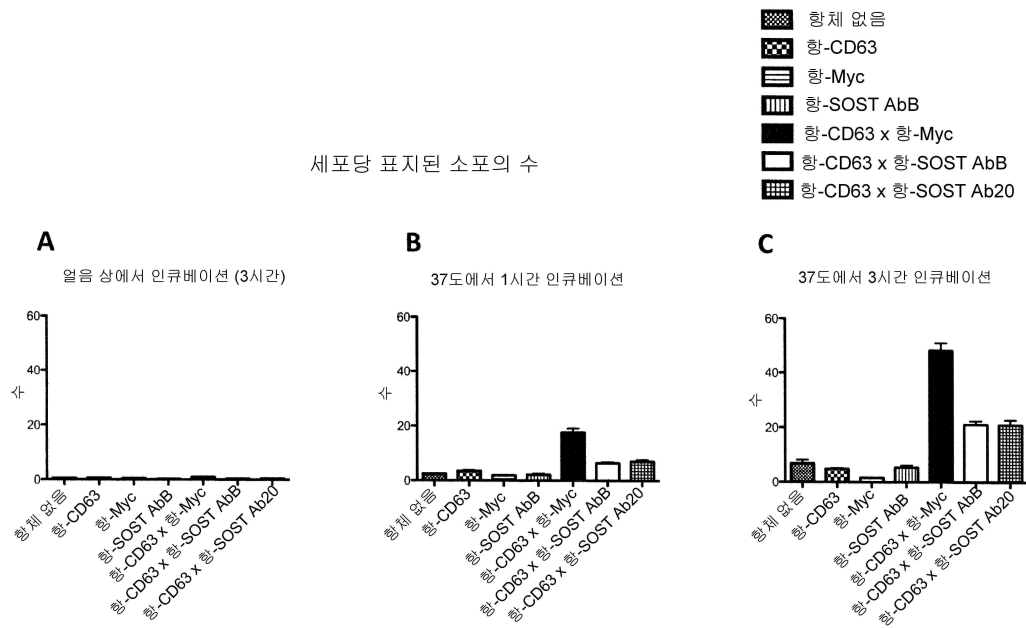
HEK293 STAT5-Luc 세포 ± CD63 siRNA 형질전환 → 세포를 96 웰 플레이트에 스프레딩함 → Ab 포함체 또는 Mock 포함체 첨가 → 인큐베이션: 1) 15분, 2) 30분, 3) 1시간, 4) 2시간 → IL4 (50pM) 첨가 6시간 인큐베이션 → 루시페라제 분석



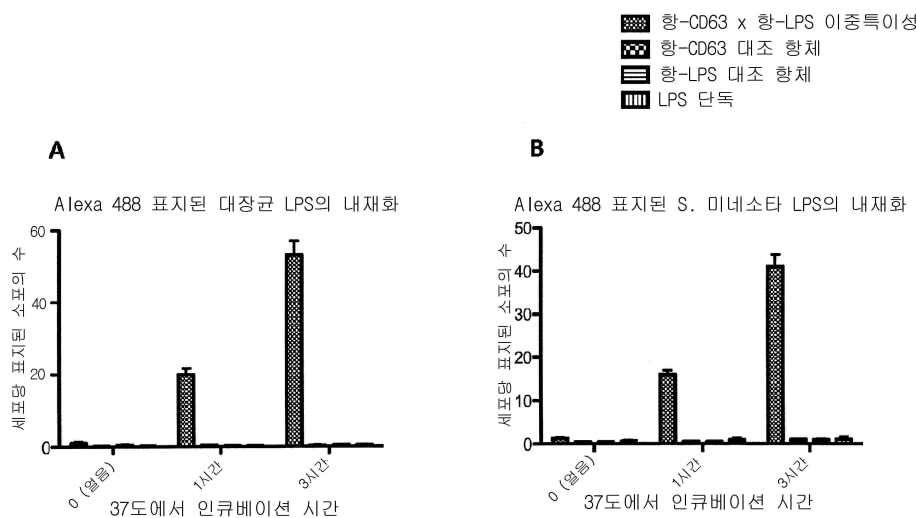
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Multispecific Antigen-Binding Molecules and Uses Thereof

<130> 7650A-WO

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 61/610,494

<151> 2012-03-14

<150> 61/721,831

<151> 2012-11-02

<150> 61/751,286

<151> 2013-01-11

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met

1 5 10 15
Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr

20 25 30
Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro

35 40 45
Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro

50 55 60
Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr

65 70 75 80
Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr

85 90 95
Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu

100 105 110
Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys

115 120 125
Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn

130 135 140
His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn

145 150 155 160

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
 165 170 175
 Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
 180 185 190
 Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
 195 200 205
 Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
 210 215 220
 Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
 225 230 235 240
 Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
 245 250 255
 Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His Gly Pro Gly Glu Pro Arg
 260 265 270
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 275 280 285
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 290 295 300
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 325 330 335
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 340 345 350
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 355 360 365
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 370 375 380
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 385 390 395 400
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys

405 410 415
Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
420 425 430
Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
435 440 445
Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys

450 455 460
Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
465 470 475 480
Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
485 490 495
Ser Arg Thr Pro Gly Lys

500

<210> 2

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met

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

65 70 75 80
Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
 100 105 110
 Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
 115 120 125
 Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
 130 135 140
 His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
 145 150 155 160
 Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
 165 170 175
 Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
 180 185 190
 Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
 195 200 205
 Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg
 210 215 220
 Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
 225 230 235 240
 Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
 245 250 255
 Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His Gly Pro Gly Asp Lys Thr
 260 265 270
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

340 345 350
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

385 390 395 400
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

450 455 460
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Phe Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Ser Ser Ser Trp Tyr Phe Tyr His Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Val Gly Thr Tyr Phe Cys Met Gln Ser
85 90 95

Leu Gln Ala Pro Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

