



등록특허 10-2717307



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월15일
(11) 등록번호 10-2717307
(24) 등록일자 2024년10월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7005941
- (22) 출원일자(국제) 2016년08월03일
심사청구일자 2021년07월21일
- (85) 번역문제출일자 2018년02월28일
- (65) 공개번호 10-2018-0042271
- (43) 공개일자 2018년04월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/068549
- (87) 국제공개번호 WO 2017/021450
국제공개일자 2017년02월09일
- (30) 우선권주장
15179549.9 2015년08월03일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (56) 선행기술조사문헌
WO2014122144 A1
WO2014140248 A1
Clinical Cancer Research, Vol. 19, No. 8, pp. 2048-2060 (2013.04.15.)

전체 청구항 수 : 총 22 항

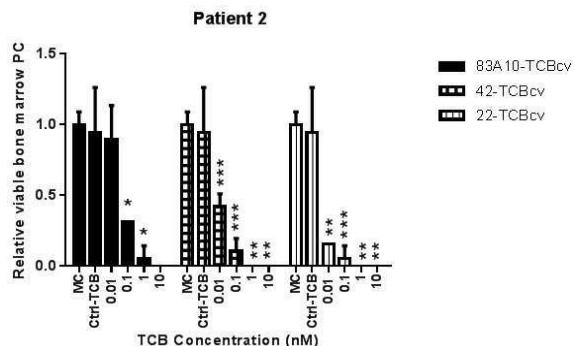
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 BCMA에 대응하는 단일클론 항체

(57) 요약

본 발명은 BCMA에 대응하는 새로운 항체, 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10b



(52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/66 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2319/70 (2013.01)

(72) 발명자

아스트, 올리버

스위스 8303 바세르스도프, 자콥 스팔텐스테인스트라세 12

바칵, 마리나

스위스 8046 취리히, 홀더바취웨그 21

헬론, 카밀레

스위스 8102 오베렝스틴겐, 킬치웨그 77

듀어너, 리디아, 자스민

스위스 8903 베멘스도프, 스탈리코너스트라세 105

프레이모서-그룬드스코버, 안느

스위스 8050 취리히, 눈브룬넨스트라세 76

크레인, 크리스티안

스위스 8906 본스테텐, 차프스트라세 26비

모에스너, 에케하드

스위스 8280 크루즈린겐, 제펠린스트라세 13

모서, 사무엘

스위스 6343 롯크루즈, 에이치마트 31

우마나, 파블로

스위스 8832 월러라우, 펠센라인스트라세 28

웨인지얼, 티나

스위스 8952 쉬리에렌, 우르도퍼스트라세 93

명세서

청구범위

청구항 1

인간 B 세포 성숙화 항원(BCMA)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체로서,

상기 항체는:

- a) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:27의 CDR1L, SEQ ID NO:28의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L; 또는
 - b) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:25의 CDR1L, SEQ ID NO:26의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L;
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13 또는 14의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

BCMA 및 인간 CD3 ε ("CD3")에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는 항-BCMA 항체 부분 및 항-CD3 항체 부분을 포함하고, 상기 항-BCMA 항체 부분은:

- a) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:27의 CDR1L, SEQ ID NO:28의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L; 또는
 - b) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:25의 CDR1L, SEQ ID NO:26의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L;
- 을 포함하고, 그리고

상기 항-CD3 항체 부분은 SEQ ID NO:1의 CDR1H, SEQ ID NO:2의 CDR2H, SEQ ID NO:3의 CDR3H, SEQ ID NO:4의 CDR1L, SEQ ID NO:5의 CDR2L 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항-BCMA 항체 부분은 SEQ ID NO:10의 BCMA VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역, 또는 SEQ ID NO:10의 BCMA VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 항-CD3 항체 부분은 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 그리고 상기에서:

- a) CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 중쇄이거나; 또는

b) CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 중쇄인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 6

BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는:

- a) 제1항에 따른 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄; 및
- b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄;

를 포함하고, 상기에서:

i) 제2 경쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 제2 중쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 중쇄이거나; 또는

ii) 제2 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 제2 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 중쇄이고,

상기 제2 항체는 SEQ ID NO:1의 CDR1H, SEQ ID NO:2의 CDR2H, SEQ ID NO:3의 CDR3H, SEQ ID NO:4의 CDR1L, SEQ ID NO:5의 CDR2L 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L을 포함하고, 그리고

상기에서:

a)의 상기 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R), 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 그리고 a)의 상기 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트의 EU 인덱스에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 상기 제1 항체의 Fab 단편(추가로 "BCMA-Fab"이라고도 명명됨)을 더 포함하고, 상기 BCMA-Fab의 상기 불변 도메인 CL에서 상기 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R), 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 그리고 상기 BCMA-Fab의 상기 불변 도메인 CH1에서 상기 위치 147에서의 아미노산 및 상기 위치 213에서의 아미노산은 돋립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트의 EU 인덱스에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 그리고 상기 Fab 단편은 이의 C-말단을 사용하여 상기 이중특이적 항체의 제2 항체의 N-말단에 연결된 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 8

BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는:

- a) 제1항에 따른 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄; 및
- b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄;

를 포함하고, 상기에서:

i) 제2 경쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 제2 중쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 중쇄이거나; 또는

ii) 제2 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 크로스오버 경쇄이고 제2 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 크로스오버 중쇄이고,

상기 제2 항체는 SEQ ID NO:1의 CDR1H, SEQ ID NO:2의 CDR2H, SEQ ID NO:3의 CDR3H, SEQ ID NO:4의 CDR1L, SEQ ID NO:5의 CDR2L 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L을 포함하고, 그리고

상기에서:

b)의 상기 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R), 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 그리고 b)의 상기 제2 중쇄의 상기 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트의 EU 인덱스에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는:

- a) 상기 항-CD3 항체 부분의 1개 이하의 Fab 단편, 상기 항-BCMA 항체 부분의 2개 이하의 Fab 단편, 및 1개 이하의 Fc 부분; 또는
- b) 이의 N-말단을 사용하여 상기 항-CD3 항체 부분의 Fab 단편의 C-말단 및 상기 항-BCMA 항체 부분의 Fab 단편의 C-말단에 연결된 Fc 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 이의 C-말단을 사용하여 상기 이중특이적 항체의 상기 항-CD3 항체 부분의 N-말단에 연결된 상기 항-BCMA 항체 부분의 제2 Fab 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항-CD3 항체 Fab 단편의 VL 도메인은 상기 제2 항-BCMA 항체 Fab 단편의 CH1 도메인에 연결된 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 12

BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 폴리펩티드 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57의 2개의 복제본으로 이루어진 중쇄 및 경쇄 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 13

BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서, 상기 이중특이적 항체는 폴리펩티드 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, 및 SEQ ID NO:54의 2개의 복제본으로 이루어진 중쇄 및 경쇄 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 14

BCMA에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항체로서, 상기 다중특이적 항체는 항-BCMA 항체 부분 및 항-CD3 항체 부분을 포함하고, 상기 항-BCMA 항체 부분은 SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의

CDR3H, SEQ ID NO:27의 CDR1L, SEQ ID NO:28의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L을 포함하고; 그리고 항-CD3 항체 부분은 SEQ ID NO:1의 CDR1H, SEQ ID NO:2의 CDR2H, SEQ ID NO:3의 CDR3H, SEQ ID NO:4의 CDR1L, SEQ ID NO:5의 CDR2L 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이적 항체.

청구항 15

BCMA에 특이적으로 결합하는 다중특이적 항체로서, 상기 다중특이적 항체는 항-BCMA 항체 부분 및 항-CD3 항체 부분을 포함하고, 상기 항-BCMA 항체 부분은 SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:25의 CDR1L, SEQ ID NO:26의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L을 포함하고, 그리고

상기 항-CD3 항체 부분은 SEQ ID NO:1의 CDR1H, SEQ ID NO:2의 CDR2H, SEQ ID NO:3의 CDR3H, SEQ ID NO:4의 CDR1L, SEQ ID NO:5의 CDR2L 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중특이적 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 항체의 제조 방법으로서, 상기 방법은:

- 숙주 세포를 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 항체의 상기 경쇄 및 상기 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환시키는 단계;
 - 상기 숙주 세포를 상기 항체의 합성을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계; 및
 - 상기 항체를 상기 배양물로부터 회수하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체의 제조 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 숙주 세포.

청구항 18

다발성 골수종, 전신 홍반 루푸스, 형질 세포 백혈병, 또는 AL-아밀로이드증의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 19

BCMA에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부분으로서, 상기 항원 결합 부분은:

- SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:27의 CDR1L, SEQ ID NO:28의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L; 또는
- SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:25의 CDR1L, SEQ ID NO:26의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L;

을 포함하는 것을 특징으로 하는 항원 결합 부분.

청구항 20

키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)로서, 상기 CAR은 BCMA 및 T-세포 활성화 모이어티에 대해서 지향된 항원 인식 모이어티를 포함하고, 상기 항원 인식 모이어티는 제1항 또는 제2항에 따른 단일클론 항

체 또는 항체 단편이고, 상기 항체 단편은 Fab', F(ab')2, scFv 또는 다이-scFv인 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 21

제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체로서, 항-BCMA 항체의 10nM 및 1fM을 포함하여 10nM 내지 1fM 사이의 농도에서 48시간 치료 후 다발성 골수종 골수 흡인물(bone marrow aspirate) 중의 인간 악성 형질 세포를 적어도 80%로 감소시키는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 생성 방법으로서, 상기 방법은:

- a) SEQ ID NO:9의 가변 중쇄(VH) 파지-디스플레이 라이브러리를 1 내지 50nM의 시노몰구스(cynomolgus) BCMA와 함께 1 내지 3 라운드로 패닝(panning)시키고, 제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체에 SEQ ID NO:11의 가변 경쇄와 조합된 경우 상기 인간 악성 형질 세포를 감소시키는 가변 중쇄를 선택하는 단계;
- b) SEQ ID NO:11의 가변 경쇄(VL) 파지-디스플레이 라이브러리를 1 내지 50nM의 시노몰구스 BCMA와 함께 1 내지 3 라운드로 패닝시키고, 제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체에 상기 SEQ ID NO:9의 가변 중쇄와 조합된 경우 상기 인간 악성 형질 세포를 감소시키는 가변 경쇄를 선택하는 단계; 및
- c) 상기 선택된 가변 중쇄 및 선택된 가변 경쇄를 상기 인간 악성 형질 세포를 감소시키는 제3항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체에 조합하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체의 생성 방법.

청구항 22

항체-약물 접합체로서, 상기 항체는 BCMA에 특이적으로 결합하고,

- a) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:27의 CDR1L, SEQ ID NO:28의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L; 또는
- b) SEQ ID NO:21의 CDR1H, SEQ ID NO:22의 CDR2H, SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:25의 CDR1L, SEQ ID NO:26의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L;

을 포함하고, 그리고

상기 항체는 치료제, 세포독성제, 또는 방사성표지와 접합되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] BCMA에 대응하는 새로운 항체, 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] BCMA라고도 공지된, 인간 B 세포 성숙화 항원; TR17_인간, TNFRSF17(유니프로트(UniProt) Q02223)은 분화 형질 세포(differentiated plasma cell)에서 우선적으로 발현되는 종양 고사 수용체 슈퍼페밀리의 구성원이다(문현 [Laabi et al. 1992; Madry et al. 1998]). BCMA는 비-글리코실화 III형 막관통 단백질이고, 이것은 B 세포 성숙, 성장 및 생존에 관여된다. BCMA는 TNF 슈퍼페밀리의 2개의 리간드에 대한 수용체이다: BCMA에 대한 고친화성 리간드인 APRIL(증식-유도 리간드), 및 BCMA에 대한 저친화성 리간드인, B 세포 활성화 인자 BAFF(THANK, BlyS, B 램프구 자극인자, TALL-1 및 zTNF4). APRIL 및 BAFF는 구조적 유사성 및 중복되지만 구별되는 결합 특이성을 나타낸다. 음성 조절인자 TACI가 또한 BAFF 및 APRIL 둘 모두에 결합한다. BCMA 및/또는 TACI에 대한 APRIL 및 BAFF의 배위 결합은 전사 인자 NF- κ B를 활성화시키고, 생존 촉진(pro-survival) Bcl-2 패밀리 구성

원(예를 들어, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1)의 발현 및 세포자멸 촉진 인자(pro-apoptotic factor)(예를 들어, Bid, Bad, Bik, Bim 등)의 하향조절을 증가시키고, 따라서 세포자멸을 억제하고, 생존을 촉진시킨다. 이러한 조합된 작용은 B 세포 분화, 증식, 생존 및 항체 생산을 촉진시킨다(문헌[Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133에 검토되어 있는 바와 같음].

[0003] BCMA에 대응하는 항체는 문헌[Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106], 국제 특허 공개 제WO200124811호, 제WO200124812호, 제WO2010104949호, 및 제WO2012163805호에 기술되어 있다. BCMA에 대응하는 항체 및 림프종 및 다발성 골수종의 치료를 위한 이의 사용은 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO2002066516호 및 제WO2010104949호에 언급되어 있다. 국제 특허 공개 제WO2013154760호 및 제WO2015052538호는 BCMA 인식 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)에 관한 것이다. 문헌[Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018]은 네이키드(naked) 항체 또는 항체-약물 접합체로서 다발성 골수종(MM) 세포주의 세포독성을 촉진시킬 수 있는 리간드 차단 활성을 갖는 항 BCMA 항체에 관한 것이다. 라이언(Ryan)은, 저해성 BCMA 항체인 SG1이 핵 인자-κB의 APRIL-의존적 활성화를 시험관내에서 용량-의존적인 방식으로 차단한다고 나타내었다. 라이언은 또한 BCMA에 대한 APRIL 결합을 크게 저해하지 않는 항체 SG2를 언급하였다.

[0004] 매우 다양한 재조합 이중특이적 항체 포맷(format)이 예를 들어, IgG 항체 포맷 및 단쇄 도메인의 융합에 의해서 최근에 개발되었다(예를 들어, 문헌[Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16] 참고). 가변 도메인 VL 및 VH 또는 가변 도메인 또는 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로에 의해서 대체된 이중특이적 항체가 국제 특허 공개 제WO2009080251호 및 제WO2009080252호에 기술되어 있다.

[0005] '노브-인투-홀(knobs-into-holes)'로 알려진 잘못 짹지어진 부산물의 문제점을 회피하기 위한 접근법은, 접촉계면을 변형시키기 위한 CH3 도메인에 돌연변이를 도입함으로써 2개의 상이한 항체 경쇄가 짹을 이루게 하는 것을 목적으로 한다. 하나의 사슬 상에서 '홀'을 생성하기 위해서 부피가 큰(bulky) 아미노산이 짧은 측쇄를 갖는 아미노산으로 대체되었다. 반대로, '노브(knob)'를 생성하기 위해서 큰 측쇄를 갖는 아미노산이 다른 CH3 도메인에 도입된다. 이러한 두 개의 중쇄(및 중쇄 둘 모두에 적절해야 하는, 2개의 동일한 경쇄)를 공동 발현시킴으로써, 고효율의 헤테로이량체 형성('노브-홀') 대 호모이량체에 형성('홀-홀' 또는 '노브-노브')이 관찰되었다(문헌[Ridgway JB, Presta LG, Carter P. Protein Eng. 9, 617-621 (1996)]; 국제 특허 공개 제WO1996027011호). 헤테로이량체의 백분율은 과지 디스플레이(phage display) 접근법을 사용하여 2개의 CH3 도메인의 상호작용 표면을 리모델링하고, 헤테로이량체를 안정화시키기 위해서 이황화 다리를 도입함으로써 더 증가시킬 수 있다(문헌[Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681]; [Aτwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol. Biol 270 (1997) 26-35]). 노브-인투-홀 기술은 예를 들어, 유럽 특허 제EP 1870459A1호에 기술되어 있다. 이러한 포맷은 매우 매력적인 것으로 보이지만, 임상으로의 진행을 설명하는 어떤 데이터도 현재 입수가 가능하지 않다. 이 전략의 하나의 중요한 제약은 잘못 짹지어지는 것과 불활성 분자의 형성을 방지하기 위해서는 2개의 모 항체의 경쇄가 동일해야 한다는 것이다. 따라서 이 기술은 2개의 표적에 대한 재조합, 이중특이적 항체를 제1 표적 및 제2 표적에 대한 2개의 항체로부터 출발하여 쉽게 개발하는데 적합하지 않은데, 그 이유는 이를 항체 및/또는 동일한 경쇄가 최적화되어야 하기 때문이다. 문헌[Xie, Z., et al, J Immunol. Methods 286 (2005) 95-101]은 FC를 위해서 노브-인투-홀 기술과 조합하여 scFvs를 사용하는 이중특이적 항체의 포맷을 언급한다.

[0006] T-림프구의 TCR/CD3 복합체는 CD3 표지된 감마(γ), 엘타(δ), 엡실론(ε), 제타(ζ), 및 에타(η)의 불변 소단위를 갖는 세포 표면에서 공동 발현되는 TCR 알파(α)/베타(β) 또는 TCR 감마(γ)/엘타(δ) 헤�테로이량체로 이루어진다. 인간 CD3 ε은 유니프로트 P07766(CD3E_인간) 하에 기술된다.

[0007] 최신 기술에 기술된 항 CD3 ε 항체는 SP34이다(문헌[Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100]). SP34는 영장류 및 인간 CD3이다. SP34는 파밍겐(Pharmingen)으로부터 입수 가능하다. 최신 기술에 기술된 추가 항CD3 항체는 UCHT-1이다(국제 특허 공개 제WO2000041474호 참고). 최신 기술에 기술된 추가 항 CD3 항체는 BC-3이다(문헌[Fred Hutchinson Cancer Research Institute; used in Phase I/II trials of GvHD, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)]). SP34는, SP-34가 CD3의 ε 쇄 상에만 존재하는 에피토프를 인식한다는 점에서 UCHT-1 및 BC-3과 상이한 반면(문헌[Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047] 참고), UCHT-1 및 BC-3은 ε 쇄 및 γ 쇄 둘 모두에 기여되는 에피토프를 인식한다. 추가 항-CD3 항체는 국제 특허 공개 제WO2008119565호, 제WO2008119566호, 제WO2008119567호, 제WO2010037836호, 제WO2010037837호, 제WO2010037838호, 및 제US8236308호(제WO2007042261호)에 기술되어 있다. 추가 항-CD3 항체의 CDR 서열, VH 서

열 및 VL 서열이 SEQ ID NO:7 및 8에 제시되어 있다.

- [0008] CD3 및 BCMA에 대응하는 이중특이적 항체는 국제 특허 공개 제W02007117600호, 제W02009132058호, 제W02012066058호, 및 제W02012143498호에 언급되어 있다. BCMA에 대응하는 항체의 CAR 화합물은 국제 특허 제W02013154760호, 제W02013154760호, 및 제W02014140248호에 언급되어 있다.
- [0009] 단일클론 항체의 세포-매개된 효과기 기능(예컨대 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC))은 문헌[Uma p a, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180]; 및 미국 특허 제US6602684호에 기술된 바와 같이 Asn297에서 이의 올리고당 조성을 조작함으로써 향상될 수 있다. 국제 특허 공개 제W01999054342호, 제W02004065540호, 제W02007031875호, 및 제W02007039818호, 문헌[Hristodorov D, Fischer R, Linden L., *Mol Biotechnol.* 2012 Oct 25. (Epub)]은 또한 Fc-매개된 세포 세포독성을 향상시키기 위한 항체의 글리코실화 조작에 관한 것이다.
- [0010] 또한 헌지 영역 및 CH2 도메인 내의 몇몇 아미노산 잔기는 단일클론 항체의 세포-매개된 효과기 기능에 영향을 준다(문헌[Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993)], [Immunology, 86, 319 (1995)], [Chemical Immunology, 65, 88 (1997)], [Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]). 따라서 이러한 아미노산의 변형은 세포-매개된 효과기 기능을 향상시킬 수 있다. 세포-매개된 효과기 기능을 증가시키기 위한 이러한 항체 변형은 유럽 특허 제EP1931709호, 국제 특허 공개 제W0200042072호에 언급되어 있고, 이것은 Fc 부분 내에서 아미노산 위치(들) 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330, 및 332에서의 치환을 포함한다. 세포-매개된 효과기 기능을 증가시키기 위한 추가 항체 변형은 유럽 특허 제EP1697415호에 언급되어 있고, 이것은 EU 아미노산 위치 277, 289, 306, 344, 또는 378의 하전된 아미노산, 극성 아미노산, 또는 비극성 아미노산으로의 아미노산 대체를 포함한다.
- [0011] 항체 포맷 및 이중특이적 및 다중특이적 항체의 포맷은 또한 웨이보디(pepbody)(국제 특허 공개 제W0200244215호), 신생 항원 수용체(Novel Antigen Receptor)("NAR")(국제 특허 공개 제W02003014161호), 다이아바디-다이아바디 이량체 "TandAb"(국제 특허 공개 제W02003048209호), 폴리알킬렌 옥사이드-변형된 scFv(미국 특허 제US7150872호), 인간화 토키 항체(국제 특허 공개 제W02005016950호), 합성 면역글로불린 도메인(국제 특허 공개 제W02006072620호), 공유 다이아바디(국제 특허 공개 제W02006113665호), 플렉시바디(flexibody)(국제 특허 공개 제W02003025018호), 도메인 항체, dAb(국제 특허 공개 제W02004058822호), 백시바디(vaccibody)(국제 특허 공개 제W02004076489호), 신세계 영장류 프레임워크를 갖는 항체(국제 특허 공개 제W02007019620호), 절단 가능한 링커를 갖는 항체-약물 접합체(국제 특허 공개 제W02009117531호), 제거된 헌지 영역을 갖는 IgG4 항체(국제 특허 공개 제W02010063785호), IgG4 유사 CH3 도메인을 갖는 이중특이적 항체(국제 특허 공개 제W02008119353호), 낙타 항체(미국 특허 제US6838254호), 나노바디(nanobody)(미국 특허 제US7655759호), CAT 다이아바디(미국 특허 제US5837242호), 표적 항원 및 CD3에 대해서 지향되는 이중특이적 (scFv)2(미국 특허 제US7235641호), sIgA 플랜티바디(p1Antibody)(미국 특허 제US6303341호), 미니바디(minibody)(미국 특허 제US5837821호), IgNAR(미국 특허 제US2009148438호), 변형된 헌지 및 Fc 영역을 갖는 항체(미국 특허 제US2008227958호, 미국 특허 제US20080181890호), 삼작용성 항체(미국 특허 제US5273743호), 트리오맙(triomab)(미국 특허 제US6551592호), 트로이바디(troybody)(미국 특허 제US6294654호)이다.
- [0012] 국제 특허 공개 제W02014122143호에는 항-인간 BCMA 항체가 개시되어 있는데, 상기 항체는 그의 결합이 405nm에서의 OD로서 ELISA 검정법에서 측정되는 경우 APRIL이 없는 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합과 비교할 때 100ng/ml APRIL에 대해서 20% 초과가 감소되지 않고, 상기 항체는 APRIL 단독과 비교할 때 APRIL-의존형 NF-κB 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않고, 상기 항체는 상기 항체가 없는 것과 비교할 때 APRIL이 없이 NF-κB 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않는 것을 특징으로 한다. 국제 특허 공개 제W02014122144호에는 국제 특허 공개 제W02014122143호의 항-인간 BCMA 항체를 포함하는, 두 표적 인간 CD3 ε 및 인간 BCMA에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체가 개시되어 있다. 특히, 이중특이적 T 세포 결합기로서의 이의 치료적 용도와 관련하여, 독특한 특성을 갖는 항-인간 BCMA 항체는, 국제 특허 공개 제W02014122143호 및 제W02014122144호에 또한 개시된, CDR 영역으로서 SEQ ID NO:15의 CDR1H, SEQ ID NO:16의 CDR2H; SEQ ID NO:17의 CDR3H, SEQ ID NO:18의 CDR1L, SEQ ID NO:19의 CDR3L, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 83A10이다.

발명의 내용

- [0013] 본 발명은 인간 B 세포 성숙화 항원(BCMA)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다. 본 발명에 따른 항체는 CDR3H 영역 및 CDR3L 영역으로서 항체 83A10과 동일한 CDR 영역을 포함한다.
- [0014] 본 발명에 따른 항체는 구체예에서 CDR3H 영역 및 CDR3L 영역으로서 항체 83A10과 동일한 CDR 영역을 포함하지

만, 환자 골수 흡인물(bone marrow aspirate)에서 MM 세포의 사멸에 대해서 항체 83A10에 비해서 특히 강력하고 효율적인 이점을 나타낸다.

- [0015] 본 발명은 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다:
- [0016] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0017] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,
- [0018] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,
- [0019] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역,
- [0020] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및
- [0021] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.
- [0022] 본 발명은 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다:
- [0023] a) SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0024] b) SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 또는
- [0025] c) SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역.
- [0026] 본 발명은 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공하며, 여기서 아미노산 49는 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택된다. 일 구체예에서 아미노산 49는 SEQ ID NO:12 내의 E, SEQ ID NO:13 내의 S 또는 SEQ ID NO:14 내의 H이다.
- [0027] 본 발명은 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공하며, 여기서 아미노산 74는 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)이다. 일 구체예에서 아미노산 74는 SEQ ID NO:14 내의 A이다.
- [0028] 본 발명에 따른 항체는 구체예에서 CDR3H, CDR1L, CDR2L, 및 CDR3L 영역으로서 항체 83A10과 동일한 CDR 영역을 포함한다. 본 발명은 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 포함한다:
- [0029] a) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역,
- [0030] b) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, 또는
- [0031] c) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역.
- [0032] 본 발명은 일 구체예에서 SEQ ID NO:12의 VL 영역 및 SEQ ID NO:38, 39, 및 40의 VH 영역을 포함하는 군으로부터 선택된 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공하며, 여기서 아미노산 49는 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택된다. 일 구체예에서 아미노산 49는 E이다.

- [0033] 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:13의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다.
- [0034] 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:38, 39, 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:38의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:39의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 VH 영역으로서 SEQ ID NO:40의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다.
- [0035] 일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 추가로 시노몰구스(cynomolgus) BCMA에 또한 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 일 구체예에서 본 발명의 항체는 BCMA에 대한 결합과 관련하여 1.5 내지 5 또는 1.5 내지 10 또는 1.5 내지 16(표 5)의 시노몰구스/인간 친화성 캡을 나타낸다.
- [0036] 따라서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 일 구체예에서 시노몰구스 CD3에 또한 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 일 구체예에서 본 발명의 이중특이적 항-BCMA/항-CD3 항체는 1.25 내지 5 또는 0.8 내지 1.0의 Mab CD3의 시노몰구스/인간 캡을 나타낸다.
- [0037] 본 발명의 추가 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 다중특이적 항체, 이중특이적 항체, 단체 가변 단편(scFv), 예컨대 이중특이적 T 세포 관여기(engager), 다이아바디, 또는 탄뎀(tandem) scFv, 항체 모방체, 예컨대 DARPin, 네이키드 단일특이적 항체, 또는 항체 약물 접합체를 비롯한, Fc 부분을 갖거나 또는 Fc 부분을 갖지 않는 항체이다. 일 구체예에서 다중특이적 항체, 이중특이적 항체, 이중특이적 T 세포 관여기, 다이아바디, 또는 탄뎀 scFv는 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합한다.
- [0038] 본 발명에 따른 항체를 기반으로, BCMA에 대한 항체-약물 접합체 및 BCMA에 대한 다중특이적 또는 이중특이적 항체 및 최신 기술에 공지된 Fc 부분이 있거나 없는 상이한 포맷의 1종 이상의 추가 표적(예를 들어, 상기 "배경기술" 참고), 단체 가변 단편(scFv), 예컨대 이중특이적 T 세포 관여기, 다이아바디, 탄뎀 scFv, 및 항체 모방체, 예컨대 DARPin를 생성하는 것이 가능하며, 이를 모두 또한 본 발명의 구체예다. 이중특이적 항체 포맷은 최신 기술에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 또한 문헌[Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012)]; [Holliger P., HudsonPJ, Nature Biotech. 23 (2005) 1126- 1136] 및 [Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010)] 및 [Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362]에 기술되어 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구체예는 BCMA 결합 부분으로서 본 발명에 따른 항-BCMA 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 2개의 표적 인간 CD3 ε(추가로 "CD3"이라고도 명명됨) 및 인간 BCMA(추가로 "BCMA"라고도 명명됨)의 세포외도메인에 대한 이중특이적 항체이다.
- [0040] 본 발명은 일 구체예에서 BCMA 결합 부분 내에 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체에 관한 것이다:
- [0041] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0042] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,
- [0043] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,
- [0044] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의

CDR2L 영역,

[0045] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및

[0046] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.

[0047] 본 발명은 일 구체예에서 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 본 발명에 따른 항체의 VH 영역("BCMA VH"라 추가로 명명됨) 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역("BCMA VL"이라 추가로 명명됨)을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체에 관한 것이다:

[0048] a) SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,

[0049] b) SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 또는

[0050] c) SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역.

[0051] 본 발명은 일 구체예에서 BCMA VH로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 제공한다.

[0052] 본 발명은 일 구체예에서 BCMA VL이 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 일 구체예에서 BCMA VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 BCMA VH로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:13의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 본 발명은 일 구체예에서 BCMA VH로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체를 제공한다.

[0053] 본 발명은 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 제공하며, 여기서 아미노산 49는 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택된다. 일 구체예에서 아미노산 49는 E(SEQ ID NO:12), S(SEQ ID NO:13) 또는 H(SEQ ID NO:14)이다. 본 발명은 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 제공하며, 여기서 아미노산 74는 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)이다. 일 구체예에서 아미노산 74는 SEQ ID NO:14 내의 A이다.

[0054] 본 발명은 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 BCMA VH 및 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 BCMA VL을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체에 관한 것이다:

[0055] a) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역,

[0056] b) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, 또는

[0057] c) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역.

[0058] BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체는 일 구체예에서 본 발명에 따른 항 BCMA 항체 및 항 CD3 항체를 포함하는 것을 특징으로 하며, 여기서

[0059] a) 항체의 경쇄 및 중쇄는 상기 표적 CD3 및 BCMA 중 하나에 특이적으로 결합하고;

[0060] b) 항체의 경쇄 및 중쇄는 상기 표적 중 나머지 하나에 특이적으로 결합하고, 여기서 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로에 의해서 대체된다.

[0061] 일 구체예에서 상기 항-CD3 항체 부분의 VH 도메인은 상기 항-BCMA 항체 부분의 CH1 또는 CL 도메인에 연결된다. 일 구체예에서 상기 항-CD3 항체 부분의 VL 도메인은 상기 항-BCMA 항체 부분의 CH1 또는 CL 도메인에 연결된다.

[0062] 일 구체예에서 이중특이적 항체는 항-CD3 항체 부분의 1개 이하의 Fab 단편, 항-BCMA 항체 부분의 2개 이하의 Fab 단편 및 1개 이하의 Fc 부분, 일 구체예에서 인간 Fc 부분을 포함한다. 일 구체예에서 항-CD3 항체 부분의

1개 이하의 Fab 단편 및 항-BCMA 항체 부분의 1개 이하의 Fab 단편은 Fc 부분에 연결되고, 연결은 헌지 영역에 대한 Fab 단편(들)의 C-말단 결합을 통해서 수행된다. 일 구체예에서 항-BCMA 항체 부분의 제2 Fab 단편은 항-CD3 항체 부분의 Fab 단편의 N-말단 또는 Fc 부분의 헌지 영역에, 따라서 Fc 부분과 항-CD3 항체 부분 사이에 이의 C-말단을 통해서 연결된다. 바람직한 이중특이적 항체가 도 1 내지 도 3에 도시되어 있다.

[0063] "aa 치환"을 갖거나 갖지 않는, 명시된 바와 같은 Fab 단편 및 Fc 부분 만을 포함하는 이중특이적 항체가 특히 바람직하다:

[0064] Fab BCMA-Fc-Fab CD3(이중특이적 포맷 도 1A 또는 도 1B),

[0065] Fab BCMA-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(이중특이적 포맷 도 2A 또는 도 2B),

[0066] Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(이중특이적 포맷 도 2C 또는 도 2D),

[0067] Fc-Fab CD3-Fab BCMA(이중특이적 포맷 도 3A 또는 도 3B),

[0068] Fc-Fab BCMA-Fab CD3(이중특이적 포맷 도 3C 또는 도 3D).

[0069] 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같이 "Fab BCMA-Fc, "Fab BCMA-Fc-Fab CD3" 및 "Fab BCMA-Fc-Fab CD3"은 Fab 단편(들)이 이의(이들의) C-말단을 통해서 Fc 단편의 N-말단에 결합된 것을 의미한다. "Fab CD3-Fab BCMA"는 Fab CD3 단편이 이의 N-말단을 사용하여 Fab BCMA 단편의 C-말단에 결합된 것을 의미한다. "Fab BCMA - Fab CD3"은 Fab BCMA 단편이 이의 N-말단을 사용하여 Fab CD3 단편의 C-말단에 결합된 것을 의미한다.

[0070] 일 구체예에서 이중특이적 항체는 이의 C-말단을 사용하여 상기 이중특이적 항체의 CD3 항체 부분의 N-말단에 연결된 상기 항-BCMA 항체의 제2 Fab 단편을 포함한다. 일 구체예에서 상기 제1 항-CD3 항체 부분의 VL 도메인은 상기 제2 항-BCMA 항체의 CH1 또는 CL 도메인에 연결된다.

[0071] 일 구체예에서 이중특이적 항체는 이의 C-말단을 사용하여 Fc 부분(상기 항-BCMA 항체의 제1 Fab 단편과 유사함)에 연결되고, 이의 N-말단을 사용하여 CD3 항체 부분의 C-말단에 연결된 상기 항-BCMA 항체의 제2 Fab 단편을 포함한다. 일 구체예에서 상기 항-CD3 항체 부분의 CH1 도메인은 상기 제2 항-BCMA 항체 부분의 VH 도메인에 연결된다.

[0072] 일 구체예에서 이중특이적 항체는 이의 N-말단을 사용하여 상기 CD3 항체 Fab 단편의 C-말단에 연결된 Fc 부분을 포함한다. 일 구체예에서 이중특이적 항체는 이의 제1 N-말단을 사용하여 상기 CD3 항체 Fab 단편의 C-말단에 연결된 Fc 부분 및 이의 C-말단을 사용하여 Fc 부분의 제2 N-말단에 연결된 상기 항-BCMA 항체의 제2 Fab 단편을 포함한다. 일 구체예에서 CD3 항체 Fab 단편의 CL 도메인은 Fc 부분의 헌지 영역에 연결된다. 일 구체예에서 BCMA 항체 Fab 단편의 CH1 도메인은 Fc 부분의 헌지 영역에 연결된다.

[0073] Fab 단편은 최신 기술에 따른 적절한 링커의 사용에 의해서 함께 화학적으로 연결된다. 일 구체예에서 (Gly4-Ser1)3 링커가 사용된다(문헌[Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33] 및 [Mack M. et al., PNAS July18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025]). "화학적으로 연결된"(또는 "연결된")은 본 발명에 따라서 단편이 공유 결합에 의해서 연결된 것을 의미한다. 링커는 펩타이드 링커이기 때문에, 이러한 공유 결합은 통상적으로 각각의 Fab 단편의 VL 도메인 및/또는 VH 도메인을 인코딩하는 핵산, 링커 및 적절한 경우 Fc 부분 쇄를 사용하여 생화학적 재조합 수단에 의해서 수행된다.

[0074] 본 발명은 일 구체예에서 항-CD3 항체 부분의 가변 도메인 VH(추가로 "CD3 VH"라고 명명됨)가 각각 중쇄 CDR1H, CDR2H 및 CDR3H로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하고, 항-CD3 항체 부분의 가변 도메인 VL(추가로 "CD3 VL"이라고 명명됨)이 각각 경쇄 CDR1L, CDR2L 및 CDR3L로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0075] 일 구체예에서 이러한 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항 CD3 ε 항체 부분의 가변 도메인이 SEQ ID NO:7 및 8을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0076] 본 발명은 항-CD3 항체 부분이 이의 N-말단에서 항-BCMA 항체 부분의 C-말단에 연결되고, 항-CD3 항체 부분의 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로에 의해서 대체된 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0077] 일 구체예에서 상기 항-CD3 항체 부분의 VH 도메인은 상기 항-BCMA 항체 부분의 CH1 또는 CL 도메인에 연결된다. 일 구체예에서 상기 항-CD3 항체 부분의 VL 도메인은 상기 항-BCMA 항체 부분의 CH1 또는 CL 도메인

에 연결된다.

본 발명에 따른 항체 부분은 일 구체예에서 각각의 항체의 Fab 단편이다.

본 발명의 또 다른 구체예에서 경쇄 내의 가변 도메인 VL 및 VH 및 항-CD3 항체 부분 또는 항-BCMA 항체 부분의 각각의 중쇄가 서로에 의해서 대체된, 이중특이적 항체는, 항-CD3 항체 부분 또는 항-BCMA 항체 부분의 불변 도메인 CL을 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 각각의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)에 의해서 치환된다. 일 구체예에서 항체는 CD3 결합에 대해서 1가이다. 일 구체예에서 불변 도메인 CL 내의 위치 124에서의 아미노산 치환에 더하여 위치 123에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(추가로 "전하 변이체 교환(charge variant exchange)"이라 지칭됨)에 의해서 치환된다. 일 구체예에서 항체는 CD3 결합에 대해서 1가이고, 아미노산 124는 K이고, 아미노산 147은 E이고, 아미노산 213은 E이고, 아미노산 123은 R이다. 일 구체예에서 이중특이적 항체는 또한 동일한 항-BCMA 결합 부분을 1회 초과 포함한다(일 구체예에서 Fab 단편). 이는, 또한, 제1 항-BCMA 결합 부분이 전하 변이체 교환을 포함하면, 제2 항-BCMA 결합 부분이 동일한 전하 변이체 교환을 포함한다는 것을 의미한다(모든 아미노산 번호 부여는 카바트에 따른).

본 발명은 하기로 특징으로 하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다:

a) BCMA에 특이적으로 결합하는 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄; 및

b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄 내의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로에 의해서 대체되고;

c) 여기서 a) 하의 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 a) 하의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환됨(예를 들어, 도 1A, 2a, 2c, 3a, 3c 참고).

일 구체예에서 상기 마지막 단락에 기술된 상기 이중특이적 항체는 추가로 상기 이중특이적 항체가 또한 상기 제1 항체의 Fab 단편(추가로 "BCMA-Fab"이라고도 명명됨)을 포함하고, 상기 BCMA-Fab의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산이 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 상기 BCMA-Fab의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산이 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환된 것을 특징으로 한다(예를 들어 도 2A, 2c 참고).

본 발명은 추가로 하기로 특징으로 하는 본 발명에 따른 이중특이 적 핵체에 관한 것이다:

a) BCMA에 특이적으로 결합하는 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄; 및

b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄 내의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로에 의해서 대체되고;

c) b) 하의 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 b) 하의 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환됨.

일 구체예에서 제1 또는 제2 경쇠의 불변 도메인 CL 내의 위치 124에서의 아미노산 치환에 더하여 위치 123에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에 의해서 치환된다.

일 구체예에서 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 라이신(K)에 의해서 치환되고, 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 글루탐산(E)에 의해서 치환된다. 일 구체예에서 불변 도메인 CL에 더하여 위치 123에서의 아미노산은 아르기닌(R)에 의해서 치환된다.

본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 이종특이적 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 하나의 Fab 단편(추가로 "CD3-Fab"라고도 명명됨), 및 본 발명에 따른 항-BCMA 항체의 하나의 Fab 단편(추가로 "BCMA-Fab(들)"라고도 명명됨) 및 Fc 부분으로 이루어지고, 여기서 CD3-Fab 및 BCMA-Fab는 이들의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 힘지 영역에 연결된다. CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 중 하나는 aa 치환을 포함하고, CD3-Fab는 크로스

오버(crossover)를 포함한다(도 1A 및 도 1B).

- [0092] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 하나의 CD3-Fab, 및 하나의 BCMA-Fab 및 Fc 부분으로 이루어지며, 여기서 CD3-Fab 및 BCMA-Fab는 이들의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역 및 제2 BCMA-Fab에 연결되고, 이것은 이의 C-말단을 사용하여 CD3-Fab의 N-말단에 연결된다. CD3-Fab는 크로스오버 및 CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 둘 모두 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 2A 및 도 2B). BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab를 포함하고, 여기서 BCMA-Fab 둘 모두가 aa 치환을 포함하고, CD3-Fab가 VL/VH 크로스오버를 포함하는 이중 특이적 항체가 특히 바람직하다(도 2A). BCMA-Fab-Fc-CD3-Fab-BCMA-Fab로 이루어지고, 여기서 BCMA-Fab 둘 모두가 aa 치환 Q124K, E123R, K147E 및 K213E를 포함하고, CD3-Fab가 VL/VH 크로스오버를 포함하는 이중특이적 항체가 특히 바람직하다. BCMA-Fab 둘 모두가 CDR로서 항체 21, 22, 또는 42의 CDR, 또는 VH/VL로서 항체 21, 22, 또는 42의 VH/VL을 포함하는 것이 특히 바람직하다.
- [0093] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2개의 BCMA-Fab 및 Fc 부분으로 이루어지며, 여기서 하나의 BCMA-Fab 및 CD3 Fab는 이들의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역에 연결되고, 제2 BCMA-Fab는 이의 C-말단을 사용하여 CD3-Fab의 N-말단에 연결된다. CD3-Fab는 크로스오버 및 CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 둘 모두 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 2A 및 도 2B).
- [0094] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2개의 BCMA-Fab 및 Fc 부분으로 이루어지며, 여기서 BCMA-Fab는 이들의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역 및 CD3-Fab에 연결되며, 이것은 이의 C-말단을 사용하여 하나의 BCMA-Fab의 N-말단에 연결된다. CD3-Fab는 크로스오버 및 CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 둘 모두 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 2C 및 도 2D).
- [0095] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 이의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역에 연결된 하나의 CD3-Fab, 및 이의 C-말단을 사용하여 CD3-Fab의 N-말단에 연결된 BCMA-Fab로 이루어진다. CD3-Fab는 크로스오버를 포함하고, CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 1A 및 1b).
- [0096] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 이의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역에 연결된 하나의 CD3-Fab, 및 이의 C-말단을 사용하여 CD3-Fab의 N-말단에 연결된 BCMA-Fab로 이루어진다. CD3-Fab는 크로스오버를 포함하고, CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 3A 및 3b).
- [0097] 본 발명의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 이의 C-말단을 통해서 상기 Fc 부분의 헌지 영역에 연결된 하나의 BCMA-Fab, 및 이의 C-말단을 사용하여 BCMA-Fab의 N-말단에 연결된 CD3-Fab로 이루어진다. CD3-Fab는 크로스오버를 포함하고, CD3-Fab 또는 BCMA-Fab 중 하나는 aa 치환을 포함한다(도 3C 및 3d).
- [0098] Fab 단편은 최신 기술에 따른 적절한 링커의 사용에 의해서 함께 화학적으로 연결된다. 일 구체예에서 (Gly4-Ser1)3 링커가 사용된다(문헌[Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33] 및 [Mack M. et al., PNAS July18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025]). 두 Fab 단편 사이의 연쇄(linkage)는 중쇄들 사이에서 수행된다. 따라서 제1 Fab 단편의 CH1의 C-말단은 제2 Fab 단편의 VH의 N-말단(크로스오버 없음) 또는 VL(크로스오버)에 연결된다. Fab 단편과 Fc 부분 사이의 연쇄는 CH1과 CH2 사이의 연쇄로서 본 발명에 따라서 수행된다.
- [0099] BCMA에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 Fab 단편 및 제2 Fab 단편은 일 구체예에서 동일한 항체로부터 유도되고, 일 구체예에서 CDR 서열, 가변 도메인 서열 VH 및 VL 및/또는 불변 도메인 서열 CH1 및 CL에서 동일하다. 일 구체예에서 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 Fab 단편 및 제2 Fab 단편의 아미노산 서열은 동일하다. 일 구체예에서 BCMA 항체는 항체 21, 22, 또는 42의 CDR 서열을 포함하는 항체, 항체 21, 22, 또는 42의 VH 서열 및 VL 서열을 포함하는 항체, 또는 항체 21, 22, 또는 42의 VH, VL, CH1, 및 CL 서열을 포함하는 항체이다.
- [0100] 일 구체예에서 이중특이적 항체는 Fab 단편 및 Fc 부분으로서, 항-CD3 항체의 1개 이하의 Fab 단편, 항-BCMA 항체의 2개 이하의 Fab 단편 및 1개 이하의 Fc 부분, 일 구체예에서 인간 Fc 부분을 포함한다. 일 구체예에서 항-BCMA 항체의 제2 Fab 단편은 이의 C-말단을 통해서 항-CD3 항체의 Fab 단편의 N-말단 또는 Fc 부분의 헌지 영역 중 하나에 연결된다. 일 구체예에서 연쇄는 BCMA-Fab의 CH1과 CD3-Fab의 VL 사이에서 형성된다(VL/VH 크로스오버).
- [0101] 일 구체예에서 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 항체 부분, 일 구체예에서 Fab 단편은, 각각 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VH 및 각각 항-CD3 ε 항체의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VL을 포함하는 것을 특징으로 한다(CDR MAB CD3). 일 구체예에서 인간 CD3에 특이적으로 결합하는 항체 부분은 가변 도메인이 SEQ ID

NO:7 및 8을 갖는 것을 특징으로 한다(VHVL MAB CD3).

- [0102] 본 발명은 하기 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 BCMA의 세포의 도메인 및 인간 CD3 ε에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체에 관한 것이다:
- [0103] i) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, 및 SEQ ID NO:51(2x); (항체 21의 세트 1TCB),
- [0104] ii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, 및 SEQ ID NO:54(2x)(항체 22의 세트 2TCB), 및
- [0105] iii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57(2x)(항체 42의 세트 3 TCB).
- [0106] 일 구체예에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 하나의 중쇄의 CH3 도메인 및 나머지 중쇄의 CH3 도메인 각각이 항체 CH3 도메인들 사이의 본래 계면을 포함하는 계면에서 만나는 것을 특징으로 하고; 여기서 상기 계면은 이중특이적 항체의 형성을 촉진시키도록 변경되고, 여기서 변경은 하기를 특징으로 한다:
- [0107] a) 하나의 중쇄의 CH3 도메인은, 이중특이적 항체 내의 나머지 중쇄의 CH3 도메인의 본래 계면과 만나는 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 본래 계면 내에서, 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해서 다른 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내의 공동(cavity)에 위치 가능한 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에 돌기(protuberance)를 생성하도록 변경되고,
- [0108] b) 나머지 중쇄의 CH3 도메인은, 이중특이적 항체 내의 제1 CH3 도메인의 본래 계면과 만나는 제2 CH3 도메인의 본래 계면 내에서, 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해서 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌기가 위치 가능한 제2 CH3 도메인의 계면 내에 공동을 생성하도록 변경됨.
- [0109] 일 구체예에서 이러한 이중특이적 항체는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기가 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0110] 일 구체예에서 이러한 이중특이적 항체는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기가 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 발린(V)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0111] 일 구체예에서 이러한 이중특이적 항체는 CH3 도메인 둘 모두가 각각의 CH3 도메인의 상응하는 위치에서 아미노산으로서 시스테인(C)의 도입에 의해서 추가로 변경된 것을 특징으로 한다.
- [0112] 일 구체예에서 이러한 이중특이적 항체는 두 중쇄의 불변 중쇄 도메인 CH3 중 하나가 불변 중쇄 도메인 CH1에 의해서 대체되고; 나머지 불변 중쇄 도메인 CH3이 불변 경쇄 도메인 CL에 의해서 대체된 것을 특징으로 한다.
- [0113] 본 발명은 추가로 대조군으로서 모 Fc 부분을 갖는 동일한 항체를 사용하여 동일한 조건 하에서의 대조군에 비해서 ADCC에 의해서 100nM의 상기 항체의 농도에서 24시간 후 제조 BCMA 발현 세포의 20% 이상의 세포사를 유도하는 변형된 Fc 부분을 포함하는, 본 발명에 따른 항체에 관한 것이다. 이러한 항체는 일 구체예에서 네이키드 항체이다.
- [0114] 일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 Asn297에서 올리고당(당)의 총량의 60% 이하의 푸코스의 양을 갖는 항체이다(예를 들어, 미국 특허 제US20120315268호 참고).
- [0115] 일 구체예에서 Fc 부분은 인간 Fc 부분 내에 도입되고, SEQ ID NO:55 및 56에 개시된 아미노산 치환을 포함한다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 구체예는 본 발명에 따른 항-BCMA 항체의 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 이러한 구체예에서 항-BCMA 항체는 본 발명에 따른 항체의 단쇄 VH 도메인 및 VL 도메인 및 CD3-제타(zeta) 막관통 및 엔도도메인으로 이루어진다. 바람직하게는 CD3 제타 도메인은 간격자(spacer)를 통해서 상기 VL 도메인의 C-말단과 연결되고, VL 도메인의 N 말단은 간격자를 통해서 상기 VH 도메인의 C 말단에 연결된다. BCMA 항체의 키메라 항원 수용체, 유용한 막관통 도메인 및 엔도도메인, 및 생산 방법은 예를 들어, 문헌[Ramadoss NS. et al., J. Am. Chem. Soc. J., DOI: 10.1021/jacs.5b01876 (2015)], [Carpenter RO et al., Clin. Cancer. Res. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422 (2013)], 국제 특허 공개 제WO2015052538호 및 제WO2013154760호에 기술되어 있다.
- [0117] 본 발명의 또 다른 구체예는 항원 결합 단편, 특히 Fab 단편으로서, BCMA 및 CD3에 결합하는 이중특이적 항체(Fc 부분을 갖는 것 및 갖지 않는 것)로서, 기술된 포맷, 특히 2+1 포맷의 이중특이적 항체로서, 본 명세서에 기술된 바와 같은, 특히 표 1A에 기술된 바와 같은 중쇄 및 경쇄를 갖는 이중특이적 항체로서의, 기술된 CL 서열 및 CH1 서열과 함께 이의 CDR 서열, 및/또는 VH/VL 서열에 의해서 본 명세서에 기술된 바와 같은 항체

Mab21, Mab22, Mab42, Mab27, Mab33, 및 Mab39이다.

[0118] 본 발명의 또 다른 구체예는 본 발명에 따른 이중특이적 포맷에서, 항체 83A10의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 과지-디스플레이 라이브러리(VH 라이브러리, VL 라이브러리)를 1 내지 50nM의 cynoBCMA와 함께 1 내지 3 라운드로 패닝(panning)시키는 단계 및 이러한 이중특이적 T 세포 결합기로서 이러한 특징을 갖는 가변 경쇄 및 가변 중쇄를 선택하는 단계를 특징으로 하는, 10nM 내지 1fM(이들 값 포함)의 농도에서 48시간 치료 후 다발성 골수종 MM 골수 흡인물 중의 인간 악성 형질 세포를 적어도 80%로 감소시키는 항-BCMA 항체의 생성 방법이다. 바람직하게는 패닝은 1 라운드의 경우에는 50nM의 cynoBCMA를 사용하고, 2 라운드의 경우에는 25nM의 cyBCMA를 사용하고, 3 라운드의 경우에는 10nM의 cyBCMA를 사용하여 3 라운드로 수행된다. 바람직하게는, 라이브러리는 경쇄 CDR1 및 CDR2 또는 중쇄 CDR1 및 CDR2 중 하나로 무작위화된다. 바람직하게는 각각이 또한 항체 83A10의 상응하는 VH 또는 VL을 포함하는, Fab 단편으로서, 50pM 내지 5nM의 Kd로 huBCMA에 결합하고, 0.1nM 내지 20nM의 Kd로 cynoBCMA에 결합하는 경쇄 및 중쇄가 식별된다. 바람직하게는 이중특이적 포맷은, 서로에 의해서 그리고 BCMA Fab 둘 모두 내에서의 CD3 Fab 대체의 각각의 불변 도메인 VL 및 VH, CH1 도메인 내에서의 아미노산 교환 K213E 및 K147E 및 CL 도메인 내에서 아미노산 교환 E123R 및 Q124K를 포함하는, 도 2A의 포맷이다.

[0119] 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 단계를 포함하는 본 발명에 따른 항체의 제조 방법이다:

[0120] a) 숙주 세포를

[0121] b) 본 발명에 따른 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환시키는 단계,

[0122] c) 숙주 세포를 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

[0123] d) 상기 항체 분자를 상기 배양물로부터 회수하는 단계.

[0124] 본 발명의 또 다른 구체예는 하기 단계를 포함하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 제조 방법이다:

[0125] e) 숙주 세포를

[0126] f) 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터

[0127] g) 제2 표적에 특이적으로 결합하는 항체(여기서 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로에 의해서 대체됨)의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환시키는 단계;

[0128] h) 숙주 세포를 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

[0129] i) 상기 항체 분자를 상기 배양물로부터 회수하는 단계.

[0130] 본 발명의 또 다른 구체예는 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포이다. 본 발명의 또 다른 구체예는 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 제2 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포이고, 여기서 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로에 의해서 대체된다.

[0131] 본 발명의 또 다른 구체예는 본 발명에 따른 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0132] 본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0133] 본 발명의 또 다른 구체예는 형질 세포 장애의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0134] 본 발명의 또 다른 구체예는 다발성 골수종의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0135] 본 발명의 또 다른 구체예는 전신 홍반 루푸스의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0136] 본 발명의 또 다른 구체예는 항체-매개 거부의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 단일특이적 항체, ADCC 증강된 네이키드 항체, 항체-약물 접합체, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 비롯한, 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0137]

일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 형질 세포 장애, 예컨대 하기에 기술된 바와 같은 BCMA를 발현시키는 다른 형질 세포 장애 또는 다발성 골수종 MM의 치료를 위해서 사용될 수 있다. MM은 골수 구획에서 비정상 형질 세포의 단일클론 확장 및 축적을 특징으로 하는 혈장 세포 악성종양이다. MM은 또한 동일한 IgG 유전자 재배열 및 체세포 초돌연변이를 갖는 클론성 형질 세포를 포함한다. MM은 낮은 수준의 골수 형질 세포 및 단일클론 단백질을 특징으로 하는, 미지 유의성의 단일클론 감마글로불린혈증(monoclonal gammopathy of unknown significance: MGUS)이라 불리는 무증상의 전암성 병태로부터 발생한다. MM 세포는 낮은 비율로 증식한다. MM은 복수의 구조적 염색체 변화(multiple structural chromosomal change)(예를 들어, 불균형 전위)의 점진적 발생으로부터 야기된다. MM은 악성 형질 세포 및 골수 미세환경(예를 들어, 정상 골수 간질 세포)의 상호작용을 수반한다. 활성 MM의 임상 징후는 단일클론 항체 스파이크(spike), 골수에 과잉 밀집하는 형질 세포, 골 용해 병변 및 과골세포의 과자극으로부터 야기된 골 파괴를 포함한다(문헌[Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl7: vii143-150]). 형질 세포를 수반하는, 즉 BCMA를 발현시키는, 또 다른 형질 세포 장애는 루푸스라고도 알려진 전신 홍반 루푸스(SLE)이다. SLE는 신체 어느 부분이라도 영향을 미칠 수 있는 전신성 자가면역 질환이고, 면역 체계가 신체 자신의 세포 및 조직을 공격하여 만성 염증 및 조직 손상을 야기하는 것으로 나타난다. 이것은 항체-면역 복합체가 침전하고, 추가 면역 반응을 야기하는 제3형 과민 반응이다(문헌[Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337]). 추가의 형질 세포 장애는 형질 세포 백혈병 및 AL-아밀로이드증이다(또한 실시예 19 및 실시예 20 참고). 이들 형질 세포 장애 모두에서, 본 발명에 따른 항체에 의한 형질 세포/악성 형질 세포의 감소는 이러한 질환을 앓고 있는 환자에게 이로울 것이라고 예상된다.

[0138]

본 발명의 또 다른 구체예는 급성 및 만성 항체-매개 거부(AMR)를 비롯한 형질 세포 및 동종항체를 포함하는 항체-매개된 동종이식(allograft) 거부의 치료를 위한 본 발명에 따른 항체이다. 급성 AMR은 수일에 걸쳐 발생하는 이식편 기능장애를 특징으로 하고, 이식 후 발생된 미리-형성되거나 신생(de novo) 공여자 특이적 항체의 결과이다. 그것은 모든 신장 이식의 5 내지 7%에서 일어나고, 사전 감응화된 양성 교차매치 환자 중에서 급성 거부 반응의 20 내지 48%를 유발한다(문헌[Colvin and Smith, Nature Rev Immunol 2005; 5 (10): 807-817]). 급성 AMR을 갖는 환자에서의 조직병리학은 종종 재피 세포 팽윤, 사구체 및 림프 모세혈관의 호중구 침윤, 피브린 혈전, 간질 부종 및 출혈을 드러낸다(문헌[Trpkov et al. Transplantation 1996; 61 (11): 1586-1592]). AMR은 C4d-염색 또는 동종이식 생검물에서의 다른 개선된 항체 검출 방법으로 식별될 수 있다. AMR의 또 다른 형태는 또한 만성 동종이식 손상으로 공지되어 있으며, 이는 공여자 특이적 항체를 포함하지만, 이식 후 수개월 및 심지어는 수년 이내에 나타난다. 그것은 신장 생검물 상에서 이식 사구체 신염(만성 동종이식 사구체 신염이라고도 알려짐)으로서 인지되고, 사구체 간질 확장 및 모세혈관 기저막 중복을 특징으로 한다(문헌[Regele et al. J Am Soc Nephrol 2002; 13 (9): 2371-2380]). 임상 징후는 초기에 무증상인 환자에서 진행성 병기에서 신증 범위 단백뇨, 저혈압, 및 동종이식 기능장애를 갖는 환자까지 다양하다. 질환 진행은 특히 진행형 급성 AMR을 갖는 경우 매우 급격할 수 있어서, 수개월 내에 이식 실패가 발생한다(문헌[Fotheringham et al. Nephron - Clin Pract 2009; 113 (1): c1-c7]). 환자 생검에서 이식 사구체 신염의 유병률은 1년에 5%에서 5년에 20%까지 다양하다(문헌[Cosio et al. Am J Transplant 2008; 8: 292-296]).

[0139]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체이다.

[0140]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0141]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 네이키드 항체 또는 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0142]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 증가된 효과기 기능을 갖는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0143]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 감소된 효과기 기능을 갖는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0144]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 이중특이적인 항체로서 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0145]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 다중특이적인 항체로서 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0146]

본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 치료제(약물 접합체), 예를 들어, 세포독성제 또는 방사성표지를 갖는 접합체로서 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0147] 본 발명의 또 다른 구체예는 의약으로서 사용하기 위한 다이아바디로서 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0148] 일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는, 특히 CD3 및 BCMA에 대한 이중특이적 항체인 경우, 일 구체예에서 피하 투여를 통해서 1주에 1회 또는 2회(예를 들어, 일 구체예에서 0.1 내지 2.5, 바람직하게는 25mg/m²/주, 바람직하게는 250mg/m²/주의 용량 범위로) 투여된다. 본 발명에 따른 항체의 우수한 세포독성 활성으로 인해서, 그것은 T 세포 이중특이적이 아닌(즉, 하나의 암 상에서 CD3에 결합하지 않는) 종래의 이중특이적 항체 또는 종래의 단일특이적 항체와 비교할 때 적어도 동일한 정도의 임상 용량 범위(또는 심지어는 더 낮음)로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 경우 피하 투여가 임상 설정치(예를 들어, 0.1 내지 250mg/m²/주의 용량 범위)에서 바람직하다고 예상된다. 또한, 높은 수준의 혈청 APRIL 및 BAFF를 갖는 환자(예를 들어, 다발성 골수종 환자)에서 본 발명에 따른 항체에 대해서 용량을 증가시킬 필요가 없을 수 있는데, 그 이유는 그것이 리간드 경쟁에 의해서 영향을 받지 않을 수 있기 때문이다. 이에 반해서, 다른 리간드-차단/경쟁 항-BCMA 항체에 대한 용량은 이러한 환자에서 증가될 필요가 있을 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 또 다른 이점은 약 4 내지 12일의 제거 반감기인데, 이것은 적어도 1회 또는 2회/주 투여를 허용한다.

[0149] 일 구체예에서, 네이키드/비접합 ADCC 증강 단일특이적 항체의 경우에서 본 발명에 따른 항체는 정맥내 경로에 의해서, 그러나 바람직하게는 피하 투여를 통해서 주당 1회/2회 투여를 허용하는 특성을 갖는 항체이다(예를 들어, 4주 동안 200 내지 2000mg/m²/주의 투여량). 본 발명에 따른 항체의 경우 피하 투여가 임상 설정치(예를 들어, 질환 적응증에 따라서, 200 내지 2000mg/m²/주의 용량 범위)에서 가능하고, 바람직하다고 예상된다. 또한, 높은 수준의 혈청 APRIL 및 BAFF를 갖는 환자(예를 들어, 다발성 골수종 환자)에서 본 발명에 따른 항체(예를 들어, 비-리간드 차단/경쟁 항체)에 대해서 용량을 증가시킬 필요가 없을 수 있는데, 그 이유는 그것이 리간드 경쟁에 의해서 영향을 받지 않을 수 있기 때문이다. 이에 반해서, 다른 리간드-차단/경쟁 항-BCMA 항체에 대한 용량은 이러한 환자에서 증가될 필요가 있어서, 피하 투여를 기술적으로 더 도전적으로 만들 수 있다(예를 들어, 약제학). 본 발명에 따른 항체의 또 다른 이점은 Fc 부분의 포함을 기반으로 하는데, 이는 4 내지 12일의 제거 반감기와 연관되고, 적어도 1회 또는 2회/주 투여를 허용한다.

[0150] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 진단 조성물이다.

도면의 간단한 설명

[0151] 도 1. 하기에 명시된 바와 같은 Fab 단편(CD3 및 BCMA에 대해서 특이적임) 및 Fc 부분 만을 포함하는 이중특이적 2가 항체: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3; (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE). 생산 시에 LC 잘못 짹지어짐/부산물을 감소시키기 위해서 RK/EE에 대한 aa 치환이 CL-CH1에 도입됨. Fab CD3은 LC 잘못 짹지어짐 및 부산물을 감소시키기 위해서 VL-VH 크로스오버를 포함한다.

도 2. 하기에 명시된 바와 같은 Fab 단편(CD3 및 BCMA에 대해서 특이적임) 및 Fc 부분 만을 포함하는 바람직한 이중특이적 3가 항체: (A) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fab BCMA-Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fab BCMA(RK/EE)-Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fab BCMA-Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). 생산 시에 LC 잘못 짹지어짐/부산물을 감소시키기 위해서 RK/EE에 대한 aa 치환이 CL-CH1에 도입됨. 바람직하게는, Fab CD3은 LC 잘못 짹지어짐 및 부산물을 감소시키기 위해서 VL-VH 크로스오버를 포함한다. 바람직하게는, Fab CD3 및 Fab BCMA는 가요성 링커를 사용하여 서로에 연결된다.

도 3. 하기에 명시된 바와 같은 Fab 단편(CD3 및 BCMA에 대해서 특이적임) 및 Fc 부분 만을 포함하는 이중특이적 2가 항체: (A) Fc-Fab CD3-Fab BCMA(RK/EE); (B) Fc-Fab CD3(RK/EE)-Fab BCMA; (C) Fc-Fab BCMA(RK/EE)-Fab CD3; (D) Fc-Fab BCMA-Fab CD3(RK/EE). 바람직하게는, Fab CD3은 LC 잘못 짹지어짐 및 부산물을 감소시키기 위해서 VL-VH 크로스오버를 포함한다. Fab CD3 및 Fab BCMA는 가요성 링커를 사용하여 서로에 연결된다.

도 4. LDH 방출에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 대해서 유도된 H929MM 세포의 재지향된 T-세포 용해. 83A10-TCBcv(개방 원, 점선)와 비교하여 21-TCBcv(폐쇄 원), 22-TCBcv(폐쇄 삼각형), 42-TCBcv(폐쇄 사각형)에 대해서 유도된 H929MM 세포의 용해에 대한 농도 반응 곡선. 모든 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 경우 H929 세포의 농도-의존적인 사멸이 존재하였지만, 대조군-TCB에서는 어떤 사멸도 관찰되지 않았다. 10 PBMC 대 1 MM 세포의 효과기 세포 대 종양 표적 세포(E:T) 비를 사용하여 PBMC 공여자 1(A), 공여자 3(B), 공여자 4(C), 공여자 5(D)에서 실험을 수행하였다(실시예 8 참고).

도 5. LDH 방출에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 대해서 유도된 L363MM 세포의 재지향된 T-세포 용해. 83A10-TCBcv(개방 원, 점선)과 비교하여 21-TCBcv(폐쇄 원), 22-TCBcv(폐쇄 삼각

형), 42-TCBcv(폐쇄 사각형)에 의해서 유도된 L363MM 세포의 용해에 대한 농도 반응 곡선. 모든 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 경우 L363 세포의 농도-의존적인 사멸이 관찰되었지만, 대조군-TCB에서는 어떤 사멸도 관찰되지 않았다. 10 PBMC 대 1 MM 세포의 효과기 세포 대 종양 표적 세포(E:T) 비를 사용하여 PBMC 공여자 1(A), 공여자 2(B), 공여자 3(C), 공여자 4(D), 공여자 5(E)에서 실험을 수행하였다(실시예 9 참고).

도 6. LDH 방출에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 RPMI-8226 MM 세포의 재지향된 T-세포 용해. 83A10-TCBcv(개방 원, 점선)과 비교하여 21-TCBcv(폐쇄 원), 22-TCBcv(폐쇄 삼각형), 42-TCBcv(폐쇄 사각형)에 의해서 유도된 RPMI-8226 MM 세포의 용해에 대한 농도 반응 곡선. 모든 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 경우 RPMI-8226 세포의 농도-의존적인 사멸이 관찰되었지만, 대조군-TCB에서는 어떤 사멸도 관찰되지 않았다. 10 PBMC 대 1 MM 세포의 효과기 세포 대 종양 표적 세포(E:T) 비를 사용하여 PBMC 공여자 2(A), 공여자 3(B), 공여자 4(C), 공여자 5(D)에서 실험을 수행하였다(실시예 10 참고).

도 7. 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 JJN-3MM 세포의 재지향된(redirected) T-세포 용해. 83A10-TCBcv(개방 원, 점선)와 비교한 22-TCBcv(폐쇄 삼각형), 42-TCBcv(폐쇄 사각형)에 의한 JJN-3MM 세포의 농도-의존적인 사멸. 아넥신-V 양성 JJN-3 세포(A, C) 및 종양 세포 용해(B, D)의 백분율을 측정하고, 플롯팅하였다. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 특이적 농도에 의해서 유도되는 JJN-3 세포의 용해 백분율을 하기와 같이 결정하였다: 주어진 TCB 농도에서 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치를 측정하고, 그것을 TCB가 없는 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치로부터 뺄셈하고; TCB가 없는 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치로 나눔. 10 PBMC 대 1 MM 세포의 효과기 세포 대 종양 표적 세포(E:T) 비를 사용하여 2 PBMC 공여자: 공여자 1(A, B) 및 공여자 2(C, D)에서 실험을 수행하였다(실시예 11 참고).

도 8. 멀티파라미터 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 자가 골수 침윤 T 세포(환자의 전체 골수 흡인물)의 존재 하에서의 다발성 골수종 환자 골수 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 용해. 아넥신-V 양성 골수종 형질 세포의 백분율을 측정하고, TCB 농도에 대해서 플롯팅하였다. 환자 골수종 형질 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 관찰된 반면, T 세포, B 세포, 및 NK 세포의 용해는 8-색상 멀티파라미터 패널을 기반으로 관찰되지 않았다. 시험된 TCB 항체의 최고 농도에서 대조군-TCB를 사용하여 골수종 형질 세포의 세포사가 유도되지 않음. 83A10-TCBcv(A)와 비교할 때, 42-TCBcv(B) 및 22-TCBcv(C)는 환자 골수 골수종 형질 세포의 사멸을 유도하는 데 더 강력하였다(실시예 13 참고).

도 9. 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 자가 골수 침윤 T 세포(환자의 전체 골수 흡인물)의 존재 하에서의 다발성 골수종 환자 골수 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 용해. 아넥신-V 음성 골수종 형질 세포의 백분율을 측정하고, TCB 농도에 대해서 플롯팅하였다. 환자 골수종 형질 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 관찰된 반면, 비-악성 골수 세포의 용해는 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음). 시험된 TCB 항체의 최고 농도에서 대조군-TCB를 사용하여 골수종 형질 세포의 세포사의 유도가 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음). 83A10-TCBcv와 비교할 때, 42-TCBcv 및 22-TCBcv는, 생존 가능한(아넥신-V 음성) 골수종 형질 세포의 농도-의존적인 감소에 의해서 반영되는 바와 같이, 환자 골수 골수종 형질 세포의 사멸을 유도하는 데 더 강력하였다. 환자 001(A) 및 환자 007(B)에서의 대표적인 실험(실시예 13 참고).

도 10. 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 자가 골수 침윤 T 세포의 존재 하에서의 다발성 골수종 환자 골수 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 용해. 프로피디움 아이오다이드 음성 골수종 형질 세포의 백분율을 계산하였고, 배지 대조군(MC)에 대한 생존 가능한 골수 형질 세포의 백분율을 TCB 농도에 대해서 플롯팅하였다. 환자 골수 형질 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 관찰된 반면(A 내지 G), 골수 미세환경(BMME)의 용해는 관찰되지 않았다(H). 시험된 TCB 항체의 최고 농도에서 대조군-TCB를 사용하여 골수종 형질 세포의 세포사의 유도가 관찰되지 않았다. 83A10-TCBcv와 비교할 때, 42-TCBcv 및 22-TCBcv는, 생존 가능한(프로피디움 아이오다이드 음성) 골수종 형질 세포의 농도-의존적인 감소에 의해서 반영되는 바와 같이, 환자 골수 골수종 형질 세포의 사멸을 유도하는 데 더 강력하였다. 이의 상응하는 통계학적 시험의 P값이 5%(*) 미만, 1%(**) 미만 또는 0.1%(***) 미만이면, 효과는 통계학적으로 유의하다고 간주되었다. 환자 1(A), 환자 2(B), 환자 3(C), 환자 4(D), 환자 5(E), 환자 6(F), 및 환자 7(G, H)로부터 수집된 골수 흡인물 샘플을 사용하여 실험을 수행하였다(실시예 13 참고).

도 11. 멀티파라미터 유세포 분석법(8-색상 염색 패널)에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 골수 형질 세포(환자 전체 골수 흡인물)의 존재 하에서의 골수종 환자 골수 T 세

포의 활성화. T-세포 활성화 정도를 83A10-TCBcv(A), 42-TCBcv(B) 및 22-TCBcv(C)에서 비교하였다(실시예 14 참고).

도 12. 0.003, 0.03 및 0.1mg/kg의 83A10-TCBcv를 사용하여 시노몰구스 원숭이에게 단일 정맥내(IV) 주사한 후 혈청 샘플(실선을 갖는 폐쇄 상징) 및 골수 샘플(점선을 갖는 개방 상징)로부터 측정된 83A10-TCBcv의 농도. 혈청 샘플 수집은 투여 전, 및 투여 후 30, 90, 180분, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504시간에 수행하였다. 골수 샘플은 투여 전, 및 투여 후 96 및 336시간에 수집하였다(실시예 16 참고).

도 13. 83A10-TCBcv의 단일 IV 주사(0.003, 0.03 및 0.3mg/kg) 후 시노몰구스 원숭이에서 관찰된 말초 T-세포 재분포. 동물 A와 B, C와 D, 및 E와 F 각각에게 83A10-TCBcv 0.003, 0.03 및 0.3mg/kg을 IV로 제공하였다. 절대 혈액 T-세포 세포 계수치(혈액 μl 당 CD2+ 세포)를 처리 후 시간에 대해서 플롯팅하였다(실시예 16 참고).

도 14. 멀티파라미터 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 83A10-TCBcv의 단일 IV 주사(0.3mg/kg) 후 시노몰구스 원숭이에서 관찰된 혈액 형질 세포의 감소. 형질 세포(PC)는 6-색상 염색 패널을 기반으로 식별되었고, 림프구에 대한 PC의 백분율을 측정하고, 등고선 플롯(A)으로 플롯팅하였다. 시노몰구스 원숭이에서 83A10-TCBcv 0.3mg/kg으로의 치료 후 혈액 형질 세포 감소 속도를 플롯팅하였다(B)(실시예 16 참고).

도 15. PBMC-인간화 NOG 마우스를 사용하여 H929 인간 골수종 이종이식 모델에서 83A10-TCBcv 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 항종양 활성. 면역결핍성 NOD/Shi-scid IL2r감마(null)(NOG)에게 0일(d0)에 인간 다발성 골수종 H929 세포를 피하(SC) 주사로서 우측 옆구리에 제공하였다. 15일(d15)에, NOG 마우스에게 인간 PBMC의 단일 복강내(IP) 주사를 제공하였다. 이어서 마우스를 주위 깊게 상이한 치료군 및 대조군으로 무작위화하고(n=9/군), 통계학적 시험을 수행하여 군들 간의 동질성에 대해서 시험하였다. 실험군은 대조군 미치료군, 대조군-TCB 치료군, 83A10-TCBcv 2.6nM/kg 치료군 및 BCMA50-BiTE(등록상표)(BCMAxCD3 (scFv)2) 2.6nM/kg 치료군이었다. 꼬리 정맥 주사에 의해서 제공된 항체 치료를 19일(d19), 즉 H929 종양 세포의 SC 주입 후 19일에 시작하였다. TCB 항체 치료 스케줄은 최대 3주 동안 주 1회 IV 투여(TCB 항체 총 3회 주사)로 이루어졌다. 연구 동안 종양 부피(TV)를 캘리퍼에 의해서 측정하였고, TV의 군간 비교에 의해서 진행을 평가하였다. TV(mm^3)를 종양 주사 후 일수에 대해서 플롯팅하였다. d19, 즉 치료 1일에, 평균 종양 부피는 비히를 치료 대조군(A)의 경우 300 ± 163 , 2.6nM/kg 대조군-TCB 치료군(A)의 경우 $315 \pm 148 \text{mm}^3$, 2.6nM/kg 83A10-TCBcv 군(B)의 경우 $293 \pm 135 \text{mm}^3$ 및 2.6nM/kg BCMA50-BiTE® 군(C)의 경우 $307 \pm 138 \text{mm}^3$ 에 도달하였다. 실험군당 각각의 개별 마우스의 TV를 종양 주사 후 일수에 대해서 플롯팅하였다: (A) 비히를 대조군(실선) 및 대조군 TCB(점선)을 포함하는 대조군, (B) 83A10-TCBcv(2.6nM/kg) 군, 및 (C) BCMA50-BiTE®(2.6nM/kg). 흑색 화살표는 IV 주사에 의해서 제공된 TCB 치료를 나타낸다. 83A10-TCBcv(2.6nM/kg) 군에서, 9마리의 마우스 중 6마리(67%)는 심지어는 d19에서 기록된 TV보다 낮게 그들의 종양이 퇴행하였고, 즉 제1 TCB 치료 및 종양 퇴행은 연구 종료까지 유지되었다. 종양 퇴행을 나타내는 데 실패한 83A10-TCBcv(2.6nM/kg) 치료군에서의 3마리는 d19에서 각각 376, 402 및 522mm^3 에 동일한 이들의 TV를 가졌다. 이에 반해서, 3주 동안 주 1회 스케줄로 동일물량 용량의 BCMA50-BiTE®(2.6nM/kg)로 치료된 9마리 마우스 중 어느 것도(0%) 임의의 시간지점에서 이들의 종양이 퇴행되지 않았다(실시예 17 참고).

도 16. 종양 성장(TG)의 백분율을 d19 내지 d43 동안 계산하였고, 83A10-TCBcv(2.6nM/kg) 군과 BCMA50-BiTE(등록상표)(2.6nM/kg) 군 사이에서 비교하였다. TG(%)로서 정의된 종양 성장의 백분율은 $\text{TG}(\%) = 100 \times (\text{분석된 군의 중간 TV}) / (\text{대조군 매개체(vehicle) 치료군의 중간 TV})$ 를 계산함으로써 결정되었다. 도덕적인 이유를 위해서, TV가 적어도 2000mm^3 에 도달된 경우 마우스를 안락사시켰다. TG(%)는 83A10-TCBcv(2.6nM/kg) 군에서 일관되고 유의하게 감소되었고, 뿐만 아니라 TG(%)는 BCMA50-BiTE®(2.6nM/kg)에 비해서 항상 더 낮았다(실시예 17 참고).

도 17. ELISA로부터 선택된 70개 클론의 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance: SPR). 모든 실험은 GLC 및 GLM 센서 칩이 장치된 프로테온(ProteOn) XPR36 바이오센서 및 커플링 시약을 사용하여 러닝 완충제(running buffer)(10mMPBS, pH 7.4 및 0.005%(v/v) 트윈20(Tween®20)로서 PBST를 사용하여 25°C에서 수행하였다. 고정화를 GLM 칩 상에서 $30 \mu\text{l}/\text{분}$ 으로 수행하였다. pAb(염소) 항 hu IgG, F(ab)2 특이적 Ab(액상)을 표준 아민-커플링 절차를 사용하여 수직 방향에서 커플링시켰다: 모든 6개의 리간드 채널을 EDC(200mM)와 설포-NHS(50mM)의 혼합물을 사용하여 5분 동안 활성화시켰다. 표면을 활성화시킨 직후, pAb(염소) 항 hu IgG, F(ab)2 특이적 항체($50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 10mM 아세트산나트륨, pH 5)를 5분 동안 모든 6개의 채널을 통해서 주사하였다. 마지막으로, 채널을 1M 에탄올아민-HCl(pH 8.5)의 5분 주사로 차단시켰다. 최종 고정화 수준은 모든 채널에 대해서 유사

하였고, 11000 내지 11500RU 범위였다. 개별 전체 수평 채널 중 5개를 따라서 5분 동안 동시에 주입하여($30\mu\text{l}/\text{분}$) 이.콜라이 상청액으로부터 Fab 변이체를 포획하고, 상청액 중의 Fab의 농도에 따라서 200 내지 900RU 범위의 수준을 생성하였고; 컨디셔닝된 배지를 6개의 채널을 따라서 주입하여 이중 참고 목적을 위한 "인-라인" 블랭크를 제공하였다. 인간 및 cynoBCMA(50, 10, 2, 0.4, 0.08, OnM, $50\mu\text{l}/\text{분}$)의 연속 희석물을 수직 채널을 따라서 3분 동안 주사함으로써 원-샷 속도 측정(one-shot kinetic measurement)을 수행하였다. 해리를 5분 동안 모니터하였다. 속도 데이터를 프로테온 매니저 v. 2.1로 분석하였다. 반응 스팟 데이터의 처리는 스팟간-참고 및 인라인 완충제 블랭크를 사용한 이중-참고 단계를 포함하였다(문헌[Myszka, 1999]). 복제 원-샷 주입으로부터의 처리 데이터를 물질 수송 없이 단순 1:1 행렬어(Langmuir) 결합 모델에 피팅하였다(문헌[O'Shannessy et al., 1993]).

도 18. 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 HEK-huBCMA 세포에 대한 BCMA 항체의 결합 친화도. 항-BCMA 항체를 제1 항체로서 사용하였고, 이어서 2차 PE-표지된 항-인간 Fc를 검출 항체로서 사용하였다. HEK 세포 상의 huBCMA에 대한 항체 Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 및 Mab 42의 결합은 huBCMA-HEK 세포에 대한 Mab 83A10의 결합보다 상당히 더 양호한 것은 아니었음을 발견하였다.

도 19. 시노몰구스 원숭이에서 단일 IV 또는 SC 주사 후 혈청 및 골수에서 측정된 42-TCBcv. 동물에게 42-TCBcv의 단일 IV 또는 SC. 주사를 제공하고, 투여 전, 투여 후 30, 90, 180분, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504시간에서 PK 평가를 위해서 말초 정맥을 통해서 시간지점마다 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 튜브에서 응고 clotting 시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다. 생성된 혈청을 추가 분석 시까지 -80°C 에서 직접 저장하였다. PK 평가를 위한 골수 샘플을 또한 마취/진통제 처리 하에서 투여 전, 투여 후 96 및 336시간에 대퇴골에서 수집하였다. 골수 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 튜브에서 응고시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다. 생성된 골수를 추가 분석 시까지 -80°C 에서 직접 저장하였다. PK 데이터 분석 및 평가를 수행하였다. 표준 비 구획적 분석을 왓슨 패키지(Watson package)(v 7.4, 써모 피셔 사이언티픽 월트만(Thermo Fisher Scientific Waltman), 미국 매사추세츠주 소재) 또는 포에닉스 윈논린 시스템(Phoenix WinNonlin system)(v. 6.3, 서타라 컴퍼니(Certara Company), 미국 소재)를 사용하여 수행하였다. 다발성 골수종 환자 골수 흡인물에서 42-TCBcv의 효과적인 농도는 10pm 내지 10nM (회색 면적)에 상응한다. 팔호 안의 농도는 nM 단위이다.

도 20. 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유도된 자가 T 세포 또는 골수 침윤 T 세포의 존재 하에서의 형질 세포 백혈병 환자 골수 백혈병 세포의 재지향된 T-세포 용해. 프로피디움 아이오다이드 음성 골수종 형질 세포의 백분율을 계산하였고, 배지 대조군(MC)에 대한 생존 가능한 골수 형질 세포 백혈병 세포의 백분율을 TCB 농도에 대해서 플로팅하였다. 환자 형질 세포 백혈병 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 관찰된 반면(A, B), 골수 미세환경(BMME)의 용해는 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음). 시험된 TCB 항체의 최고 농도에서 대조군-TCB를 사용하여 골수종 형질 세포의 세포사의 유도가 관찰되지 않았다. 42-TCBcv는, 생존 가능한(프로피디움 아이오다이드 음성) 골수종 형질 세포의 농도-의존적인 감소에 의해서 반영되는 바와 같이, 환자 골수 형질 세포 백혈병 세포의 사멸을 유도하는 데 매우 강력하였다. 이의 상응하는 통계학적 시험의 P값이 5%(*) 미만, 1%(**) 미만 또는 0.1%(***) 미만이면, 효과는 통계학적으로 유의하다 간주되었다. 이 도면은 환자 1(A) 및 환자 2(B)의 골수 샘플로부터 수득된 결과를 나타낸다(또한 실시예 20 참고).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0152] 용어 "BCMA, 표적 BCMA, 인간 BCMA"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 BCMA라고도 공지된, 인간 B 세포 성숙화 항원; TR17_인간, TNFRSF17(유니프로트 Q02223)에 관한 것이며, 이것은 분화 형질 세포에서 우선적으로 발현되는 중양 괴사 수용체 슈퍼페밀리의 구성원이다. 유니프로트에 따라서 BCMA의 세포외 도메인은 아미노산 1 내지 54(또는 5 내지 51)로 이루어진다. 용어 "BCMA에 대한 항체, 항-BCMA 항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 BCMA의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[0153] "BCMA에 특이적으로 결합하는 또는 BCMA에 대해서 결합하는"은 항체가 BCMA를 표적화하는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 표적 BCMA에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일부 구체예에서, 항-BCMA 항체가 관련 없는, 비-BCMA 단백질에 결합하는 정도는, 예를 들어 표면 플라스몬 공명(SPR), 예를 들어 바이어코어(등록상표), 효소-결합 면역흡착 검사(ELISA) 또는 유세포 분석법(FACS)에 의해 측정된 바와 같은 항체의 BCMA에 대한 결합보다 약 10배, 바람직하게는 100배 초과만큼 낮다. 일부 구체예에서 BCMA에 결합하는 항체는 10-8M 이하, 바람직하게는 10-8M 내지 10-13M, 바람직하게는 10-9M 내지 10-13M의 해리 상수(K_d)를 갖는다.

일 구체예에서 항-BCMA 항체는 상이한 종으로부터의 BCMA 중에서, 바람직하게는 인간 및 시노몰구스 중에서 보존된 BCMA의 에피토프, 또한 바람직하게는 또한 마우스 및 래트 BCMA에 결합한다. "CD3 및 BCMA에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체, CD3 및 BCMA에 대한 이중특이적 항체"는 두 표적 모두에 결합하는 것에 대한 각각의 정의를 지칭한다. BCMA(또는 BCMA 및 CD3)에 특이적으로 결합하는 항체는 나머지 인간 항원에는 결합하지 않는다. 따라서, ELISA에서, 그러한 관련 없는 표적에 대한 OD 값은 특정 검정법의 검출 한계와 동일하거나 더 낮을 것이며, 바람직하게는 0.3ng/ml 초과, 또는 플레이트-결합-BCMA 없이 또는 형질감염되지 않은 HEK293 세포를 갖는 대조군 샘플의 OD 값과 동일하거나 더 낮을 것이다.

[0154] 바람직하게는 항-BCMA 항체는 인간 BCMA 및 비-인간 포유동물 기원의 BCMA, 바람직하게는 시노몰구스, 마우스 및/또는 래트로부터의 BCMA로 이루어진, BCMA의 군에 특이적으로 결합한다. "시노몰구스/인간 캡"은 친화도 비 KD 시노몰구스 BCMA[M]/KD 인간 BCMA[M]를 지칭한다(상세 사항은 실시예 3 참고). "Mab CD3의 시노몰구스/인간 캡"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 친화도 비 KD 시노몰구스 CD3[M]/KD 인간 CD3[M]을 지칭한다. 일 구체 예에서 본 발명의 이중특이적 항-BCMA/항-CD3 항체는 1.25 내지 5 또는 0.8 내지 1.0의 Mab CD3의 시노몰구스/인간 캡을 나타낸다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 일 구체예에서 시노몰구스 CD3에 또한 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 일 구체예에서 본 발명의 이중특이적 항-BCMA/항-CD3 항체는 1.25 내지 5 또는 0.8 내지 1.0의 Mab CD3의 시노몰구스/인간 캡을 나타낸다. 바람직하게는 시노몰구스/인간 캡은 항-BCMA- 및 항-CD3 항체에 대해서 동일한 범위이다.

[0155] 용어 "APRIL"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 재조합의 절두된 뮤린 APRIL(아미노산 106 내지 241; NP_076006)에 관한 것이다. APRIL은 문헌[Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)]에 기술된 바와 같이 생산될 수 있다.

[0156] 용어 "BAFF"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 재조합의 절두된 인간 BAFF(유니프로트 Q9Y275(TN13B_인간))에 관한 것이며, 이것은 문헌[Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983)]에 기술된 바와 같이 생산될 수 있다. 바람직하게는 His-태깅된 BAFF가 본 발명에 따라서 사용된다. 바람직하게는 His-태깅된 BAFF는 BAFF 잔기 82 내지 285를 인코딩하는 DNA 단편을 발현 벡터 내에서 클로닝시키고, N-말단 His-태그를 갖는 융합을 생성하고, 그 다음 트롬빈 절단 부위를 생성하고, 상기 벡터를 발현시키고, 트롬빈을 사용하여 회수된 단백질을 절단함으로써 생산된다.

[0157] 항-BCMA 항체는 플레이트-결합 BCMA와 함께 인간 BCMA에 대한 결합에 대해서 ELISA에 의해서 분석된다. 본 검정법을 위해서, 바람직하게는 1.5mg/ml의 플레이트-결합 BCMA의 양 및 0.1pM 내지 200nM 범위의 농도(들)의 항-BCMA 항체가 사용된다.

[0158] 용어 "NF-κB"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 재조합 NF-κB p50(수탁 번호(P19838))에 관한 것이다. NF-κB 활성은 NCI-H929MM 세포(CRL-9068(상표명))의 추출물의 DNA-결합 ELISA에 의해서 측정될 수 있다. 0.1pM 내지 200nM의 항-BCMA 항체의 존재 또는 부재 하에서 0.1μg/ml의 TNF-α로 처리되지 않거나 또는 처리된 NCI-H929MM 세포, 1000ng/ml의 열-처리된 HT-절두된-BAFF, 1000ng/ml의 절두된-BAFF, 0.1pM 내지 200nM의 아이소타입 대조군을 20분 동안 배양시킨다. NF-κB 공통 서열(consensus sequence)에 결합하는 p65로부터의 화학발광 신호를 검출하는 기능성 ELISA를 사용하여 NF-κB 활성을 측정할 수 있다(미국 특허 제US6150090호).

[0159] 용어 "추가 표적"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 바람직하게는 CD3 ε을 의미한다. 용어 "제1 표적 및 제2 표적"은 제1 표적으로서의 CD3 및 제2 표적으로서의 BCMA를 의미하거나 또는 제1 표적으로서의 BCMA 및 제2 표적으로서의 CD3을 의미한다.

[0160] 용어 "CD3 ε 또는 CD3"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 유니프로트 P07766(CD3E_인간) 하에 기술된 인간 CD3 ε에 관한 것이다. 용어 "CD3 ε에 대한 항체, 항 CD3 ε 항체"는 CD3 ε에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 일 구체예에서 항체는 각각 중쇄 CDR1H, CDR2H 및 CDR3H로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VH 및 각각 경쇄 CDR1L, CDR2L 및 CDR3L로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VL을 포함한다. 일 구체예에서 항체는 SEQ ID NO:7(VH) 및 SEQ ID NO:8(VL)의 가변 도메인을 포함한다.

[0161] 용어 "항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 단일클론 항체를 지칭한다. 항체는 "경쇄"(LC) 및 "중쇄"(HC)의 2개의 쌍(이러한 경쇄(LC)/중쇄 쌍은 본 명세서에서 LC/HC로서 약칭됨)으로 이루어진다. 이러한 항체의 경쇄 및 중쇄는 몇몇 도메인으로 이루어진 폴리펩타이드이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3(항체

부류 IgA, IgD, 및 IgG) 및 임의로 중쇄 불변 도메인 CH4(항체 부류 IgE 및 IgM)를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인 VL 및 경쇄 불변 도메인 CL을 포함한다. 가변 도메인 VH 및 VL은 프레임워크 영역(FR)이라 지칭되는 보다 보존적인 영역과 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)이라 지칭되는 과변이(hypervariability) 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 하기 순서로 아미노-말단으로부터 카복시-말단으로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 "불변 도메인"은 표적에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여되지 않지만, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 용어 "항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 항원 CD3 각각 BCMA에 대한 특이적 결합을 위해서 적어도 필요한 항체의 부분을 포함하는 것을 지칭한다. 따라서 일 구체예에서 이러한 항체(또는 항체 부분)는 상기 항체 부분이 본 발명에 따른 이 중 특이적 항체에 포함되는 경우, Fab 단편일 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 또한 Fab', F(ab')2, scFv, 다이-scFv, 또는 이중특이적 T-세포 관여기(BiTE)일 수 있다.

[0162]

용어 "항체"는 이들의 특징적인 특성이 보유되는 한 예를 들어, 마우스 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및 유전자 조작된 항체(변종 또는 돌연변이 항체)를 포함한다. 특히 재조합 인간 또는 인간화 항체로서의, 인간 또는 인간화 항체가 특히 바람직하다. 또 다른 구체예는 헤테로특이적(heterospecific) 항체(이중특이적, 삼중특이적 등) 및 예를 들어, 세포독성 소분자를 갖는 다른 접합체이다.

[0163]

용어 "이중특이적 항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 일 구체예에서 중쇄 및 경쇄(HC/LC)의 2개의 쌍 중 하나가 CD3에 특이적으로 결합하고, 나머지 하나가 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 이 용어는 또한 최신 기술에 따른 이중특이적 항체의 다른 포맷, 일 구체예에서는 이중특이적 단일-쇄 항체를 지칭한다.

[0164]

용어 "TCB"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다. 용어 "83A10-TCBcv"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47(2x), 및 SEQ ID NO:48의 이의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해서 명시된 바와 같고, 도 2A에 나타내고, 유럽 특허 제 EP14179705호에 기술된 바와 같은 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다. 용어 "21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, 및 SEQ ID NO:51(2x)의 이의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해서 명시된 바와 같은 Mab21, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, 및 SEQ ID NO:54 (2x)의 이의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해서 명시된 바와 같은 Mab 22, 및 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57-(2x)의 이의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해서 명시된 바와 같은 Mab42의 각각의 이중특이적 항체를 지칭한다.

[0165]

용어 "네이키드 항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 Fc 부분을 포함하는, BCMA에 특이적으로 결합하고, 치료제, 예를 들어 세포독성제 또는 방사성표지와 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 용어 "접합된 항체, 약물 접합체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 BCMA에 특이적으로 결합하고, 치료제, 예를 들어 세포독성제 또는 방사성표지와 접합된 항체를 지칭한다.

[0166]

용어 "이중특이적 단일-쇄 항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 일 구체예에서 2개의 결합 도메인을 포함하는데, 하나는 BCMA에 특이적으로 결합하고, 나머지 하나는 일 구체예에서 CD3에 특이적으로 결합하는 단일 폴리펩타이드 쇄를 지칭한다. 각각의 결합 도메인은 항체 중쇄로부터의 하나의 가변 영역("VH 영역")을 포함하는데, 여기서 제1 결합 도메인의 VH 영역은 CD3 분자에 특이적으로 결합하고, 제2 결합 도메인의 VH 영역은 BCMA에 특이적으로 결합한다. 2개의 결합 도메인은 짧은 폴리펩타이드 간격자에 의해서 서로에 임의로 연결된다. 폴리펩타이드 간격자에 대한 비제한적인 예는 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(G-G-G-G-S) 및 이의 반복부이다. 각각의 결합 도메인은 항체 경쇄로부터의 하나의 가변 영역("VL 영역")을 추가로 포함할 수 있고, 제1 결합 도메인 및 제2 결합 도메인 각각 내의 VH 영역 및 VL 영역은 폴리펩타이드 링커를 통해서 서로에 연결되고, 제1 결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역 및 제2 결합 도메인의 VH 영역 및 VL 영역이 서로와 쌍을 이루는 것을 허용하기에 충분히 길어서, 이들은 함께 각각의 제1 결합 도메인 및 제2 결합 도메인에 특이적으로 결합할 수 있다(예를 들어, 유럽 특허 제EP0623679호 참고). 이중특이적 단일-쇄 항체는 또한 예를 들어, 문헌[Choi BD et al., Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul;11(7):843-53] 및 [Wolf E. et al., Drug Discov Today. 2005 Sep 15;10(18):1237-44]에 언급되어 있다.

[0167]

용어 "다이아바디"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍을 이루는 것을 허용하기에는 너무 짧은 펩타이드 링커에 의해서 연결된 동일한 폴리펩타이드 쇄 상의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 작은 2가의 이중특이적 항체 단편(VH-VL)을 지칭한다(문헌 [Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772]). 이것은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 하고, 2개의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자의 조립을 촉진시킨다. 본 발명의 이중특이적 다이아바디를 작

제하기 위해서, 항-CD3 항체 및 항-BCMA 항체의 V-도메인을 융합시켜 2개의 쇄 VH(CD3)-VL(BCMA), VH(BCMA)-VL(CD3)를 생성한다. 각각의 쇄 자체는 각각의 항원에 결합할 수 없지만, 다른 쇄와 쌍을 이를 때 항-CD3 항체 및 항-BCMA 항체의 기능적 항원 결합 부위를 재생성한다. 분자내 이량체화를 위해서는 너무 짧은 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이에 링커를 갖는 2개의 scFv 분자는 공동-발현되고, 자가-조립되어 반대 단부에서 2개의 결합 부위를 갖는 이중특이적 분자를 형성한다. 예를 들어, BCMA 및 CD3 각각을 위한 결합 도메인을 인코딩하는 가변 영역은 PCR에 의해서 기술된 바와 같이 수득된 DNA 작제물로부터 증폭될 수 있어서, 이들은 문헌 [Kipiriyano et al., J. Immunol. Methods, 200, 69-77 (1997a)]에 기술된 바와 같이, 백터, 예컨대 pHOG 내에서 클로닝될 수 있다. 이어서 2개의 scFv 작제물을 목적하는 배향으로 하나의 발현 백터에서 조합하고, 이에 의해서 VH-VL 링커는 그 자체 상에서 쇄의 백폴딩(backfolding)을 방지하도록 짧아진다. DNA 분절은 종결 코돈 (STOP codon) 및 리보솜 결합 부위(RBS)에 의해서 분리된다. RBS는 이중-시스트론성 메시지로서 mRNA의 전사를 허용하는데 이것은 리보솜에 의해서 비공유 상호작용하여 다이아바디를 형성하는 2개의 단백질로 번역된다. 다이아바디, 예컨대 다른 항체 단편은 이들이 박테리아(대장균) 및 효모(피히아 파스토리스(*Pichia pastoris*))에서 기능적 형태로 높은 수율(최대 Ig/1)로 발현될 수 있다는 이점을 갖는다.

[0168] 용어 "탄뎀 scFV"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 국제 특허 공개 제WO 03/025018호 및 제WO 03/048209호에 기술된 바와 같은 단쇄 Fv 분자(즉, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 도메인, 각각 VH 및 VL의 회합에 의해서 형성된 분자)를 지칭한다. TandAb®로서도 공지된 이러한 Fv 분자는 4개의 항체 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 (i) 4개의 가변 도메인 중 첫번째 2개 또는 마지막 2개 중 하나는 항원 결합 scFv를 VH/VL 또는 VL/VH 배향으로 형성함으로써 동일한 쇄 내에서 서로에 분자 내에서 결합하고, (ii) 나머지 2개의 도메인은 또 다른 쇄의 상응하는 VH 도메인 또는 VL 도메인과 분자 간에 결합하여 항원 결합 VH/VL 쌍을 형성한다. 바람직한 구체 예에서, 국제 특허 공개 제WO 03/025018호에 언급된 바와 같이, 이러한 Fv 분자의 단량체는 적어도 4개의 가변 도메인을 포함하는데, 이들 중에서 하나의 단량체의 2개의 인근의 도메인은 항원-결합 VH-VL 또는 VL-VH scFv 단위를 형성한다.

[0169] 용어 "DARPin"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 미국 특허 제US 2009082274호에 기술된 바와 같은 이중특이적 안키린 반복 분자를 지칭한다. 이들 분자는 자연 안키린 단백질로부터 유도되는데, 이것은 인간 게놈에서 발견될 수 있고, 결합 단백질의 가장 빈번한 유형 중 하나이다. DARPin 라이브러리 모듈은 초기 설계를 위해서 229 안키린 반복부를 사용하고, 후속 개선을 위해서 또 다른 2200을 사용하여, 자연 안키린 반복 단백질에 의해서 정의된다. 이 모듈은 DARPin 라이브러리를 위한 빌딩 블록으로서 제공된다. 라이브러리 모듈은 인간 게놈 서열과 유사하다. DARPin은 4 내지 6개의 모듈로 구성된다. 각각의 모듈은 대략 3.5kDa이기 때문에, 평균 DARPin의 크기는 16 내지 21kDa이다. 결합기의 선택은 리보솜 디스플레이에 의해서 수행되는데, 이는 완전히 무-세포이고, 문헌[He M and Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, Nov;35(Pt 5):962-5]에 기술된 바와 같다.

[0170] 용어 "T 세포 이중특이적 관여기"는 약 55킬로달톤의 단일 웨타이드 쇄 상에서, 상이한 항체의 2개의 단일-쇄 가변 단편(scFv), 또는 4개의 상이한 유전자로부터의 아미노산 서열로 이루어진 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해서 T 세포에 결합하고, 나머지는 BCMA에 결합한다.

[0171] 그리스 문자: α , δ , ϵ , γ , 및 μ 에 의해서 표현된 5종 유형의 포유동물 항체 중쇄가 존재한다(문헌[Janeway CA, Jr et al (2001). Immunobiology. 5th ed., Garland Publishing]). 존재하는 중쇄의 유형은 항체의 부류를 정의하고; 이들 쇄는 각각 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 항체에서 발견된다(문헌[Rhoades RA, Pfleiderer RG (2002). Human Physiology, 4th ed., Thomson Learning]). 개별 중쇄는 크기 및 조성이 상이하고; α 및 γ 는 대략 450개의 아미노산을 함유하는 반면, μ 및 ϵ 은 대략 550개의 아미노산을 갖는다.

[0172] 각각의 중쇄는 2개의 영역, 즉 불변 영역 및 가변 영역을 갖는다. 불변 영역은 동일한 아이소타입의 모든 항체에서 동일하지만, 상이한 아이소타입의 항체에서는 상이하다. 중쇄 γ , α 및 δ 는 3개의 불변 도메인 CH1, CH2, 및 CH3(일렬로)으로 구성된 불변 영역, 및 가요성 부가를 위한 한지 영역을 갖고(문헌[Woof J, Burton D Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99]); 중쇄 μ 및 ϵ 은 4개의 불변 도메인 CH1, CH2, CH3, 및 CH4로 구성된 불변 영역을 갖는다(문헌[Janeway CA, Jr et al (2001). Immunobiology. 5th ed., Garland Publishing]). 중쇄의 가변 영역은 상이한 B 세포에 의해서 생산된 항체에서 상이하지만, 단일 B 세포 또는 B 세포 클론에 의해서 생산된 모든 항체에 대해서 동일하다. 각각의 중쇄의 가변 영역은 대략 110개의 아미노산 길이이고, 단일 항체 도메인으로 구성된다.

[0173] 포유동물에서, 단지 2개의 유형의 경쇄가 존재하는데, 이것은 람다(λ) 및 카파(κ)라 지칭된다. 경쇄는 2개의 연속 도메인을 가지며: 하나는 불변 도메인 CL이고, 하나는 가변 도메인 VL이다. 경쇄의 대략적인 길이는 211

내지 217개의 아미노산이다. 일 구체예에서 경쇄는 카파(κ) 경쇄이고, 불변 도메인 CL은 일 구체예에서 카파(κ) 경쇄(불변 도메인 CK)로부터 유도된다.

[0174] "aa 치환"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)에 의한 위치 147 및 213의 아미노산에서의 불변 도메인 CH1 내에서의 독립적인 아미노산 치환을 지칭하고, 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산은 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에 의해서 치환된다. 일 구체예에서 또한 불변 도메인 CL에서 위치 123의 아미노산은 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)에 의해서 독립적으로 치환된다. 일 구체예에서 아미노산 124는 K이고, 아미노산 147은 E이고, 아미노산 213은 E이고, 아미노산 123은 R이다. aa 치환은 CD3 Fab 또는 하나 또는 2개의 BCMA Fab 내에 존재한다. 전하 변종으로서의 BCMA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체는 참고로 개시된, 유럽 특허 제EP14179705호에 기술되어 있다(추가로 "전하 변종 각각 전하 변종 교환"이라 지칭).

[0175] 모든 아미노산 번호 부여(numbering)는 본 명세서에서 카바트에 따른다(문헌[Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication91-3242]).

[0176] 용어 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 단일 아미노산 조성물의 항체 분자의 제제를 지칭한다.

[0177] 본 발명에 따른 "항체"는 어느 부류(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 바람직하게는 IgG 또는 IgE), 또는 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2, 바람직하게는 IgG1)를 가질 수 있고, 이에 의해서 본 발명에 따른 2가의 이중특이적 항체로부터의 항체 들 모두는 동일한 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG4 등), 바람직하게는 IgG1, 바람직하게는 동일한 동종이형(예를 들어. 백인)의 Fc 부분을 갖는다.

[0178] "항체의 Fc 부분"은 통상의 기술자에게 널리 공지된 용어이며, 항체의 파파인 절단을 기초로 정의된다. 본 발명에 따른 항체는 일 구체예에서 Fc 부분으로서 인간 기원, 바람직하게는 인간 불변 영역의 모든 다른 파트로부터 유도된 Fc 부분을 함유한다. 항체의 Fc 부분은 보체활성화, C1q 결합, C3 활성화 및 Fc 수용체 결합에 직접적으로 관련된다. 항체의 보체계에 대한 영향은 특정 조건에 좌우되고, C1q에 대한 결합은 Fc 부분에서의 정의된 결합 부위에 의해서 야기된다. 이러한 결합 부위는 최신 기술에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560], [Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917], [Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344], [Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004], [Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184], [Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168], [Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324], 및 유럽 특허 제EP 0 307 434호에 기술되어 있다.

[0179] 이러한 결합 부위는 예를 들어, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329(카바트의 EU 인덱스에 따른 번호 부여)이다. 하위부류 IgG1, IgG2 및 IgG3의 항체는 통상적으로 보체 활성화, C1q 결합 및 C3 활성화를 나타내는 반면, IgG4는 보체계를 활성화시키지 않고, C1q에 결합하지 않고, C3을 활성화시키지 않는다. 일 구체예에서 Fc 부분은 인간 Fc 부분이다.

[0180] 일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 야생형 인간 IgG Fc 영역의 Fc 변종을 포함하고, 상기 Fc 변종은 위치 Pro329에서의 아미노산 치환 및 적어도 하나의 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 잔기는 카바트의 EU 인덱스에 따라 번호 부여되고, 여기서 상기 항체가, 야생형 IgG Fc 영역을 포함하는 항체와 비교할 때, 인간 FcgRIIIA 및/또는 FcgRIIA 및/또는 FcgRIA에 대해 감소된 친화도를 나타내고, 여기서 상기 항체에 의해 유도된 ADCC가 야생형 인간 IgG Fc 영역을 포함하는 항체에 의해 유도된 ADCC의 적어도 20%로 감소된다. 구체적인 구체예에서, 본 발명에 따른 항체에서 야생형 인간 Fc 영역의 Pro329는 글리신 또는 아르기닌 또는, Fc의 프롤린329 및 FcgRIII의 트립토판 잔기 Trp 87과 Tip 110 사이에 형성된 Fc/Fcg 수용체 계면 내의 프롤린 샌드위치를 파괴하기에 충분히 큰 아미노산 잔기로 치환된다(문헌[Sondermann et al.: Nature 406, 267-273 (20 July 2000)]). 본 발명의 추가 양상에서 Fc 변종에서 적어도 하나의 추가의 아미노산 치환은 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, 또는 P331S이고, 여전히 또 다른 구체예에서 상기 적어도 하나의 추가 아미노산 치환은 인간 IgG1 Fc 영역의 L234A 및 L235A 또는 인간 IgG4 Fc 영역의 S228P 및 L235E이다. 이러한 Fc 변종은 국제 특허 공개 제WO2012130831호에 상세하게 기술되어 있다.

[0181] "효과기 기능"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드의 상호작용으로부터 유발된 생화학적 사건을 의미한다. 효과기 기능은 ADCC, ADCP, 및 CDC를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아

니다. "효과기 세포"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 하나 이상의 Fc 수용체를 발현시키고, 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 면역계의 세포를 의미한다. 효과기 세포는 단핵구, 마크로파지, 호중구, 수지상 세포, 호산구, 비만 세포, 혈소판, B 세포, 대형 과립 램프구, 랑거한스 세포, 자연 살해(NK) 세포, 및 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니며, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는 어느 기관으로부터라도 유도될 수 있다. "라이브러리"는 본 명세서에서 핵산 또는 아미노산 서열의 목록, 가변 위치에서의 핵산 또는 아미노산 치환의 목록, 라이브러리 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 물리적 라이브러리 또는 순수한 형태 또는 순수하지 않은 형태의 Fc 변종 단백질을 포함하는 물리적 라이브러리를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는 어느 형태의 Fc 변종의 세트를 의미한다.

[0182] "Fc 감마 수용체" 또는 "Fc γ R"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 IgG 항체 Fc 영역에 결합하고, Fc γ R 유전자에 의해서 실질적으로 인코딩된 단백질의 패밀리의 어느 구성원을 의미한다. 인간에서 이러한 패밀리는 아이소폼 Fc γ RIa, Fc γ RIb, 및 Fc γ RIc를 비롯한 Fc γ RI(CD64); 아이소폼 Fc γ RIIa(동종이형 H131 및 R131 포함), Fc γ RIIb(Fc γ RIIb-1 및 Fc γ RIIb-2 포함), 및 Fc γ RIIc를 비롯한 Fc γ RII(CD32); 및 아이소폼 Fc γ RIIIa(동종이형 V158 및 F158 포함) 및 Fc γ RIIIb(동종이형 Fc γ RIIIb-NA1 및 Fc γ RIIIb-NA2 포함)를 비롯한 Fc γ RIII(CD16)(문헌[Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65]), 뿐만 아니라 어느 발견되지 않은 인간 Fc γ R 또는 Fc γ R 아이소폼 또는 동종이형을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. Fc γ R은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는 어느 기관으로부터라도 유도될 수 있다. 마우스 Fc γ R은 Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), Fc γ RIII(CD16), 및 Fc γ RIII-2(CD16-2), 뿐만 아니라 어느 발견되지 않은 마우스 Fc γ R 또는 Fc γ R 아이소폼 또는 동종이형을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0183] "증가된 효과기 기능을 갖는 Fc 변종"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해서 모 Fc 서열의 것과 상이하고, 효과기 기능을 증가시키는 예를 들어 Asn279에서의 글리코실화의 수정과 같은 다른 변형에 관련된 Fc 서열을 의미한다. 이러한 변형은 예를 들어, 문헌[Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564], [Lund et al., 1991, J Immunol 147:2657-2662], [Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59], [Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543], [Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984], [Jefferis et al., 1995, //77muno/ Lett 44:111-117], [Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119], [Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104], [Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969], [Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624], [Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184], [Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933], [Xu et al., 2000, 세포 Immunol 200: 16-26], [Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575], [Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604], [Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65], [Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490], 미국 특허 제US5624821호, 제US5885573호, 제US6194551호, 국제 특허 공개 제WO200042072호, 제WO199958572호에 언급되어 있다. 이러한 Fc 변형은 또한 본 발명에 따라서 Fc 부분의 조작된 글리코폼을 포함한다. "조작된 글리코폼"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 Fc 폴리펩타이드에 공유 부착된 탄수화물 조성물을 의미하며, 여기서 상기 탄수화물 조성물은 모 Fc 폴리펩타이드의 것과 화학적으로 상이하다. 조작된 글리코폼은 어느 방법에 의해서, 예를 들어, 조작되거나 변종 발현 균주를 사용함으로써, 1종 이상의 효소, 예를 들어 D1-4-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GnTIII)와의 공동-발현에 의해서, 다양한 기관에서 Fc 폴리펩타이드를 발현시킴으로써, 또는 Fc 폴리펩타이드가 발현된 후 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 조작된 글리코폼의 생성 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 문헌[Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180], [Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294], [Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740], [Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473], 미국 특허 제US6602684호, 국제 특허 공개 제WO200061739호, 제WO200129246호, 제WO200231140호, 제WO200230954, 포텔리전트(Potelligent™) 테크놀로지(비오와, 인크.(Biowa, Inc.)), 미국 뉴저지주 프린스톤 소재), 글리코맙(GlycoMAb™) 글리코실화 조작 기술(글리카트 바이오텍크놀로지 아게(GLYCART biotechnology AG), 스위스 취리히 소재))에 언급되어 있다. 조작된 글리코폼은 전형적으로 모 Fc 폴리펩타이드와 상이한 탄수화물 또는 올리고당 조성물을 지칭한다.

[0184] 증가된 효과기 기능을 갖는 Fc 변종을 포함하는 본 발명에 따른 항체는 Fc 감마 수용체 III(Fc γ RIII, CD 16a)에 대해서 높은 결합 친화도를 나타낸다. Fc γ RIII에 대한 높은 결합 친화도는 결합이 CHO 숙주 세포, 예컨대 CHO DG44 또는 CHO K1 세포에서 발현된 기준으로서의 모 항체(95% 푸코실화)와 관련하여 CD16a/F158에 대해서 적어도 10배 향상되고/향상되거나 결합이 100nM의 항체 농도에서 고정된 CD 16a를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해서 측정된 모 항체와 관련하여 CD16a/V158에 대해서 적어도 20배 향상된 것을 나타낸다. Fc γ RIII 결합은 최신 기술에 따른 방법에 의해서, 예를 들어 Fc 부분의 아미노산 서열을 변경시킴으로써 또는 항체의 Fc 부분의 글리코실화에 의해서 증가될 수 있다(유럽 특허 제EP2235061호 참고). 문헌[Mori, K et al.,

Cytotechnology 55 (2007)109] 및 [Satoh M, et al., Expert Opin Biol Ther. 6 (2006) 1161-1173]은 아푸코 실화된(afucosylated) 항체의 생성을 위한 FUT8 (α -1,6-푸코실트랜스파라제) 유전자 녹아웃 CHO 세포주에 관한 것이다.

[0185] 용어 "키메라 항체"는 통상적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조된, 하나의 기원 또는 종으로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역, 및 상이한 기원 또는 종으로부터 유도된 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 뮤린 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 바람직하다. 본 발명에 의해 포함된 "키메라 항체"의 다른 바람직한 형태는 불변 영역이, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합에 대한, 본 발명에 따른 특성을 생성하기 위해 본래 항체의 것으로부터 변형되거나 또는 변화된 것이다. 이러한 키메라 항체는 또한 "부류-전환(class-switched) 항체"라 지칭된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 영역을 인코딩하는 DNA 분절 및 면역글로불린 불변 영역을 인코딩하는 DNA 분절을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 산물이다. 키메라 항체의 생산 방법은 종래의 재조합 DNA를 포함하고, 유전자 형질감염 기술은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855], 미국 특허 제 5,202,238호 및 제5,204,244호 참고.

[0186] 용어 "인간화 항체"는 모 면역글로불린의 것과 비교할 경우 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 변형된 항체를 지칭한다. 바람직한 구체예에서, 뮤린 CDR을 인간 항체의 프레임워크 영역에 이식하여 "인간화 항체"를 제조한다. 예를 들어, 문헌[Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327], 및 [Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270] 참고. 본 발명에 의해 포함된 "인간화 항체"의 다른 형태는 불변 영역이, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합에 대한, 본 발명에 따른 특성을 생성하기 위해 본래 항체의 것으로부터 추가로 변형되거나 또는 변화된 것이다.

[0187] 용어 "인간 항체"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 인간 생식 계통 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 인간 항체는 최신 기술에 널리 공지되어 있다(문헌[van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374]). 인간 항체는, 면역화 시내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에서 인간 항체의 전체 래퍼토리 또는 셀렉션(selection)을 생산할 수 있는 유전자 이식(transgenic) 동물(예를 들어, 마우스)에서도 생산될 수 있다. 이러한 생식 계통 돌연변이 마우스에서의 인간 생식 계통 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 인간 항체의 생산을 야기한다(예를 들어, 문헌[Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555], [Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258], [Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40]) 참고). 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리에서 생산된다(문헌[Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388], [Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597]). 콜(Cole) 등 및 브르너(Boerner) 등의 기술이 또한 인간 단일클론 항체의 제조를 위해서 사용 가능하다(문헌[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy], [Alan R. Liss, p. 77 (1985)], 및 [Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95]). 본 발명에 따른 키메라 및 인간화 항체에 대해서 이미 언급된 바와 같이 용어 "인간 항체"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 불변 영역이, 특히 C1q 결합 및/또는 FcR 결합에 대한, 본 발명에 따른 특성을 생성하도록, 예를 들어 "부류 전환"에 의해, 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이(예를 들어 IgG1로부터 IgG4로 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이)에 의해 변형된 이러한 항체를 또한 포함한다.

[0188] 용어 "재조합 인간 항체"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 재조합 수단에 의해서 제조, 발현, 생성 또는 분리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포, 예컨대 NSO 또는 CHO 세포로부터 또는 인간 면역글로불린 유전자를 위해서 유전자이식된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체 또는 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 백터를 사용하여 발현된 항체를 포함하도록 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 재배열된 형태의 가변 영역 및 불변 영역을 갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체는 생체내 체세포 초돌연변이에 적용되었다. 따라서, 재조합 항체의 VH 영역 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식 계통 VH 서열 및 VL 서열로부터 유도되고 그에 관련되는데 반하여, 생체내 인간 항체 생식 계통 래퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0189] "가변 도메인"(경쇄의 가변 도메인(VL), 중쇄의 가변 영역(VH))은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 본 발명에 따른 항체를 결합시키는데 직접적으로 관여된 각각의 경쇄 및 중쇄 쌍을 나타낸다. 가변 인간 경쇄 및 중쇄의 도메인은 동일한 일반 구조를 갖고, 각각의 도메인은, 서열이 폭넓게 보존되고, 3개의 "초가변 영역"(또는 상보성 결정 영역, CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 프레임워크 영역은 β -시트 입체형태를 채용하고, CDR은 β -시트 구조를 연결하는 루프(loop)를 형성할 수 있다. 각각의 쇄에서 CDR은 프레임워크 영역에 의해서 3차원 구조로 유지되고, 다른 쇄로부터의 CDR과 함께 결합부위를 형성한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 하고, 따라서 본 발명의 추가 목적

을 제공한다.

- [0190] 용어 "초가변 영역" 또는 "항체의 표적-결합 부분"은 본 명세서에서 사용되는 경우 표적-결합의 책임이 있는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 영역은 본 명세서에 정의된 바와 같이 초가변 영역 잔기가 아닌 그러한 가변 도메인 영역이다. 따라서, 항체의 경쇄 및 중쇄는 N-말단으로부터 C-말단까지 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함한다. 각각의 쇄 상의 CDR은 이러한 프레임워크 아미노산에 의해서 분리된다. 특히, 중쇄의 CDR3은 표적 결합에 대부분 기여하는 영역이다. CDR 영역 및 FR 영역은 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 표준 정의에 따라서 결정된다. 용어 "CDR1H, CDR2H 및 CDR3H"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 가변 도메인 VH에 위치된 중쇄의 각각의 CDR을 지칭한다. 용어 "CDR1L, CDR2L 및 CDR3L"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 가변 도메인 VL에 위치된 경쇄의 각각의 CDR을 지칭한다.
- [0191] 중쇄 도메인 CH3이 대체된 불변 중쇄 도메인 CH1은 어느 Ig 부류(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM), 또는 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)를 가질 수 있다. 중쇄 도메인 CH3이 대체된 불변 경쇄 도메인 CL은 람다(λ) 또는 카파(κ) 유형, 바람직하게는 카파(κ) 유형을 가질 수 있다.
- [0192] 용어 "표적" 또는 "표적 분자"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 상호 교환 가능하게 사용되고, 인간 BCMA를 지칭한다. 이종특이적 항체와 관련하여 이 용어는 BCMA 및 제2 표적을 지칭한다. 바람직하게는 이종특이적 항체와 관련하여 이 용어는 BCMA 및 CD3을 지칭한다.
- [0193] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 어느 폴리펩타이드 결정인자를 포함한다. 특정 구체예에서, 에피토프 결정인자는 분자, 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술포닐의 화학적 활성 표면 분류를 포함하고, 특정 구체예에서, 특이적 3차원 구조 특징 및 또는 특이적 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해서 결합된 표적의 영역이다.
- [0194] 일반적으로 본 발명에 따른 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 2개의 벡터가 존재한다. 이중특이적 항체와 관련하여 제1 표적에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 2개의 벡터 및 추가로 제2 표적에 특이적으로 결합하는 상기 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 2개의 벡터가 존재한다. 2개의 벡터 중 하나는 각각의 경쇄를 인코딩하고, 2개의 벡터 중 나머지는 각각의 중쇄를 인코딩한다. 그러나, 본 발명에 따른 항체의 제조를 위한 대안적인 방법에서, 제1 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 단지 하나의 제1 벡터 및 제2 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 단지 하나의 제2 벡터가 숙주 세포를 숙주 세포를 형질전환시키기 위해서 사용될 수 있다.
- [0195] 용어 "핵산 또는 핵산 분자"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하도록 의도된다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다.
- [0196] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 표현 "세포," "세포주," 및 "세포 배양물"은 상호 교환 가능하게 사용되고, 이러한 표기는 후대(progeny)를 포함한다. 따라서, 이 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 전달의 수에 상관 없이 1차 대상 세포 및 그로부터 유도된 배양물을 포함한다. 또한, 고의적이거나 의도하지 않은 돌연변이 때문에 모든 후대가 DNA 내용물에 있어서 정확하게 동일하지 않을 수 있음이 이해된다. 원래 형질전환된 세포에서 선별(screened)된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변종 후대(variant progeny)가 포함된다. 확실한 명칭이 의도된 곳은 맥락으로부터 명확할 것이다.
- [0197] 용어 "형질전환"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 벡터/핵산을 숙주 세포 내에 전달하는 방법을 지칭한다. 강력한 세포벽 장벽이 없는 세포가 숙주 세포로 사용된다면, 형질감염은, 예를 들어 문헌[Graham and Van der Eh, Virology 52 (1978) 546ff]에 의해서 기술된 바와 같은 인산칼슘 침전법에 의해서 수행된다. 그러나 핵주입(nuclear injection) 의해서 또는 원형질 융합과 같은 세포 내에 DNA를 도입하는 다른 방법 또한 사용될 수 있다. 원핵 세포 또는 상당한 세포벽 구성을 포함하는 세포가 사용된다면, 예를 들어 형질감염의 한 방법은 문헌[Cohen SN, et al, PNAS 1972, 69 (8): 2110-2114]에 의해서 기술된 바와 같은 염화칼슘을 사용하는 칼슘 처리이다.
- [0198] 형질전환을 사용한 항체의 재조합 생산은 최신 기술에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Makrrides, S. C, Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202], [Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282], [Kaufman, R.J., MoI. Biotechnol. 16 (2000) 151-161], [Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880]의 리뷰 논문뿐만 아니라 미국 특히 제US6331415호 및 제US4816567호에 기술되어 있다.

- [0199] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "발현"은 "발현"은 핵산이 mRNA 내로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA (전사물(transcript)이라고도 지칭됨)가 그 뒤에 웹타이드, 폴리웹타이드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 전사물 및 부호화된 폴리웹타이드는 종합적으로 유전자 산물이라 지칭된다. 폴리뉴클레오타이드가 유전체 DNA로부터 유도되면, 진핵 세포에서의 발현은 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.
- [0200] "벡터"는 핵산 분자, 특히 자기 복제하는 것이고, 이는 삽입된 핵산 분자를 숙주세포 내로 그리고/또는 그 사이에 전달한다. 이 용어는 주로 세포 내로의 DNA 또는 RNA의 삽입(예를 들어 염색체 통합)을 위해 기능하는 벡터, 주로 DNA 또는 RNA의 복제를 위해 기능하는 벡터의 복제, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위해 기능하는 발현 벡터를 포함한다. 기술된 바와 같은 기능 중 하나 초과를 제공하는 벡터 또한 포함된다.
- [0201] "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포 내로 도입되었을 때 폴리웹타이드로 전사되고 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드이다. "발현 시스템"은 보통 목적하는 발현 산물을 산출하기 위해 기능할 수 있는 발현 벡터로 구성되는 적합한 숙주 세포를 지칭한다.
- [0202] 본 발명에 따른 항체는 바람직하게는 재조합 수단에 의해서 생산된다. 이러한 방법은 최신 기술에 널리 공지되어 있고, 원핵 세포 및 진핵 세포에서의 단백질 발현 및 그 다음 항체 폴리웹타이드의 분리 및 통상적으로 약제학적으로 허용 가능한 순도로의 정제를 포함한다. 단백질 발현을 위해서, 경쇄 및 중쇄 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산은 표준 방법에 의해서 발현 벡터 내로 삽입된다. 발현은 CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, 효모, 또는 이.콜라이 세포, 및 세포(상정액 또는 용해 후의 세포)로부터 회수된 항체와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행된다. 이중특이적 항체는 전체 세포에서, 세포 용해물에서 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태에서 존재할 수 있다. 정제는 알칼린/SDS 처리, 칼럼 크로마토그래피 및 관련 기술 분야에 공지된 다른 방법을 비롯한 표준 기술에 의해서 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해서 수행된다. 문헌[Ausubel, F., et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)] 참고.
- [0203] NSO 세포에서의 발현은 예를 들어, 문헌[Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123] 및 [Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270]에 기술되어 있다. 일시적 발현은 예를 들어, 문헌[Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9]에 기술되어 있다. 가변 도메인의 클로닝은 문헌[Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837], [Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289], 및 [Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87]에 기술되어 있다. 바람직한 일시적 발현 시스템(HEK293)은 문헌[Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83] 및 [Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199]에 기술되어 있다.
- [0204] 원핵생물에 적합한 제어 서열은, 예를 들어, 촉진인자를 포함하고, 임의로 작동인자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 촉진인자, 증강인자 및 폴리아데닐화 신호를 사용하는 것으로 공지되어 있다.
- [0205] 항체는 종래의 면역글로불린 정제 절차, 예컨대, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이드 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해서 배양 배지로부터 적합하게 분리된다. 단일클론 항체를 인코딩하는 DNA 또는 RNA는 종래의 절차를 사용하여 용이하게 분리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포가 이러한 DNA 및 RNA의 기원으로서 작용할 수 있다. 분리된 후, DNA를 발현 벡터 내에 삽입할 수 있고, 이어서 이것을 숙주 세포, 예컨대 HEK293 세포, CHO 세포, 또는 골수종 세포(이들은 그렇지 않았으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않음) 내로 형질감염시켜서 숙주 세포에서 재조합 단일클론 항체의 합성을 수득한다.
- [0206] 본 발명에 따른 항체의 아미노산 서열 변종(또는 돌연변이체)은 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 DNA에 도입하거나 또는 뉴클레오타이드 합성에 의해서 제조된다. 그러나 이러한 변형은 예를 들어 상기에 기술된 바와 같이 단지 매우 제한된 범위로 수행될 수 있다. 예를 들어, 변형은 상기에 언급된 항체 특징, 예컨대 IgG 아이소타입 및 표적 결합을 변경시키지 않고, 재조합 생산의 수율, 단백질 안정성을 개선시키거나 정제를 용이하게 할 수 있다.
- [0207] 본 발명은 일 구체예에서 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 단리 또는 정제된 핵산 서열을 제공하며, 여기서 CAR은 항원 인식 모이어티가 본 발명에 따른 항체(여기서는 이중특이적 항체가 아님)인 것을 특징으로 하는, BCMA에 대해서 지향되는 항원 인식 모이어티, 막판통 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함한다. 인코딩된 항체는 또한 명시된 바와 같이 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 이러한 "BCMA CAR"의 구조 및 생성은 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO2013154760호, 제WO2015052538호, 제WO2015090229호, 및 제WO2015092024호에 기술되

어 있다.

[0208] 일 구체예에서 본 발명은 하기를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하며:

[0209] (i) B 세포 성숙화 항원(BCMA) 인식 모이어티;

[0210] (ii) 간격자 도메인, 및

[0211] (iii) 막관통 도메인; 및

[0212] (iv) 세포내 T 세포 신호전달 도메인,

[0213] BCMA 인식 모이어티가 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체인 것을 특징으로 한다:

[0214] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,

[0215] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,

[0216] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,

[0217] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역,

[0218] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및

[0219] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.

[0220] T-세포 활성화 모이어티는 어느 적합한 문자로부터 유도되거나 수득된 어느 적합한 모이어티일 수 있다. 일 구체예에서, 예를 들어, T-세포 활성화 모이어티는 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인은 관련 기술 분야에 공지된 어느 문자로부터 유도되거나 수득된 어느 막관통 도메인일 수 있다. 예를 들어, 막관통 도메인은 CD8a 문자 또는 CD28 문자로부터 수득되거나 유도될 수 있다. CD8은 T-세포 수용체(TCR)를 위한 공-수용체로서 작용하는 막관통 당단백질이고, 세포독성 T-세포의 표면 상에서 주로 발현된다. CD8의 가장 일반적인 형태는 CD8 알파 및 CD8 베타 쇄로 구성된 이량체로서 존재한다. CD28은 T-세포 상에서 발현되고, T-세포 활성화를 위해서 요구되는 공-자극 신호를 제공한다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)에 대한 수용체이다. 바람직한 구체예에서, CD8 알파 및 CD28은 인간이다. 막관통 도메인에 더하여, T-세포 활성화 모이어티는 세포내(즉, 세포질) T-세포 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 세포내 T-세포 신호전달 도메인은 CD28 문자, CD3 제타 문자 또는 이들의 변형된 버전, 인간 Fc 수용체 감마(FcR γ) 쇄, CD27 문자, OX40 문자, 4-1BB 문자, 또는 관련 기술 분야에 공지된 다른 세포내 신호전달 문자로부터 수득되거나 유도될 수 있다. 상기에 논의된 바와 같이, CD28은 T-세포 공-자극에서 중요한 T-세포 마커 T-세포이다. CD3 제타는 TCR에 연관되어 신호를 생산하고, 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. CD137이라고도 공지된 4-1BB는 T-세포에 강력한 공자극 신호를 전송하여, 분화를 촉진시키고, T 림프구의 장기간 생존을 향상시킨다. 일 구체예에서, CD28, CD3 제타, 4-1BB, OX40, 및 CD27은 인간이다.

[0221] 본 발명은 일 구체예에서 상기에 명시된 바와 같이 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 분리된 또는 정제된 핵산 서열을 제공한다.

[0222] T 세포 이중특이적(TCB) 결합기는 세포 사멸에 매우 높은 농도/종양-세포-수용체-점유(occupancy) 의존 효력을 갖고(예를 들어, 시험관내 세포 사멸 검정법에서의 EC50은 피코몰 미만 또는 낮은 피코몰 범위임, 문헌[Dreier et al. Int J Cancer 2002]), T 세포 이중특이적 결합기(TCB)는 종래의 단일특이적 항체보다 훨씬 낮은 용량으로 제공된다. 예를 들어, 블리나투모맙(CD19xCD3)은 급성 림프성 백혈병의 치료를 위해서 5 내지 15mg/m²/일(즉, 단지 0.35 내지 0.105mg/m²/주), 또는 비호지킨 림프종의 치료를 위해서 60mg/m²/일의 연속적인 정맥내 용량으로 제공지고, 이러한 용량에서의 혈청 농도는 0.5 내지 4ng/ml 범위이다(문헌[Klinger et al.,

Blood 2012], [Topp et al., J Clin Oncol 2011], [Goebeler et al. Ann Oncol 2011]). TCB의 낮은 용량이 환자에서 높은 효능을 발휘하기 때문에, 본 발명에 따른 항체의 경우 피하 투여가 임상 설정치에서(바람직하게는, 0.1 내지 2.5, 바람직하게는 25mg/m²/주, 바람직하게는 250mg/m²/주의 용량 범위에서)에서 가능하고, 바람직하다고 예상된다. 이러한 낮은 농도/용량/수용체 접유에서도, TCB는 상당한 부작용을 야기할 수 있다(문헌 [Klinger et al., Blood 2012]). 따라서, 종양 세포 접유/커버리지를 제어하는 것이 중요하다. 혈청 APRIL 및 BAFF의 높은 가변 수준을 갖는 환자(예를 들어, 다발성 골수종 환자, 문헌[Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157])에서, 종양 세포에 결합된 TCB의 수, 각각 종양 세포 접유는 APRIL/BAFF에 의해서 상당히 영향을 받을 수 있다. 그러나, 본 발명의 상기 항체, 종양 세포 접유 각각 효능/안정성을 사용함으로써 본 발명에 따른 항체에 대해서 용량을 증가시킬 필요가 없을 수 있는데, 그 이유는 상기 항체가 APRIL/BAFF 리간드 경쟁에 의해서 리간드 경쟁에 의해서 영향을 받지 않을 수 있기 때문이다. 본 발명에 따른 항체의 또 다른 이점은 Fc 부분의 포함을 기반으로 하는데 이는 Fc 부분이 없는 TCB(예를 들어, 블리나투모맙)(이것은 정맥내로 제공되거나 환자가 보유한 펌프를 사용하여 연속적으로 제공될 필요가 있음)와 비교할 때 제거 반감기를 약 4 내지 12 일로 증가시키고, 적어도 1회 또는 2회/주 투여를 허용한다.

[0223]

본 발명에 따른 항체 각각 이의 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체의 생물학적 특성을 83A10-TCBcv와 비교하여 몇몇 연구에서 조사하였다. 예를 들어, 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체 21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv의 T-세포 재지향된 세포 독성을 유도하는 효력을 83A10-TCBcv에 비교하여 H929MM 세포주 상에서 측정하였다(실시예 8, 표 12, 도 4). 본 발명의 항체를 연구하였고, 분석은 H929 세포의 농도 의존적인 사멸 각각 EC50 값이 83A10-TCBcv에 대해서 측정된 EC50 값보다 더 높은 것을 발견하였다는 것을 나타내었는데, 이는 TCB로서의 본 발명에 따른 항-BCMA 항체가 TCB로서의 Mab 83A10보다 H929MM 세포의 사멸을 유도하는 데 덜 강력하였음을 제안한다. 놀랍게도, T-세포 재지향된 세포독성이 RPMI-8226 MM 세포주 및 또한 JJN-3 세포주 상에서 측정되는 경우 턴오버가 관찰되었고(각각, 실시예 10 및 11, 표 13, 및 14 및 15, 도 6 및 7): TCB로서의 본 발명에 따른 항체는 더 낮은 EC50을 나타내었고, 따라서 83A10-TCBcv보다 더 높은 효력을 나타내었다. 본 발명자들에게 놀랍게도, TCB로서의 본 발명에 따른 항체는 MM 환자로부터 새로 취한 골수 흡인물 중의 83A10 TCBcv와의 직접 비교에서 몇몇 이점을 나타내었다(참고: 최상의 가능한 비교를 얻기 위해서, 모든 골수 흡인물에서, 항상 모든 T-세포 이중특이적(TCB) 항체는 동일한 농도에서 시험되었음);

[0224]

- 골수종 세포의 더 높은 사멸 효력, 즉 83A10-TCBcv보다 더 낮은 농도에서 이미 동일한 %의 사멸 각각 사멸에 대한 농도 반응 곡선이 좌측으로 이동하였음(실시예 13, 표 18, 19 및 20, 도 8, 9 및 10). 7개의 상이한 환자 골수 흡인물에서 본 발명에 따른 TCB로서의 항체 1nM의 농도에서 이미 프로피디움 아이오다이드 음성 생존 가능한 다발성 골수종 암 세포의 대조군에 비해서 감소는 77.1 내지 100%였다. 동일한 7개의 골수 흡인물에서 1nM의 83A10-TCBcv를 사용하면 단지 37.1 내지 98.3%의 감소가 달성되었다(표 20 및 21).

[0225]

- 본 발명에 따른 TCB로서의 항체에 대해서 일곱(7) 개의 골수 흡인물을 사용한 동일한 실험에서 시험된 최고 농도(10nM)에서 83A10-TCBcv와 비교할 때 더 높은 최대 사멸이 달성되었다(표 20 및 21).

[0226]

- 83A10-TCBcv에 대한 비 반응자가 22-TCBcv/42-TCBcv가 사용되면 반응자로 변경될 수 있다. 83A10-TCBcv에 대해서 어떤 사멸 반응도 관찰되지 않은 두(2) 개의 골수 환자 샘플에서, 놀랍게도 본 발명에 따른 TCB로서의 항체를 사용하여 사멸이 발견될 수 있었다(도 9a 및 9b).

[0227]

본 발명의 BCMAxCD3 TCB는 인간 및 시노몰구스 원숭이(cyno) BCMA, 및 마우스 및 래트의 BCMA에 결합하고, CD3 결합기가 또한 시노몰구스 CD3에 결합하면 시노몰구스 원숭이에서 또는 CD3 결합기가 또한 마우스/래트 BCMA에 결합하면 마우스/래트에서 독성 관찰에 적절하다. 놀랍게도, cynoBCMA에 대한 결합 친화도는 인간 BCMA에 대한 결합 친화도에 매우 유사하다. SPR은 인간 및 cynoBCMA에 대한 결합 친화도를 측정하는 데 사용되어 왔다(실시예 2, 표 4). 시노몰구스/인간 캡(인간 BCMA에 대한 친화도에 대한 시노몰구스에 대한 친화도의 비, KD)은 cynoBCMA에 대한 친화도를 인간 BCMA에 대한 친화도를 통해서 나눔으로써 측정된 친화도 데이터로부터 계산되었다(실시예 3, 표 5). 83A10의 경우 15.3의 시노몰구스/인간 캡이 관찰되었다(즉, 인간 BCMA에 대한 것보다 15.3 배 더 낮은 시노몰구스에 대한 결합 친화도). 본 발명자들에게 놀랍게도, 본 발명에 따른 항체는 15.4 내지 1.7의 시노몰구스/인간 캡을 나타내었고, 이는 83A10과 유사하거나 이것보다 훨씬 더 바람직한 시노몰구스/인간 캡이다(표 5). 본 발명에 따른 BCMAxCD3 TCB에서 사용된 CD3이 시노몰구스 원숭이 CD3에 대해서 교차-반응성이기 때문에, 약동학적 및 약력학적 조사가 시노몰구스 원숭이로부터 수득될 수 있다(실시예 16 참고). 또한 시노몰구스 원숭이에서의 독성 조사는 인간에서 약리학적 효과 및 독성 효과를 예견하고, 시노몰구스 원숭이 특징에 대한 교차-반응성은 환자의 이익이다. 본 발명의 BCMA 항체는 또한 뮤린 BCMA(예를 들어, 클론 22 및 42의 Kd는 0.9nM 및 2.5nM로서 SPR에 의해서 측정됨)에 결합한다(실시예 1.1.1A.4의 표 2D 참고). BCMAxCD3 TCB의 CD3 결

합기는 뮤린 CD3에 대해서 교차-반응성이 아니다.

[0228]

요약하면 낮은 BCMA 발현MM 세포주, 예컨대 RPMI-8226 및 JJN-3의 사멸, 특히 환자 골수 흡인물에서의 MM 세포의 사멸의 효력 및 효능 이점 및 또한 BCMA에 대한 결합 친화도에서의 매우 바람직한 시노몰구스/인간 캡은 본 발명의 항체 및 각각의 TCB를 MM 환자의 치료를 위한 본질적으로 유망한 작용제로 만든다. 또한 본 발명의 항-BCMAxCD3 TCBcv는 83A10-TCBcv로서, 바람직한 특성, 예컨대 긴 제거 반감기, 주 1회 투여(정맥내, 피하)에서의 효능, 응집에 대한 낮은 경향성 또는 무응집 경향성을 갖고, 고순도 및 양호한 수율로 제조될 수 있다.

[0229]

[표 1A: 항체 서열]

SEQ ID NO:	명칭(들)	aa 서열
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIESKYMNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
7	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKG LEWVSRISKYMNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSSLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTTSNYANWRQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNMSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWFDTWQGQGTLTVSS
10	Mab21 VH Mab22 VH Mab42 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDAMGWWRQAPGKG LEWVSAISGPGGSTYYADSVKGRFTISRDNMSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWFDTWQGQGTLTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGTTKVEIK
12	Mab21 VL Mab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQKPGQA PRLLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGTTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQKPGQA PRLLIYGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGTTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQA PRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGTTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3H Mab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H	VLGWFDT

[0230]

	Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLAW
19	83A10 CDR2L	YGASSRAT
20	83A10 CDR3L Mab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPPDFT
21	Mab21 CDR1H Mab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2H Mab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYYLAW
24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLAW
26	Mab22 CDR2L	SGAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLSW
28	Mab42 CDR2L	HSASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1L Mab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2L Mab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3L Mab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINREFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAPMGWWRQAPGKG LEWVSAISYI GHTYYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTIVTVSS

39	Mab33 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMGWVRQAPGKG LEWVSAINRGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNA MGWVRQAPGKG LEWVSAISPTGFSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSS
41	83A10 BCMA CH1 Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSS LGTQTYICNVNHK PSNTKVDKVEPKSC
42	83A10 BCMA CL Mab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPS DRKLKGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKS FNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSS LGTQTYICNVNHK PSNTKVDKVEPKSC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPS DEQLKGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKS FNRGEC
45	83A10 노르 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSLSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD GGGGSGGGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLLTGSSTGA VTTSNY ANWVQEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFP VLSQSSGLYSLSSVTVPSLSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPCCPAPEAAGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISAKGQPREPQW YTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDI AVEVESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

		TQKSLSLSPGK
46	83A10 흑 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWFDFWGGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKVEPKSCD KTHTCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPPV LDSDGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCCSVMHEALHNHYTQSL SLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQPKQQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLPEPDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLIKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKG LEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSA SVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
49	Mab21 노 브 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDAMGWVRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGWFDFWGGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKVEPKSCD GGGGSGGGGSQAVVTOEPSLTVPGGTVTLCGSSTGAVTTSNY ANWVQEKGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPGPCAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

[0233]

		VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQ YTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
50	Mab21 노보 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDAMGWWVRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRA EDTAVYYCAKVLGFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STS GGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLVSLLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQSL SLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQKPGQA PRLI EHA STRATGIPDRFGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKGTA SWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGEC
52	Mab22 노보 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNDAMGWWVRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNRLRA EDTAVYYCAKVLGFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STS GGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD GGGGSGGGGSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSNY ANWVQEKGPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVSSASTKGPSVFPL APS SKSTS GGTAALGCLVKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP VLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQ YTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHY

		TQKSLSLSPGK
53	Mab22 노보 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWWRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGFDYWGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAPLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDEKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDFTLMSRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQVTLPP SREDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLISGAGSRATGIPDRFGSGSGTDFLTISRLPEPDFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLIKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEHKHYVACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
55	Mab42 노보 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWWRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKVLGFDYWGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAPLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDEKVEPKSCD GGGGSGGGGSQAVVTQEPSTWSPGGTVTLTGSSTGAVITSNY ANWVQEKPQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFP VLSQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDDKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDFTLMSRTPEV CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSSFLYSLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
56	Mab42 삼성 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWWRQAPGKG LEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA

		EDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGTLVTVSASTKGPSVFPLAPSSK STS GGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDEKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVLFPPPKDFTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDEPKENWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPVQLPP SRDELTQNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSL SLS PGK
57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQA PRLLIHSASTRATGIPDRFGSGSGTDFTLAIISRLPEPDEAVYY CQQYGYPPDFTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0236]

주: SEQ ID NO:20 및 SEQ ID NO:33은 동일함

[0238]

[표 1B: 항체 서열(짧은 목록)]

CD3 항체	SEQ ID NO:							
	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
	7	8	1	2	3	4	5	6
BCMA 항체	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
83A10	9	11	15	16	17	18	19	20
Mab21	10	12	21	22	17	23	24	20
Mab22	10	13	21	22	17	25	26	20
Mab42	10	14	21	22	17	27	28	20
Mab27	38	12	29	30	17	31	32	33
Mab33	39	12	34	35	17	31	32	33
Mab39	40	12	36	37	17	31	32	33

[0239]

[표 2A: 추가 작제물]

단편/작제물	SEQ ID NO:			
	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

[0241]

[0242] [표 2B: 추가 작제물]

작제물	SEQ ID NO:			
	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA VH_CH1cv x CD3 VL_CH1 Fc 노브 LALA PG (노브 HC)	45	49	52	55
BCMAcv HC 풀 LALA PG (풀 HC)	46	50	53	56
BCMAcv hum IgG1 LC (BCMA LC)	47	51	54	57
CD3 VH_CL (CD3 LC)	48	48	48	48

[0243] [0244] 하기 (2+1) Fc-함유 항-BCMA/항-CD3 TCB를 제조하기 위해서, 상기 표 2B에 언급된 바와 같은 각각의 작제물/서열을 사용하였다.

[0245] 83A10-TCBcv: 45, 46, 47(x2), 48(도 2A)

[0246] 21-TCBcv: 48, 49, 50, 51(x2)(도 2A)

[0247] 22-TCBcv: 48, 52, 53, 54(x2)(도 2A)

[0248] 42-TCBcv: 48, 55, 56, 57(x2)(도 2A)

[0249] 하기에서 본 발명의 구체적인 구체예를 열거한다:

[0250] 1. SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체:

[0251] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,

[0252] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,

[0253] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,

[0254] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역,

[0255] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및

[0256] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.

[0257] 2. SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체:

[0258] a) SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,

[0259] b) SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 또는

[0260] c) SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역.

[0261] 3. 구체예 1 또는 2에 있어서, SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

[0262] 4. 구체예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

[0263] 5. 구체예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:13의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

- [0264] 6. 구체예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0265] 7. 구체예 1 또는 2에 있어서, VL 영역의 아미노산 49가 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0266] 8. 구체예 7에 있어서, VL 영역의 아미노산 74가 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)인 것을 특징으로 하는 항체.
- [0267] 9. SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체:
- [0268] a) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역,
- [0269] b) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, 또는
- [0270] c) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역.
- [0271] 10. 구체예 9에 있어서, SEQ ID NO:12의 VL 영역 및 SEQ ID NO:38, 39, 및 40의 VH 영역을 포함하는 군으로부터 선택된 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0272] 11. 구체예 9 또는 10에 있어서, VL 영역의 아미노산 49는 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0273] 12. 구체예 9 또는 10에 있어서, VL 영역의 아미노산 74가 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)인 것을 특징으로 하는 항체.
- [0274] 13. 구체예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 시노몰구스 BCMA에 또한 특이적으로 결합하고, CD3 ε에 특이적으로 결합하는 추가 Fab 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.
- [0275] 14. 구체예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, Fc가 있거나 Fc 부분이 없는 항체인 것을 특징으로 하는 항체.
- [0276] 15. SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3 ε에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체:
- [0277] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0278] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,
- [0279] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,
- [0280] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역,
- [0281] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및
- [0282] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.
- [0283] 16. SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 BCMA(추가로 "BCMA"라고도 명명됨)의 세포외 도메인 및 인간 CD3 ε(추가로 "CD3"라고도 명명됨)인 2개의 표적에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체:
- [0284] a) SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0285] b) SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 또는

- [0286] c) SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역.
- [0287] 17. 구체예 15 또는 16에 있어서, VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0288] 18. 구체예 15 또는 16에 있어서, BCMA VL은 SEQ ID NO:12, 13, 및 14의 VL 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0289] 19. 구체예 14 내지 18 중 어느 하나에 있어서, BCMA VH 영역으로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:12의 VL 영역, 또는 BCMA VH로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:13의 VL 영역, 또는 BCMA VH로서 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 VL 영역으로서 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0290] 20. 구체예 15 또는 19에 있어서, VL 영역의 아미노산 49가 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0291] 21. 구체예 15 내지 20 중 어느 하나에 있어서, VL 영역의 아미노산 74는 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0292] 22. SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1L 영역 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체:
- [0293] a) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역,
- [0294] b) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, 또는
- [0295] c) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역.
- [0296] 23. 구체예 22에 있어서, SEQ ID NO:12의 VL 영역 및 SEQ ID NO:38, 39, 및 40의 VH 영역을 포함하는 군으로부터 선택된 VH 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0297] 24. 구체예 22 또는 23에 있어서, VL 영역의 아미노산 49가 아미노산 타이로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S), 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0298] 25. 구체예 22 내지 24 중 어느 하나에 있어서, VL 영역의 아미노산 74는 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0299] 26. 구체예 15 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 본 발명에 따른 항 BCMA 항체 및 항 CD3 항체를 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기서
- [0300] a) 항체의 경쇄 및 중쇄는 구체예 1 내지 7 중 어느 하나에 따르고;
- [0301] b) 항체의 경쇄 및 중쇄는 CD3에 특이적으로 결합하고, 여기서 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로에 의해서 대체된 이중특이적 항체.
- [0302] 27. 구체예 15 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 항-CD3 항체 부분의 1개 이하의 Fab 단편, 항-BCMA 항체 부분의 2개 이하의 Fab 단편 및 1개 이하의 Fc 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0303] 28. 구체예 15 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 이의 N-말단을 사용하여 상기 CD3 항체 Fab 단편의 C-말단 및 상기 BCMA 항체 Fab 단편 중 하나의 C-말단에 연결된 Fc 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0304] 29. 구체예 15 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 이의 C-말단을 사용하여 상기 이중특이적 항체의 상기 항-CD3 항체(CD3 항체 부분)의 상기 Fab 단편의 N-말단에 연결된 상기 항-BCMA 항체(BCMA 항체 부분)의 제2 Fab 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0305] 30. 구체예 29에 있어서, 상기 항-CD3 항체 Fab 단편의 VL 도메인은 상기 제2 항-BCMA 항체 Fab 단편의 CH1 도메인에 연결된 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0306] 31. 구체예 15 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 항-CD3 항체 부분의 가변 도메인 VH(추가로 "CD3 VH"라고 명명됨)은 각각 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하고, 항-CD3 항체 부분의 가변 도메인 VL(추가로 "CD3 VL"이라고 명명됨)은 각각 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의

경쇄 CDR을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

[0307] 32. 구체예 15 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 항 CD3 항체 부분의 가변 도메인은 SEQ ID NO:7 및 8을 갖는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

[0308] 33. 인간 BCMA의 세포외 도메인 및 인간 CD3 ε 인 2개의 표적에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서,

[0309] a) 제1항 내지 제7항 중 어느 하나에 따른 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및

[0310] b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄 내의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로에 의해서 대체되고;

[0311] c) 여기서 a) 하의 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 a) 하의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환된 것을 특징으로 하는(예를 들어, 도 1A, 2A, 2C, 3A, 3C 참고) 이중 특이적 항체.

[0312] 34. 제33항에 있어서, 또한 상기 제1 항체의 Fab 단편(추가로 "BCMA-Fab"이라고도 명명됨)을 포함하고, 상기 BCMA-Fab의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산이 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 상기 BCMA-Fab의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산이 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환된 것을 특징으로 하는(예를 들어 도 2A, 2C 참고), 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체.

[0313] 35. 인간 BCMA의 세포외 도메인 및 인간 CD3 ε 인 2개의 표적에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체로서,

[0314] a) 제1항 내지 제7항 중 어느 하나에 따른 제1 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및

[0315] b) CD3에 특이적으로 결합하는 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 제2 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄 내의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로에 의해서 대체되고; 여기서

[0316] c) b) 하의 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124에서의 아미노산은 독립적으로 라이신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환되고, 여기서 b) 하의 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147에서의 아미노산 및 위치 213에서의 아미노산은 독립적으로 글루탐산(E), 또는 아스파트산(D)(카바트에 따른 번호 부여)에 의해서 치환된 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

[0317] 36. 하기 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 BCMA의 세포외 도메인 및 인간 CD3 ε 인 2개의 표적에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체:

[0318] i) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, 및 SEQ ID NO:51(2x); (항체 21의 세트 1 TCB),

[0319] ii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, 및 SEQ ID NO:54(2x)(항체 22의 세트 2 TCB), 및

[0320] iii) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57(2x)(항체 42의 세트 3 TCB).

[0321] 37. 하기 단계들을 포함하는, 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체의 제조 방법:

[0322] a) 숙주 세포를

[0323] b) 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환시키는 단계,

[0324] c) 숙주 세포를 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

[0325] d) 상기 항체 분자를 상기 배양물로부터 회수하는 단계.

[0326] 38. 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0327] 39. 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

[0328] 40. 의약으로서 사용하기 위한 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

- [0329] 41. 형질 세포 장애의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0330] 42. 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병 및 AL-아밀로이드증의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0331] 43. 전신 홍반 루푸스의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0332] 44. 항체-매개 거부의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 단일특이적 항체, ADCC 증강된 네이키드 항체, 항체-약물 접합체 또는 이중특이적 항체를 비롯한, 제1항 내지 제36항 중 어느 하나에 따른 항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0333] 45. 항원 인식 모이어티는 구체예 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 단일클론 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는, BCMA 및 T-세포 활성화 모이어티에 대해서 지향된 항원 인식 모이어티를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR).
- [0334] 46. 제45항에 있어서, 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체(CAR):
- [0335] (i) B 세포 성숙화 항원(BCMA) 인식 모이어티;
- [0336] (ii) 간격자 도메인, 및
- [0337] (ii) 막관통 도메인; 및
- [0338] (iii) 세포내 T 세포 신호전달 도메인.
- [0339] 47. 구체예 45 또는 46에 있어서, 항원 인식 모이어티는 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역 및 하기의 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 항체 분절인 것을 특징으로 하는 키메라 항원 수용체(CAR):
- [0340] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역,
- [0341] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역,
- [0342] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역,
- [0343] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역,
- [0344] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및
- [0345] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역 및 SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역.
- [0346] 48. 구체예 45 내지 47 중 어느 하나에 따른 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 분리된 또는 정제된 핵산 서열.
- [0347] 49. 하기를 특징으로 하는, 구체예 15 내지 36 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체로서 10nM 내지 1fM의 농도에서 48시간 치료 후 다발성 골수종 MM 골수 흡인물 중의 인간 악성 형질 세포를 적어도 80%로 어느 정도 감소시키는 BCMA에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체, 항-BCMA 항체의 생성 방법:
- [0348] a) SEQ ID NO:9의 가변 중쇄(VH) 파지-디스플레이 라이브러리를 1 내지 50nM의 시노몰구스 BCMA와 함께 1 내지 3 라운드로 패닝시키고, 구체예 15 내지 36 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체에 SEQ ID NO:11의 가변 경쇄와 조합된 경우 상기 인간 악성 형질 세포를 상기 방식으로 감소시키는 가변 중쇄를 선택하는 단계,
- [0349] c) SEQ ID NO:11의 가변 경쇄(VL) 파지-디스플레이 라이브러리를 1 내지 50nM의 시노몰구스 BCMA와 함께 1 내지 3 라운드로 패닝시키는 단계 및 b) 구체예 15 내지 36 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체에 SEQ ID NO:9의

가변 중쇄와 조합된 경우 상기 인간 악성 형질 세포를 상기 방식으로 감소시키는 가변 경쇄를 선택하는 단계, 및

[0350] 상기 선택된 가변 중쇄 및 선택된 가변 경쇄를 상기 인간 악성 형질 세포를 상기 방식으로 감소시키는 구체예 4 내지 16 중 어느 하나에 따른 이중특이적 항체에 조합하는 단계.

[0351] 50. 다발성 골수종 또는 전신 홍반 루푸스 또는 형질 세포 백혈병 또는 AL-아밀로이드증의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 제1항 내지 제36항 및 제45항 내지 제47항 중 어느 하나에 따른 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

[0352] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 항체의 결합은 405nm에서의 OD로서 ELISA 검정법에서 측정되는 경우 APRIL의 부재 하에서 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합과 비교할 때 100ng/ml APRIL에 의해서 20% 초과가 감소되지 않고, APRIL과 비교할 때 APRIL-의존형 NF- κ B 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않고, 상기 항체의 부재와 비교할 때 APRIL 부재 하에서 NF- κ B 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않는 것을 특징으로 한다.

[0353] 일 구체예에서 6.25nM의 농도에서 항체의 결합은 450nm에서의 OD로서 ELISA 검정법에서 측정되는 경우 APRIL의 부재 하의 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합과 비교할 때 140ng/ml 뮤린 APRIL에 의해서 10% 초과가 감소되지 않고, 바람직하게는 1% 초과가 감소되지 않는다. 50nM의 농도에서 상기 항체의 결합은 450nm에서의 OD로서 ELISA 검정법에서 측정되는 경우 APRIL의 부재 하의 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합과 비교할 때 140ng/ml 뮤린 APRIL에 의해서 10% 초과가 감소되지 않는다.

[0354] 일 구체예에서, 상기 항체의 결합은 405nm에서의 OD로서 ELISA 검정법에서 측정되는 경우 APRIL 또는 BAFF 각각의 부재 하의 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합과 비교할 때 20% 초과가 100ng/ml APRIL에 의해서 감소되지 않고, 100ng/ml BAFF에 의해서 감소되지 않고, 항체는 APRIL 단독과 비교할 때 APRIL-의존형 NF- κ B 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않고, BAFF 단독과 비교할 때 BAFF-의존형 NF- κ B 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않고, 상기 항체의 부재와 비교할 때 BAFF 및 APRIL의 부재 하에서 NF- κ B 활성화를 20% 초과하게 변경시키지 않는 것을 특징으로 한다.

[0355] 일 구체예에서 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합은 상기 ELISA에서 측정되는 경우 100ng/ml APRIL에 의해서 15% 초과가 감소되지 않고, 상기 ELISA에서 측정되는 경우 1000 ng/ml APRIL에 의해서 20% 초과가 감소되지 않고, 상기 ELISA에서 측정되는 경우 1000ng/ml APRIL에 의해서 15% 초과가 감소되지 않는다.

[0356] 일 구체예에서 인간 BCMA에 대한 상기 항체의 결합은 상기 ELISA에서 측정되는 경우 15% 초과가 100ng/ml APRIL에 의해서 감소되지 않고, 100ng/ml BAFF에 의해서 감소되지 않고, 상기 ELISA에서 측정되는 경우 20% 초과가 1000ng/ml APRIL에 의해서 감소되지 않고 1000ng/ml BAFF에 의해서 감소되지 않고, 상기 ELISA에서 측정되는 경우 15% 초과가 1000ng/ml APRIL에 의해서 감소되지 않고, 1000ng/ml BAFF에 의해서 감소되지 않는다.

[0357] 일 구체예에서 본 발명에 따른 항체는 APRIL 및 BAFF의 부재 하에서 APRIL-의존형 NF- κ B 활성화를 15%를 초과하게 변경시키지 않고, BAFF-의존형 NF- κ B 활성화를 15%를 초과하게 변경시키지 않고, NF- κ B 활성을 15% 초과하게 변경시키지 않는다.

[0358] 일 구체예에서 BCMA에 대한 항체의 결합은 각각 APRIL 또는 BAFF의 부재 하에서 NCI-H929 세포에 대한 상기 항체의 결합과 비교하는 경우 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 APRIL 또는 각각 BAFF의 존재 또는 부재 하에서 5nM, 바람직하게는 50nM, 및 140nM의 농도에서 상기 항체의 NCI-H929 세포(ATCC(등록상표) CRL-9068(상표명))에 대한 결합으로서 측정되는 경우 APRIL에 의해서 감소되지 않고, BAFF에 의해서 25% 초과, 20% 이하, 및 10% 이하만큼 감소되지 않는다.

[0359] 일 구체예에서 하기 실시예, 서열 목록 및 도면은 본 발명의 이해를 돋기 위해서 제공되고, 이의 진정한 범주는 첨부된 청구범위에 제시된다. 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않고 제시된 절차에서 변형이 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

재료 및 일반적인 방법

재조합 DNA 기술

[0362] 문헌[Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기술된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자 생물학적 시약은 제조원의 설명서에 따라서 사용하였다. 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오타이드 서열에

대한 일반적인 정보는 하기에 제공된다: [Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242]. 항체 쇄의 아미노산은 문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)]에 따라서 번호가 부여되고 지칭되었다.

[0363] 유전자 합성

[0364] a) 목적하는 유전자 분절은 화학적 합성에 의해서 제조된 올리고뉴클레오타이드로부터 제조하였다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위(singular restriction endonuclease cleavage site)가 측면에 배치된 600 내지 1800bp 길이의 유전자 분절을 PCR 증폭을 비롯한 올리고뉴클레오타이드의 어닐링(annealing) 및 결합(ligation)에 의해 조립하고, 그 다음, 예를 들어 Kpn1/Sad 또는 Ascl/Pac1을 pPCR스크립트(pPCRScript)(등록상표)(스트라타젠(Stratagene)) 기반 pGA4 클로닝 벡터 내에서 표시된 제한 부위를 통해서 클로닝시켰다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 서열분석에 의해서 확인하였다. 유전자 합성 단편을 젠아트(Geneart)(독일 레겐스부르크 소재)에서의 주어진 설명서에 따라서 주문하였다.

[0365] b) 목적하는 유전자 분절을 필요한 경우 적절한 주형(template)을 사용한 PCR에 의해서 생성하였거나 또는 합성 올리고뉴클레오타이드 및 자동 유전자 합성에 의한 PCR 산물로부터 젠아트 아게(독일 레겐스부르크 소재)에 의해 합성하였다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위가 측면에 배치된 유전자 분절을 추가 분석을 위해 표준 발현 벡터 또는 서열분석 벡터 내에 클로닝시켰다. 플라스미드 DNA를 상업적으로 입수 가능한 플라스미드 정제 키트를 사용하여 형질전환 박테리아로부터 정제하였다. 플라스미드 농도를 UV 분광학에 의해서 측정하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 서열분석에 의해서 확인하였다. 각각의 발현 벡터 내에서의 서브-클로닝을 허용하도록 유전자 분절을 적합한 제한 부위를 갖도록 설계하였다. 필요한 경우, 단백질 암호 유전자를 진핵 세포에서의 분비를 위한 단백질을 표적으로 하는 리더 웨이트를 위해 5'-말단 DNA 서열 암호를 갖도록 설계하였다.

[0366] DNA 서열 결정

[0367] DNA 서열은 이중 가닥 서열분석에 의해서 결정하였다.

[0368] DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리

[0369] 클론 매니저(Clone Manager)(사이언티픽 앤드 애쥬케이셔널 소프트웨어(Scientific & Educational Software)) 소프트웨어 패키지 버전 9.2를 서열 맵핑, 분석, 주석 및 도시를 위해서 사용하였다.

[0370] 발현 벡터

[0371] a) 하기에 기술된 바와 같이 기술된 항체 쇄를 포함하는 융합 유전자를 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해서 생성하였고, 예를 들어, 각각의 벡터 내의 독특한 제한 부위를 사용하여, 핵산 분절에 따른 연결에 의해서 공지된 재조합 방법 및 기술을 사용하여 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열을 DNA 서열분석에 의해서 검증하였다. 일시적 형질감염을 위해서, 형질전환된 이. 콜라이 배양물로부터의 플라스미드 제제에 의해서 더 많은 양의 플라스미드를 제조한다(뉴클레오본드 에이엑스(Nucleobond AX), 마카레이-나겔(Macherey-Nagel)).

[0372] b) 항-BCMA 항체 발현 벡터의 생성을 위해서, 중쇄 및 경쇄 DNA 서열의 가변 영역을 포유동물 세포계에서의 발현에 대해서 최적화된 각각의 제너릭 수용자 발현 벡터 내에 미리-삽입된 인간 IgG1 불변 중쇄 hum IgG1 불변 경쇄와 함께 프레임으로 서브클로닝시켰다. 항체 발현은 CMV 증강인자 및 MPSV 촉진인자, 그 다음 5' UTR, 인트론 및 Ig 카파 MAR 요소를 포함하는 키메라 MPSV 촉진인자 의해 유도된다. 전사는 CDS의 3' 말단에서 합성 폴리 A 신호 서열에 의해 종료된다. 모든 벡터는 진핵 세포에서의 분비를 위한 단백질을 표적으로 하는 리더 웨이트를 위해 5'-말단 DNA 서열 암호를 보유한다. 또한 각각의 벡터는 EBV EBNA 발현 세포에서 에피솜 플라스미드 복제를 위해서 EBV OriP 서열을 함유한다.

[0373] c) BCMAxCD3 이중특이적 항체 벡터의 생성을 위해서, IgG1 유도된 이중특이적 분자는 2개의 상이한 항원 결정인자 CD3 및 BCMA에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 결합 모이어티로 이루어진다. 항원 결합 모이어티는 각각 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄로 구성된 Fab 단편이다. Fab 단편 중 적어도 하나는 "Crossfab" 단편이었고, 여기서 VH 및 VL은 교환되었다. Fab 단편 내에서 VH 및 VL의 교환은 상이한 특이성의 Fab 단편이 동일한 도메인 배열을 갖지 않는 것을 보장한다. 이중특이적 분자 설계는 CD3에 대해서 1가이고, BCMA에 대해서 2가였는데, 여기서 하나의 Fab 단편은 내부 CrossFab(2+1)의 N-말단에 융합되었다. 이중특이적 분자는 분자가 긴 반감기를 갖기 위해서 Fc 부분을 함유하였다. 작제물의 개략적인 표현을 도 2에 제공하며;

작제물의 바람직한 서열은 SEQ ID NO:39 내지 52로 제시되어 있다. 중합체계 용액을 사용하여 혼탁물 중에서 성장하는 HEK293 EBNA 세포를 포유동물 발현 백터로 형질감염시킴으로써 분자를 생산하였다. 2+1 CrossFab-IgG 작제물의 제조를 위해, 1:1:2:1 비율(백터 Fc(노브)": "백터 경쇄": "백터 경쇄 CrossFab": "백터 중쇄-CrossFab)로 상응하는 발현 백터로 세포를 형질감염시켰다.

[0374] 세포 배양 기술

표준 세포 배양 기술을 문헌[Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.]에 기술된 바와 같이 사용한다.

[0376] HEK293 세포(HEK293-EBNA 시스템)에서의 일시적 발현

중합체계 용액을 사용하여, 혼탁물 중에서 성장된 HEK293-EBNA 세포에서 각각의 포유동물 발현 백터의 일시적-공동-형질 감염에 의해서 이중특이적 항체를 발현시켰다. 형질감염 하루 전에 HEK293-EBNA 세포를 6mM의 L-글루타민이 보충된 Ex-세포 배지 중에 1.5 미오(Mio) 생존 가능한 세포/ml로 시딩하였다(seeded). 최종 생산 부피 ml마다 2.0 미오 생존 가능한 세포를 원심분리하였다(210 x g로 5분). 상청액을 흡인시키고, 세포를 100 μ l의 CD CHO 배지 중에 재현탁시켰다. 100 μ l의 CD CHO 배지 중에서 1 μ g의 DNA(비율 중쇄: 경쇄: 변형된 경쇄 = 1:1:2:1)를 혼합함으로써 최종 생산 부피 ml마다에 대한 DNA를 제조하였다. 0.27 μ l의 중합체계 용액(1 mg/ml)을 첨가한 후 혼합물을 15초 동안 볼텍싱시켰고, 실온에서 10분 동안 정치시켰다. 10분 후, 혼탁된 세포 및 DNA/ 중합체계 용액 혼합물을 합치고, 이어서 적절한 용기로 옮기고, 이것을 전탕 장치에 넣었다(37°C, 5% CO₂). 3시간의 배양 시간 후, 6mM의 L-글루타민, 1.25mM의 발프로산 및 12.5%의 펩소이(Pepsoy)(50g/L)가 보충된 800 μ l의 Ex-세포 배지를 최종 생산 부피 1ml마다 첨가하였다. 24시간 후, 70 μ l의 공급 용액을 최종 생산 부피 1ml마다 첨가하였다. 7일 후 또는 세포 생존력이 70% 이하인 경우, 원심분리 및 멸균 여과에 의해서 세포를 상청액으로부터 분리하였다. 항체를 친화도 단계 및 양이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피인 1회 또는 2회 폴리싱 단계에 의해서 정제하였다. 필요할 경우, 추가 폴리싱 단계를 사용하였다. HEK293-EBNA 세포를 중합체계 용액을 사용하여 포유동물 발현 백터로 공동-형질감염시킴으로써 혼탁물 중에서 재조합 항-BCMA 인간 항체 및 이중특이적 항체를 생산하였다. 세포를 포맷에 따라서 2개 또는 4개의 백터로 형질감염시켰다. 인간 IgG1의 경우 하나의 플라스미드는 중쇄를 인코딩하였고, 나머지 플라스미드는 경쇄를 인코딩하였다. 이중특이적 항체의 경우 4개의 플라스미드를 공동-형질감염시켰다. 그들 중 2개는 2개의 상이한 중쇄를 인코딩하였고, 나머지 둘은 2개의 상이한 경쇄를 인코딩하였다. 형질감염 하루 전에 HEK293-EBNA 세포를 6mM의 L-글루타민이 보충된 F17 배지 중에 1.5 미오 생존 가능한 세포/ml로 시딩하였다.

[0378] 단백질 측정

항체 0.1% 용액의 흡광도의 이론적인 값을 사용하여, 280nm에서의 흡광도의 측정에 의해서 항체 농도의 측정을 수행하였다. 이 값은 아미노산 서열을 기반으로 하며, GPMAW 소프트웨어(라이트하우스 데이터(Lighthouse data a)에 의해서 계산되었다.

[0380] SDS-PAGE

누페이지®(NuPAGE®) 프리-캐스트 겔 시스템(Pre-Cast gel system)(인비트로젠(Invitrogen))을 제조원의 지시서에 따라서 사용한다. 특히, 10% 또는 4 내지 12%의 누페이지® 노벡스®(Novex®) Bis-TRIS 프리-캐스트 겔(pH 6.4) 및 누페이지® MES(환원 겔, 누페이지® 항산화 러닝 완충제 첨가제 함유) 또는 MOPS(비-환원 겔) 러닝 완충제를 사용한다.

[0382] 단백질 정제

[0383] 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해서

친화도 단계를 위해서, 6 CV 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, pH 7.5로 평형화된 단백질 A 칼럼(하이트랩 프로테인(HiTrap Protein) A FF, 5 ml, 지이 헬쓰케어(GE Healthcare)) 상에 상청액을 적재하였다. 동일한 완충제로서의 세척 단계 후에, 20mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, 100mM 글리신, pH 3.0로의 단계적 용리에 의해서 칼럼으로부터 항체를 용리시켰다. 목적하는 항체를 갖는 분획을 즉시 0.5M 인산나트륨, pH 8.0(1:10)으로 중화시키고, 풀링시키고(pooled), 원심분리에 의해서 농축시켰다. 농축물을 멸균 여과하고, 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해서 추가로 처리하였다.

[0385] 양이온 교환 크로마토그래피에 의해서

[0386] 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 위해서, 농축된 단백질을 친화도 단계에 대해서 사용된 용리 완충제를 사용하여 1:10으로 희석하고, 양이온 교환 칼럼 상에 적재하였다(포로스(Poros) 50 HS, 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)). 각각 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, pH 5.0 및 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, 100mM 염화나트륨 pH 5.0의 평형 완충제 및 세척 완충제 각각으로의 2회의 세척 단계 후에 단백질을 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, 100mM 염화나트륨 pH 8.5를 사용한 구배를 사용하여 용리시켰다. 목적하는 항체를 함유한 분획은 풀링시키고, 원심분리에 의해서 농축시키고, 멸균 여과하고, 추가 크기 배제 단계로 처리하였다.

[0387] 분석적 크기 배제 크로마토그래피에 의해서

[0388] 크기 배제 단계를 위해서, 농축된 단백질을 제형 완충제로서 트원20의 존재 또는 부재 하의 XK16/60 하이로드 슈퍼덱스(HiLoad Superdex) 200 칼럼(지이 헬쓰케어) 및 20mM 히스티딘, 140mM 염화나트륨, pH 6.0에 주입하였다. 단량체를 함유한 분획은 풀링시키고, 원심분리에 의해서 농축시키고, 멸균 바이알로 멸균 여과하였다.

순도 및 단량체 함량의 측정

[0389] 25mM 인산칼륨, 125mM 여화나트륨, 200mM L-아르기닌 1염화수소염, 0.02%(w/v) 나트륨 아자이드, pH 6.7 완충제 중에서 CE-SDS(캘리퍼 랩칩 GXII 시스템(캘리퍼 라이프 사이언시스(Caliper Life Sciences))) 각각 HPLC(티에스겔(TSKgel) G3000 SW XL 분석용 크기 배제 칼럼(토소(Tosoh)))에 의해서 최종 단백질 제제의 순도 및 단량체 함량을 측정하였다.

[0390] LC-MS 분석에 의한 분자량 확인

[0391] 탈글리코실화

[0392] 분자의 균질한 제제를 확인하기 위해서 최종 단백질 용액을 LC-MS 분석에 의해서 분석하였다. 탄수화물에 의해서 도입된 불균질성을 제거하기 위해서, 작제물을 PNGaseF(프로자임(ProZyme))로 처리하였다. 따라서 0.5mg/ml의 농도로 20 μ g의 단백질에 2 μ l의 2M 트리스를 첨가함으로써 단백질 용액의 pH를 pH 7.0으로 조정하였다. 0.8 μ g의 PNGaseF를 첨가하였고, 12시간 동안 37°C에서 배양시켰다.

[0393] LC-MS 분석 - 온 라인(on line) 검출

[0394] TOF 6441 질량 분광계(에질런트)에 커플링된 애질런트 HPLC 1200 상에서 LC-MS 방법을 수행하였다. 마카레이 나겔 폴리스테렌 칼럼(Macherey Nagel Polysterene column); RP1000-8(8 μ m 입자 크기, 4.6x250mm; 카탈로그 번호 719510) 상에서 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 용리액 A는 물 중의 5% 아세토나이트릴 및 0.05%(v/v) 품산이었고, 용리액 B는 95% 아세토나이트릴, 5% 물 및 0.05% 품산이었다. 유량은 1ml/분이었고, 분리는 40°C에서 수행하였고, 상기에 기술된 바와 같은 처리로 6 μ g(15 μ l)의 단백질 샘플을 수득하였다.

시간(분)	%B
0.5	15
10	60
12.5	100
14.5	100
14.6	15
16	15
16.1	100

[0395]

[0396] 첫 4분 동안 용리물을 폐기물로 보내어 염 오염으로부터 질량 분광계를 보호하였다. ESI-공급원은 121/분의 무수 기체 유동, 350°C의 온도 및 60psi의 네블라이저 압력으로 구동되었다. 양성 이온 모드를 사용하여 380V의 단편화 전압(fragmentor voltage) 및 700 내지 3200m/z의 질량 범위를 사용하여 MS 스펙트럼을 획득하였다. 4내지 17분에서 장비 소프트웨어에 의해서 MS 데이터를 획득하였다.

[0398] 혈액으로부터의 인간 PBMC의 분리

[0399] 지역 혈액 은행 또는 건강한 인간 공여자의 신선한 혈액으로부터 얻은 강화된 램프구 제제(비피 코트)로부터의 히스토파크(Histopaque) 밀도 원심분리에 의해서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하였다. 간략하게, 혈액을 멸균 PBS로 희석하고, 주위 깊게 히스토파크 구배 상에 적층하였다(시그마(Sigma), H8889). 450 x g로 실온에서 30분 동안 원심분리한 후(브레이크 스위치 오프), 간기를 함유하는 PBMC 상부의 혈장의 부분을 폐기하였다. PBMC를 새로운 50ml 팔콘 퓨어로 옮겼고, 퓨어를 PBS로 총 부피 50ml로 채웠다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 400 x g로 원심분리하였다(브레이크 스위치 오프). 상청액을 폐기하고, PBMC 펠렛(pellet)을 무균 PBS로 2회 세척하였다(4°C에서 10분 동안 350 x g로의 원심분리 단계). 생성된 PBMC 집단을 자동 방식으로 (바이셀(ViCell)) 계수하고, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이터 내에서 10% FCS 및 1% L-알라닐-글루타민(바이오크롬(Biochrom), K0302)을 함유하는 RPMI1640 배지 중에 검정법이 시작될 때까지 저장하였다.

[0400] 혜파린화된 혈액으로부터의 1차 시노몰구스 PBMC의 분리

[0401] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 하기와 같이 건강한 시노몰구스 공여자로부터 밀도 원심분리에 의해서 제조하였다: 혜파린화된 혈액을 멸균 PBS를 사용하여 1:3으로 희석시키고, 림포프렙(Lymphoprep) 배지(액손 랩(Axon Lab) #1114545)를 멸균 PBS를 사용하여 90%로 희석시켰다. 희석된 혈액 2 부피를 희석된 밀도 구배의 하나의 부피 상에 적층하고, PBMC 분획을 30분 동안 실온에서 520 x g으로의 원심분리에 의해서 분리하였다(브레이크 부재). PBMC 밴드를 새로운 50ml 팔콘 퓨어로 옮기고, 원심분리에 의해서 10분 동안 400 x g로 4°C에서 세척하였다. 저속 원심 분리를 수행하여 혈소판을 제거하고(150 x g, 4°C에서 15분), 생성된 PBMC 집단을 자동방식으로 계수하고(비셀), 추가 검정법을 위해서 즉시 사용하였다.

[0402] 실시예

[0403] 실시예 1: 항-BCMA 항체의 생성

[0404] 실시예 1.1: 항원 및 도구(tool) 시약의 생산

[0405] 실시예 1.1.1: 재조합, 가용성, 인간 BCMA 세포의 도메인

[0406] 과거 디스플레이 선택을 위한 항원으로서 사용된 인간, 시노몰구스 및 뮤린 BCMA의 세포의 도메인을 HEK EBNA 세포에서 N-말단 단량체 Fc-융합으로서 일시적으로 발현시켰고, 수용체 쇄(Fc 농 쇄)를 보유하는 Fc 부분의 C-말단에 위치된 avi-태그 인식 서열에서 BirA 비오틴 리가제의 공동-발현을 통해서 생채내에서 부위-특이적으로 바이오티닐화시켰다. 인간 및 시노몰구스 BCMA의 세포의 도메인은 각각 메티오닌 4 내지 아스파라긴 53, 및 메티오닌 4 내지 아스파라긴 52를 포함하였다. 이들을 인간 IgG1의 힌지에 대해서 N-말단 융합시켜 노브-인투-홀 기술에 의해서 비용합된 인간 IgG1 Fc 부분(홀 쇄)을 사용하여 혜테로이량체화를 가능하게 하였다.

[0407] 실시예 1.1.1A: 성숙에 의한 항-BCMA 항체의 생성

[0408] 1.1.1A.1 라이브러리 및 선택

[0409] 2개의 라이브러리를 항체 83A10을 기반으로 작제하였다. 이를 라이브러리는 각각 경쇄의 CDR1 및 CDR2(83A10 L1/L2) 또는 중쇄의 CDR1 및 CDR2(83A10 H1/H2)로 무작위화된다. 중폭 및 조립의 순차적인 2단계에 의해서 이들 라이브러리 각각을 작제하였다. 최종 조립 산물은 클론 83A10의 플라스미드 제제를 기반으로 유사하게 처리된 수용벡터(acceptor vector)와 함께, 83A10 L1/L2 라이브러리의 경우에는 절단된 NcoI / BsiWI였고, 83A10 H1/H2 라이브러리의 경우에는 MunI 및 NheI였다. 절단된 무작위화된(부분적인) V-도메인 및 절단된 수용벡터(들)의 하기 양을 각각의 라이브러리를 위해서 결찰시켰다(μ g V-도메인/ μ g 벡터): a.m. 83A10 L1/L2 라이브러리 (3/10), 83A10 H1/H2 라이브러리 (3/10), 83A10 L1/L2 및 83A10 H1/H2 라이브러리의 정제 결찰물을 각각 풀링시키고, 각각 2개의 라이브러리를 위해서 대장균 TG1 세포의 15 형질전환체를 사용하여 83A10 L1/L2 라이브러리의 경우에는 2.44×10^{10} 의 최종 라이브러리 크기, a.m. 83A10 H1/H2 라이브러리의 경우에는 1.4×10^{10} 의 최종 라이브러리 크기를 수득하였다. 이를 Fab 라이브러리를 디스플레이하는 과정미드 입자를 수집 및 정제하였다.

[0410] 1.1.1A.2 클론의 선택

[0411] 상류에서 Fc 및 avi-태그를 클로닝하는 인간 또는 시노몰구스 B-세포 성숙화 항원(BCMA)의 애토도메인에 대한 선택을 수행하였다. 선택 전에, Fc 고갈인자(고갈인자)를 500nM의 농도로 뉴트라비딘 플레이트 상에

코팅하였다. 하기 패턴에 따라서 선택을 수행하였다:

1) 1시간 동안 라이브러리 83A10 L1/L2 라이브러리 또는 83A10 H1/H2 라이브러리의 약 10^{12} 파지미드 입자의 고정화된 Fc 고갈인자에 대한 결합, 2) 20분 동안 50nM, 25nM, 10nM, 또는 2nM 인간 또는 cynoBCMA(라이브러리 및 선택 라운드에 따름)에 대한 라이브러리 83A10 L1/L2 라이브러리 또는 83A10 H1/H2 라이브러리의 비결합 파지미드의 전달, 3) 10분 동안 자성 스트렙타비딘 비드 첨가, 4) 10 X 1ml PBS/Tween® 및 10 X 1ml PBS를 사용한 자성 스트렙타비딘 비드의 세척, 5) 10분 동안 1ml 100mM TEA(트라이에틸아민)의 첨가에 의한 파지 입자의 용리 및 $500\mu\text{l}$ 1M Tris®/HCl pH 7.4의 첨가에 의한 중화 및 6) 지수기(log-phase) 대장균 TG1 세포의 재감염, 헬퍼파지 VCSM13으로의 감염, 및 그 다음 후속 선택 라운드에서 사용될 파지미드 입자의 PEG/NaCl 첨전.

선택은 3라운드에 걸쳐서 수행하였고, 조건을 2개의 라이브러리 개별 각각에 대해서 5개의 스트립라인으로 조정하였다. 상술하면, 선택 파라미터는 다음과 같았다:

스트립라인 1(라운드 1의 경우 50nM huBCMA, 라운드 2의 경우 25nM cynoBCMA, 라운드 3의 경우 10nM huBCMA),

스트립라인 2(라운드 1의 경우 50nM huBCMA, 라운드 2의 경우 10nM huBCMA, 라운드 3의 경우 2nM huBCMA),

스트립라인 3(라운드 1의 경우 50nM huBCMA, 라운드 2의 경우 25nM huBCMA, 라운드 3의 경우 10nM cynoBCMA),

스트립라인 4(라운드 1의 경우 50nM huBCMA, 라운드 2의 경우 25nM cynoBCMA, 라운드 3의 경우 10nM cynoBCMA),

스트립라인 5(라운드 1의 경우 50nM cynoBCMA, 라운드 2의 경우 25nM cynoBCMA, 라운드 3의 경우 10nM cynoBCMA).

Mab 21, Mab 22, Mab 33, 및 Mab 42 BCMA 항체의 중쇄는 cynoBCMA 만을 사용하는 스트립라인 5로부터 유도되었다.

1.1.1A.3 선별 방법

개별 클론을 96-홈(well) 포맷 내에서 1ml 배양물로서 박테리아 발현시켰고, 상청액을 ELISA에 의해서 선별에 적용하였다. 인간 및 cynoBCMA에 대해서 5 x 배경보다 더 높은 신호 및 Fc 고갈인자에 대해서 3 x 배경보다 더 낮은 신호로서 특이적 결합기를 정의하였다. 뉴트라비딘 96 홈 스트립 판(well strip plate)을 10nM의 huBCMA, 10nM cyBCMA 또는 50nM Fc-고갈인자로 코팅하고, 그 후 Fab-함유 박테리아 상청액을 첨가하고, 항-Flag/HRP 2차 항체를 사용하여 이의 Flag-태그를 통해서 특이적으로 결합하는 Fab를 검출하였다. ELISA-양성 클론을 96-홈 포맷 내에서 1ml 배양물로서 박테리아 발현시켰고, 상청액을 속도 선별 실험 프로테온에 적용하였다. 500개의 양성 클론이 식별되었고, 이를 중 대부분은 유사한 친화도를 가졌다.

1.1.1A.4 가용성 Fab 및 IgG를 사용한 표면 플라스몬 공명 선별(resonance screen)

70개의 클론을 SPR에 의해서 추가로 시험하였다. 모든 실험은 러닝 완충제(10mM PBS, pH 7.4 및 0.005%(v/v) 트윈(등록상표)20)로서 PBST를 사용하여 25°C에서 수행하였다. GLC 및 GLM 센서 칩 및 커플링 시약(10mM 아세트산나트륨, pH 4.5, 설포-N-하이드록시석신이미드, 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카복사이드 하이드로클로라이드[EDC] 및 에탄올아민)이 장치된 프로테온 XPR36 바이오센서를 바이로라드 인크.(BioRad Inc.)(히클레스(Hercules), 미국 캘리포니아주 소재)로부터 구매하였다. 고정화를 GLM 칩 상에서 $30\mu\text{l}/\text{분}$ 으로 수행하였다. pAb(염소) 항 hu IgG, F(ab)2 특이적 Ab(잭슨)를 표준 아민-커플링 절차를 사용하여 수직 방향에서 커플링시켰다: 모든 6개의 리간드 채널을 EDC(200mM)와 설포-NHS(50mM)의 혼합물을 사용하여 5분 동안 활성화시켰다. 표면을 활성화시킨 직후, pAb(염소) 항 hu IgG, F(ab)2 특이적 항체($50\mu\text{g}/\text{ml}$, 10mM 아세트산나트륨, pH 5)을 5분 동안 모든 6개의 채널을 통해서 주사하였다. 마지막으로, 채널을 1M 에탄올아민-HCl(pH 8.5)의 5분 주사로 차단시켰다. 최종 고정화 수준은 모든 채널에 대해서 유사하였고, 11000 내지 11500RU 범위였다. 개별 전체 수평 채널 중 5개를 따라서 5분 동안 동시에 주입하여($30\mu\text{l}/\text{분}$) 대장균 상청액으로부터 Fab 변종을 포획하고, 상청액 중의 Fab의 농도에 따라서 200 내지 900RU 범위의 수준을 생성하였고; 조정 배지를 6개의 채널을 따라서 주입하여 이중 참고 목적을 위한 "인-라인(in-line)" 블랭크를 제공하였다. 인간, 시노몰구스 및 마우스 BCMA(50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0nM, $50\mu\text{l}/\text{분}$)의 연속 희석물을 수직 채널을 따라서 3분 동안 주사함으로써 원-샷 속도 측정(one-shot kinetic measurement)을 수행하였다. 해리를 5분 동안 모니터하였다. 속도 데이터를 프로테온 매니저 v. 2.1로 분석하였다. 반응 스팟 데이터의 처리는 스팟간-참고 및 인라인 완충제 블랭크를 사용한 이중-참고 단계를 포함하였다(문현[Myszka, 1999]). 복제 원-샷 주입으로부터의 처리 데이터를 물질 수송 없이 단순 1:1 랭

뮤어 결합 모델에 피팅하였다(문헌[O'Shannessy et al., 1993]).

[0424] 6-홈 포맷의 HEK 생산물의 상청액으로부터의 IgG 의 측정을 위해서 개별 전체 수평 채널 중 5개를 따라서 5분 동안 동시에 주입하여(30 μ l/분) HEK293 상청액으로부터 IgG 변종을 포획하고, 200 내지 400RU 범위의 수준을 생성하였고; 조정 배지를 6개의 채널을 따라서 주입하여 이중 참고 목적을 위한 "인-라인" 블랭크를 제공하였다. 인간, 시노몰구스 및 마우스 BCMA(25, 5, 1, 0.2, 0.04, 0 nM, 50 μ l/분)의 연속 희석물을 수직 채널을 따라서 3분 동안 주사함으로써 원-샷 속도 측정을 수행하였다. 해리를 5분 동안 모니터하였다. 속도 데이터를 상기에 기술된 바와 같이 분석하였다. OSK 측정치를 표 2D에 요약하고; i/m, 결정적이지 않은 측정치. huBCMA에 대한 친화도는 약 50pm 내지 5nM인 것을 발견하였다. cynoBCMA에 대한 친화도는 약 2nM 내지 20nM인 것을 발견하였다 (몇몇 클론은 이 범위 밖임, 도 17 참고).

[0425] 1.1.1A5. HC 및 LC 클론의 추가 선택

[0426] 이들의 경험으로 인해서, 본 발명자들은 상이한 검정법에서 측정된 huBCMA, cynoBCMA, 뮤린BCMA에 대한 결합 특성 및 비율을 기반으로 이들 70개의 클론 중에서 추가로 27개의 클론을 선택하였다. 이들 클론 중에서 4개의 VH 및 9개의 VL 클론을 선택하였고, 이것은 34개의 VH/VL 조합물을 유발하였다. HEK-huBCMA 세포에 대한 결합 친화도를 측정하였다(도 18 및 표 2E). HEK 세포 상의 huBCMA에 대한 항체 Mab 21, Mab 22, Mab 27, Mab 39 및 Mab 42의 결합은 huBCMA-HEK 세포에 대한 Mab 83A10의 결합보다 상당히 더 양호한 것은 아니었음을 발견하였다. 그러나 Mab21, Mab 22, Mab27, Mab33, Mab39, 및 Mab42는 시노몰구스 원숭이에서의 이들의 전체 특성, 예컨대 huBCMA, cynoBCMA에 대한 친화도, 유세포 분석법에 의한 이중특이적 항체로서의 BCMA-양성 다발성 골수종 세포 주 H929, L363 및 RPMI-8226에 대한 결합, 환자 골수 흡인물로부터의 생존 가능한 골수종 형질 세포의 골수종 세포 H929, L363 및 RPMI-8226의 사멸 능력, 및 약동학(PK) 및 약력학(BCMA 양성 세포의 사멸) 데이터로 인해서 선택되었다.

[0427] [표 2C: 항체 대 스트림라인의 관계]

Mab 번호	라이브러리 2(HC)로부터 유도됨	클론 HC	라이브러리 1(LC)로부터 유도됨	클론 LC
Mab 21	스트림라인 5	5F04	스트림라인 1	1D04
Mab 22	스트림라인 5	5F04	스트림라인 1	1C05
Mab 27	스트림라인 1	1A08	스트림라인 1	1D04
Mab 33	스트림라인 5	5D03	스트림라인 1	1D04
Mab 39	스트림라인 2	2E12	스트림라인 1	1D04
Mab 42	스트림라인 5	5F04	스트림라인 5	5A11

[0428]

[표 2D: 인간, 시노몰구스 및 마우스 BCMA에 대한 원-샷-속도 친화도 측정]

Mab 번호	VH	VL	KD	KD	KD
			huBCMA	cyBCMA	muBCMA
83A10	pCON1532	pCON1080	1.5E-09	1.4E-08	i/m
Mab 21	pCON1531	pCON1522	2.8E-11	5.1E-11	7.3E-10
Mab 22	pCON1531	pCON1521	4.8E-11	i/m	9.0E-10
Mab 27	pCON1520	pCON1522	3.9E-13	1.0E-10	9.7E-10
Mab 33	pCON1530	pCON1522	1.7E-11	3.4E-11	4.9E-10
Mab 39	pCON1524	pCON1522	6.2E-11	2.7E-10	i/m
Mab 42	pCON1531	pCON1527	2.3E-10	3.9E-10	2.5E-09

[0430]

[0431] [표 2E: HEK-huBCMA 세포에 대한 IgG 변종의 결합]

Mab 번호	VH	VL	결합 EC50 [nM]	결합 EC50 [μg/mL]
83A10	PCON1532	PCON1080	2.4	0.34
Mab 14	PCON1530	PCON1527	1.47	0.21
Mab 21	pCON1531	PCON1522	2.46	0.35
Mab 22	PCON1531	pCON1521	2.08	0.30
Mab 23	PCON1531	PCON1519	4.97	0.71
Mab 27	PCON1520	PCON1522	10.57	1.52
Mab 28	PCON1520	PCON1521	11.34	1.63
Mab 30	PCON1530	PCON1526	10.35	1.49
Mab 31	PCON1530	PCON1525	1.34	0.19
Mab 33	pCON1530	PCON1522	1.18	0.17
Mab 34	PCON1530	PCON1521	1.24	0.18
Mab 35	PCON1530	PCON1519	1.63	0.23
Mab 39	PCON1524	PCON1522	1.73	0.25
Mab 42	PCON1531	pCON1527	2.10	0.30
Mab 44	PCON1520	PCON1527	1.55	0.22

[0432] [0433] 실시예 1.2: 도구로서의 BCMA-발현 세포

[0434] 실시예 1.2.1: 이의 표면 상에서 BCMA를 발현시키는 인간 골수종 세포주 및 세포 표면 상의 BCMA 수용체 수의 정량분석

[0435] 유세포 분석법에 의해서 5종의 인간 골수종 세포주(NCI-H929, RPMI-8226, U266B1, L-363 및 JJN-3) 상에서 BCMA 발현을 평가하였다. NCI-H929 세포((H929) ATCC® CRL-9068™)를 10 내지 20% 열-비활성화 FCS를 함유한 80 내지 90% RPMI 1640 중에서 배양하고, 이것은 2mM L-글루타민, 피루브산나트륨 및 50 μM 머캅토에탄올을 함유할 수 있었다. RPMI-8226 세포((RPMI) ATCC(등록상표) CCL-155(상표명))을 90% RPMI 1640 및 10% 열-비활성화 FCS를 함유하는 배지 중에서 배양하였다. U266B1((U266) ATCC® TIB-196™) 세포를 2mM L-글루타민, 10mM HEPES, 피루브산나트륨, 4500mg/L 글루코스 및 1500mg/L 중탄산나트륨 및 15% 열-비활성화 FCS를 함유하도록 변형된 RPMI-1640 배지 중에서 배양하였다. L-363 세포주(레이브니츠 인스티튜트(Leibniz Institute) DSMZ - 미생물 및 세포 배양물의 독일 수집물(German collection of microorganisms and cell cultures); DSMZ 번호 ACC 49)를 85% RPMI 1640 및 15% 열-비활성화 FCS 중에서 배양하였다. JJN-3 세포주(DSMZ 번호 ACC 541)를 40% 둘베코(Dulbecco's) MEM + 40% 이스코브(Iscove's) MDM + 20% 열-비활성화 FBS 중에서 배양하였다. 간략하면, 세포를 수화하고, 세척하고, 생존력에 대해서 계산하고, 50,000개 세포/96-홈 등근 바닥 플레이트 홈으로 재현 탁시키고, 항-인간 BCMA 항체(압캡(Abcam), #ab54834, 마우스 IgG1)와 함께 10μg/ml에서 30분 동안 4°C에서 배양시켰다(내재화 방지를 위해서). 마우스 IgG1을 아이소타입 대조군으로서 사용하였다(비디 바이오사이언시스, #554121). 이어서 세포를 원심분리(350 x g로 5분)시키고, 2회 세척하고 FITC-접합된 항 마우스 2차 항체와 함께 30분 동안 4°C에서 배양시켰다. 배양 시간이 끝난 후, 세포를 원심분리(350 x g로 5분)시키고, FACS 완충제로 2회 세척하고, 100μl FACS 완충제 중에 재현탁시키고, FACSDiva 소프트웨어를 실행하는 칸토(Canto)II 장치에서 분석하였다. H929, RPMI-8226 및 U266B1 골수종 세포주 상의 BCMA 수용체 수의 상대적인 정량분석을 QIFIKIT 분석(다코(Dako), #K0078, 제조원의 지시서에 따름)에 의해서 평가하였다. H929 세포는 다른 골수종 세포주보다 5 내지 6배까지 더 높은, 가장 높은 밀도로 인간 BCMA를 발현시켰다. H929는 중간/낮은 BCMA-발현 골수종 세포인 U266 및 L363, 낮은 BCMA-발현 골수종 세포인 RPMI-8226 및 매우 낮은 BCMA-발현 골수종 세포인 JJN-3와 비교할 때 높은 BCMA-발현 골수종 세포주로서 간주된다. 표 3은 각각의 실험(n=5)당 인간 다발성 골수종 세포주의 세포 표면 상의 상대적인 BCMA 수용체 수를 요약한다.

[0436] [표 3: H929, L363, RPMI-8226, U266B1 및 JJN-3 인간 골수종 세포즈의 막 표면 상의 BCMA 수용체 수에 대한 정량분석]

인간 골수종 세포주	특이적 항원 결합 능력(SABC)				
	실험 1	실험 2	실험 3	실험 4	실험 5
H929	19357	54981	44800	100353	98050
L363	16,970	/	11300	11228	/
U266(B1)	/	12852	11757	/	9030
RPMI-8226	1165	5461	/	11361	2072
JJN-3	/	/	/	/	650

[0437]

실시예 2: BCMA 결합 검정법: 표면 플라스몬 공명

[0438]

표면 플라스몬 공명(SPR)에 의한 재조합 BCMA에 대한 항-BCMA 항체의 결합의 평가는 다음과 같다. 모든 SPR 실험은 25°C에서 러닝 완충제로서 HBS-EP(0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20, 바이아코어, 프라이부르크/독일 소재)와 함께 바이아코어 T200 상에서 수행하였다. 항-BCMA 항체와 재조합 BCMA Fc(kih)(인간 및 시노몰구스) 사이의 상호 작용의 결합활성(avidity)을 측정하였다. 바이오티닐화된 재조합 인간 및 시노몰구스 BCMA Fc(kih)를 지시서(바이아코어, 프라이부르크/독일 소재)에 따라서 SA 칩 상에 직접 커플링시켰다. 고정화 수준은 200 내지 700RU 범위였다. 항-BCMA 항체를 120초에 걸쳐서 유동 세포를 통해 30 μ l/분의 유동으로 2배의 농도 범위(1.95 내지 500nM)로 통과시켰다. 해리를 180초 동안 모니터하였다. 멀크 굴절률 차이를 기준 유동 세포 상에서 수득된 반응을 빨셈함으로써 교정하였다. 여기에서, 항-BCMA 항체를 표준 아민 커플링 키트에 기술된 바와 같이 이전에 활성화된 및 비활성화된 빈 표면 위로 유동시켰다. 상호작용의 이가(bivalency)에도 불구하고 비교 목적을 위해, 수치 적분법에 의한 1:1 랭류어 결합에 대한 속도식에 피팅하기 위해서 바이아코어 T200 평가 소프트웨어(vAA, 바이아코어 AB, 업살라/스웨덴 소재)를 사용하여 겉보기 속도 상수를 유도하였다. 항-BCMA 항체와 재조합 인간 BCMA Fc(kih) 사이의 상호작용의 친화도를 또한 측정하였다. 항-인간 Fab 항체(지이 헬쓰케어)를 표준 아민 커플링 키트 (바이아코어, 프라이부르크/독일 소재)를 사용하여 pH 5.0에서 CM5 칩 상에 직접 커플링시켰다. 고정화 수준은 약 6500RU였다. 항-BCMA 항체를 90초 동안 25nM에서 포획하였다. 재조합 인간 BCMA Fc(kih)를 120초에 걸쳐서 유동 세포를 통해 30 μ l/분의 유동으로 4배의 농도 범위(1.95 내지 500nM)로 통과시켰다. 해리를 120초 동안 모니터하였다. 멀크 굴절률 차이를 기준 유동 세포 상에서 수득된 반응을 빨셈함으로써 교정하였다. 여기에서, 항-BCMA 항체가 아닌 HBS-EP가 주입된 고정화된 항-인간 Fab 항체를 갖는 표면 위에 재조합 BCMA를 유동시켰다. 수치 적분법에 의한 1:1 랭류어 결합에 대한 속도식에 피팅하기 위해서 바이아코어 T100 평가 소프트웨어(vAA, 바이아코어 AB, 업살라/스웨덴 소재)를 사용하여 겉보기 속도 상수를 유도하였다(표 4).

[0440]

[표 4: 1:1 랭류어 결합에 대한 속도식에 피팅함으로써 측정된 친화도 상수]

리간드	분석물	Kon[1/Ms]	Koff[1/s]	KD[M]
83A10 IgG	huBCMA Fc(kih)	5.07E+05	2.92E-03	5.76E-09
	cynoBCMA Fc(kih)	2.29E+05	2.03E-02	8.86E-08
Mab 21 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.51E+05	4.39E-05	5.16E-11
	cynoBCMA Fc(kih)	4.91E+05	2.35E-04	4.78E-10
Mab 22 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.14E+05	5.15E-05	6.33E-11
	cynoBCMA Fc(kih)	4.54E+05	4.42E-04	9.74E-10
Mab 42 IgG	huBCMA Fc(kih)	8.03E+05	2.98E-04	3.71E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	7.07E+05	4.53E-04	6.41E-10
Mab 27 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.59E+05	5.93E-05	1.65E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	2.16E+05	4.55E-04	2.11E-09
Mab 33 IgG	huBCMA Fc(kih)	2.00E+05	3.55E-05	1.78E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	1.32E+05	9.76E-05	7.39E-10
Mab 39 IgG	huBCMA Fc(kih)	3.61E+05	5.58E-05	1.55E-10
	cynoBCMA Fc(kih)	2.15E+05	4.67E-04	2.17E-09

[0441]

실시예 3: 인간/시노몰구스(hu/cyno) 친화성 캡

[0442]

실시예 2에 기술된 친화도 값을 기반으로, 인간 BCMA 대 시노몰구스 BCMA에 대한 항-BCMA 항체의 친화도를 비교하였고, cyno/hu 친화도 비(캡) 값을 계산하였다(표 5). 시노몰구스 BCMA에 대한 항체의 친화도를 인간 BCMA에 대한 친화도로 나눗셈함으로써 친화도 cyno/hu 캡을 계산하였고, 이는 BCMA 항체가 시노몰구스 BCMA에 대한 것

보다 x 배의 결합 친화도로 인간 BCMA에 결합하는 것을 의미한다(여기서 x= cyno/hu 캡 값). 결과를 표 5에 나타낸다.

[0444] [표 5: 인간 BCMA 대 시노몰구스 BCMA에 대한 항-BCMA 항체의 친화도 및 hu/cyno 캡 값]

a-BCMA IgG	K _D 인간 BCMA [M]	K _D 시노몰구스 BCMA [M]	친화도 cyno/hu 캡
83A10	5.76E-09	8.86E-08	15.3
Mab 21	5.16E-11	4.78E-10	9.3
Mab 22	6.33E-11	9.74E-10	15.4
Mab 42	3.71E-10	6.41E-10	1.7
Mab 27	1.65E-10	2.11E-09	12.7
Mab 33	1.78E-10	7.39E-10	4.2
Mab 39	1.55E-10	2.17E-09	14

[0445] [실시예 4: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생성]

[0446] 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체를 참고로 포함된 국제 특허 공개 제WO2014/122144호에 따라서 생성하였다.

[0447] [실시예 4.1: 항-CD3 항체]

[0448] 용어 "CD3 또는 CD3" 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 유니프로트 P07766(CD3E_인간) 하에 기술된 인간 CD3에 관한 것이다. 용어 "CD3 ε에 대한 항체, 항 CD3 항체"는 CD3 ε에 결합하는 항체에 관한 것이다. 바람직하게는 항체는 각각 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VH 및 각각 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VL을 포함한다. 바람직하게는 항체는 SEQ ID NO:7(VH) 및 SEQ ID NO:8(VL)의 가변 도메인을 포함한다. 상기에 기술된 바와 같은 항-CD3 항체를 사용하여 하기 실시예에서 사용된 T 세포 이중특이적 항체를 생성하였다.

[0449] [실시예 4.2: Fc-함유 2+1 포맷의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생성]

[0450] 상응하는 항-BCMA IgG1 항체의 완전 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 cDNA뿐만 아니라 항-CD3 VH 및 VL cDNA를 출발물질로서 사용하였다. 각각의 이중특이적 항체에 대해서, 각각 상기에 기술된 상응하는 항-BCMA 항체의 중쇄 및 경쇄 및 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 4개의 단백질 쇄를 포함시켰다. 잘못 짹지워진 중쇄, 예를 들어 항-CD3 항체의 2개의 중쇄를 갖는 부산물의 형성을 최소화하기 위해서, 국제 특허 공개 제WO2009080251호 및 제WO2009080252호에 기술된 바와 같은 "노브-인투-홀 돌연변이" 및 조작된 이황화 결합을 보유한 돌연변이화된 헤테로이량체 Fc 영역을 사용한다. 잘못 짹지워진 경쇄, 예를 들어 항-BCMA 항체의 2개의 경쇄를 갖는 부산물의 형성을 최소화하기 위해서, 국제 특허 공개 제WO2009080251호 및 제WO2009080252호에 기술된 방법을 사용하여 CH1 x 불변 카파 크로스오버를 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄에 적용한다.

[0451] a) 2+1 포맷을 갖는 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체, 즉 BCMA에 대해서 2가이고, CD3에 대해서 1가인 이중특이적 (Fab)₂ x (Fab) 항체는 효능 및 안정성에 대한 강력한 예측성에 대한 이점을 가질 것인데, 그 이유는 그것이 종양 표적 BCMA에 우세하게 결합하고, CD3 항체 싱크(sink)를 회피하고, 따라서 종양에 대해서 집중된 약물 노출에 대해서 더 높은 잠재력을 가질 것이다.

[0452] [0453] 2+1 포맷의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체(즉, Fc를 갖는 BCMA에 대해서 2가이고 CD3에 대해서 1가인 이중특이적 (Fab)₂ x (Fab) 항체)를 이전에 선택된 인간 BCMA 항체를 위해서 생산하였다. 상응하는 항-BCMA IgG1 항체의 완전 Fab(중쇄 VH 및 CH1 도메인 + 경쇄 VL 및 CL 도메인)를 인코딩하는 cDNA뿐만 아니라 항-CD3 VH 및 VL cDNA를 출발물질로서 사용하였다. 각각의 이중특이적 항체에 대해서, Fc 영역과 함께, 각각 상기에 기술된 상응하는 항-BCMA 항체의 중쇄 및 경쇄 및 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 4개의 단백질 쇄를 포함시켰다.

[0454] 간략하게, 각각 하기를 인코딩하는 4개의 발현 벡터의 동시 공동형질감염에 의해서 각각의 이중특이적 항체를 생산하였다: a) 상응하는 BCMA 항체의 완전 경쇄 cDNA, b) 표준 분자 생물학 방법, 예컨대 스플라이스-오버랩-익스텐션 PCR에 의해서 생성되고, (N-에서 C-말단 순서의) 분비 리더 서열, 상기에 기술된 상응하는 항-BCMA 항체의 Fab(VH 그 다음 CH1 도메인), 서열 Gly-Gly- Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser을 갖는 가요성 글리신(Gly)-세린(Ser) 링커, 상기에 기술된 상응하는 항-BCMA 항체의 Fab(VH 그 다음 CH1 도메인), 서열 Gly-Gly-

Gly- Gly-Ser-Gly-Gly- Gly- Gly-Ser을 갖는 가요성 글리신(Gly)-세린(Ser) 링커, 상기에 기술된 항-CD3 항체의 VH 및 인간 경쇄 cDNA의 불변 카파 도메인으로 제조된 융합 단백을 인코딩하는 융합 cDNA, c) 표준 분자 생물학 방법, 예컨대 스플라이스-오버랩-익스텐션 PC에 의해서 생성되고, (N-에서 C-말단 순서의) 분비 리더 서열, 상기에 기술된 항-CD3 항체의 VL, 인간 IgG1 cDNA의 불변 CH1 도메인으로 제조된 융합 단백질을 인코딩하는 융합 cDNA. 하나의 변형을 사용한 인간 또는 인간화 IgG1 항체의 생산을 위한 상기에 기술된 방법을 사용한 포유동물 세포의 공동-형질감염 및 항체 생산 및 정제: 항체의 정제를 위해서, 제1 포획 단계는 단백질 A를 사용하지 않고 수행하지만, 대신에 인간 카파 경쇄 불변 영역, 예컨대 카페셀렉트(지이 헬쓰케어 라이프 사이언스)에 결합하는 수지로 충전된 친화도 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 수행된다. 또한, 이황화물을 포함시켜 안정성 및 수율을 증가시킬 수 있고, 뿐만 아니라 추가 잔기를 포함시켜 이온 다리를 형성하여 헤테로이량 체화 수율을 증가시킬 수 있다(유럽 특허 제EP 1870459A1호).

[0455]

BCMAxCD3 이중특이적 항체 백터의 생성을 위해서, IgG1 유도된 이중특이적 분자는 2개의 상이한 항원 결정인자 CD3 및 BCMA에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 결합 모이어티로 이루어진다. 항원 결합 모이어티는 각각 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄로 구성된 Fab 단편이었다. Fab 단편 중 적어도 하나는 "Crossfab" 단편이었고, 여기서 Fab 중쇄 및 경쇄의 불변 도메인은 교환되었다. Fab 단편 내에서 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 교환은 상이한 특이성의 Fab 단편이 동일한 도메인 배열을 갖지 않고, 결과적으로 경쇄를 서로 교환시키지 않는 것을 보장한다. 이중특이적 분자 설계는 CD3에 대해서 1가이고, BCMA에 대해서 2가였는데, 여기서 하나의 Fab 단편은 내부 CrossFab(2+1)의 N-말단에 융합된다. 이중특이적 분자는 더 긴 반감기를 갖기 위해서 Fc 부분을 함유하였다. 작제물의 개략적인 표현을 도 1 내지 3에 제공하며; 바람직한 작제물의 표 2A에 제시되어 있다. 중합체계 용액을 사용하여 혼탁물 중에서 성장하는 HEK293 EBNA 세포를 포유동물 발현 백터로 형질감염시킴으로써 분자를 생산하였다. 2+1 CrossFab-IgG 작제물의 제조를 위해, 1:2:1:1 비율(백터 Fc(노브)": "백터 경쇄": "백터 경쇄 CrossFab": "백터 중쇄-CrossFab)로 상응하는 발현 백터로 세포를 형질감염시켰다.

[0456]

실시예 4.3: 비교를 위한 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생성

[0457]

BCMA50-sc(Fv)₂(BCMA50-BiTE®라고도 공지됨)의 생성, 사용된 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 및 아미노산 서열은 국제 특허 공개 제WO2013072406호 및 제WO2013072415호에 따랐다.

[0458]

실시예 5: 전하 변종을 갖는 항-BCMA/항-CD3 Fc-함유 (2+1) T 세포 이중특이적 항체의 생산 및 정제

[0459]

항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체를 참고로 포함된 국제 특허 공개 제WO2014/122144호에 따라서 생산 및 정제하였다.

[0460]

이중특이적 항체의 생산을 위해서, 중합체계 용액을 사용하여, 혼탁물 중에서 성장된 HEK293-EBNA 세포에서 각각의 포유동물 발현 백터의 일시적-공동-형질 감염에 의해서 이중특이적 항체를 발현시켰다. 형질감염 하루 전에 HEK293-EBNA 세포를 6mM의 L-글루타민이 보충된 Ex-세포 배지 중에 1.5 미오 생존 가능한 세포/ml로 시딩하였다. 최종 생산 부피 ml마다 2.0 미오 생존가능 세포를 원심분리하였다(210 x g로 5분). 상청액을 흡인시키고, 세포를 100μl의 CD CHO 배지 중에 재현탁시켰다. 100μl의 CD CHO 배지 중에서 1μg의 DNA(비율 중쇄: 변형된 중쇄: 경쇄: 변형된 경쇄 = 1:1:2:1)를 혼합함으로써 최종 생산 부피 ml마다에 대한 DNA를 제조하였다. 0.27μl의 중합체계 용액(1mg/ml)을 첨가한 후 혼합물을 15초 동안 볼텍싱시켰고, 실온에서 10분 동안 정치시켰다. 10분 후, 혼탁된 세포 및 DNA/ 중합체계 용액 혼합물을 합치고, 이어서 적절한 용기로 옮기고, 이것을 진탕 장치에 넣었다(37°C, 5% CO₂). 3시간의 배양 시간 후, 6mM의 L-글루타민, 1.25mM의 발프로산 및 12.5%의 펩소이(Pepsoy)(50g/L)가 보충된 800μl의 Ex-세포 배지를 최종 생산 부피 1ml마다 첨가하였다. 24시간 후, 70μl의 공급 용액을 최종 생산 부피 1ml마다 첨가하였다. 7일 후 또는 세포 생존력이 70% 이하인 경우, 원심분리 및 멸균 여과에 의해서 세포를 상청액으로부터 분리하였다. 항체를 친화도 단계 및 양이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피인 1회 또는 2회 폴리싱 단계에 의해서 정제하였다. 필요할 경우, 추가 폴리싱 단계를 사용하였다.

[0461]

친화도 단계를 위해서, 6 CV 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, pH 7.5로 평형화된 단백질 A 칼럼(하이트랩 단백질 A FF, 5ml, 지이 헬쓰케어) 상에 상청액을 적재하였다. 동일한 완충제로서의 세척 단계 후에, 20mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, 100mM 글리신, pH 3.0로의 단계적 용리로 칼럼으로부터 항체를 용리시켰다. 목적하는 항체를 갖는 분획을 즉시 0.5M 인산나트륨, pH 8.0(1:10)으로 중화시키고, 풀링시키고, 원심분리에 의해서 농축시켰다. 농축물을 멸균 여과하고, 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해서

추가로 처리하였다.

- [0462] 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 위해서, 농축된 단백질을 친화도 단계에 대해서 사용된 용리 완충제를 사용하여 1:10으로 회석하고, 양이온 교환 칼럼 상에 적재하였다(포로스(Poros) 50 HS, 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)). 각각 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, pH 5.0 및 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, 100 mM 염화나트륨 pH 5.0의 평형 완충제 및 세척 완충제 각각으로의 2회의 세척 단계 후에 단백질을 20mM 인산나트륨, 20mM 구연산나트륨, 20mM 트리스, 100mM 염화나트륨 pH 8.5를 사용한 구배를 사용하여 용리시켰다. 목적하는 항체를 함유한 분획은 풀링시키고, 원심분리에 대해서 농축시키고, 멸균 여과하고, 추가 크기 배제 단계로 처리하였다.
- [0463] 크기 배제 단계를 위해서, 농축된 단백질을 제형 완충제로서 트원20의 존재 또는 부재 하의 XK16/60 하이로드 슈퍼텍스 200 칼럼(지이 헬쓰케어) 및 20mM 히스티딘, 140mM 염화나트륨, pH 6.0에 주입하였다. 단량체를 함유한 분획은 풀링시키고, 원심분리에 대해서 농축시키고, 멸균 바이알로 멸균 여과하였다.
- [0464] 항체 0.1% 용액의 흡광도의 이론적인 값을 사용하여, 280nm에서의 흡광도의 측정에 대해서 항체 농도의 측정을 수행하였다. 이 값은 아미노산 서열을 기반으로 하며, GPM AW 소프트웨어(라이트하우스 데이터에 대해서 계산되었다.
- [0465] 25mM 인산칼륨, 125mM 여화나트륨, 200mM L-아르기닌 1염화수소염, 0.02%(w/v) 나트륨 아자이드, pH 6.7 완충제 중에서 CE-SDS(캘리퍼 랩칩 GXII 시스템(캘리퍼 라이프 사이언시스)) 각각 HPLC(티에스겔 G3000 SW XL 분석용 크기 배제 칼럼(토소))에 대해서 최종 단백질 제제의 순도 및 단량체 함량을 측정하였다.
- [0466] 최종 단백질 제제의 분자량을 검증하고, 분자 최종 단백질 용액의 균질 제제를 확인하기 위해서, 액체 크로마토그래피-질량 분광계(LC-MS)를 사용하였다. 탈글리코실화 단계를 먼저 수행하였다. 탄수화물에 대해서 도입된 불균질성을 제거하기 위해서, 작제물을 PNGaseF(프로자임)로 처리하였다. 따라서 0.5mg/ml의 농도로 20 μ g의 단백질에 2 μ l의 2M 트리스를 첨가함으로써 단백질 용액의 pH를 pH 7.0으로 조정하였다. 0.8 μ g의 PNGaseF를 첨가하였고, 12시간 동안 37°C에서 배양시켰다. 이어서 LC-MS 온라인 검출을 수행하였다. TOF 6441 질량 분광계(애질런트)에 커플링된 애질런트 HPLC 1200 상에서 LC-MS 방법을 수행하였다. 마카레이 나겔 폴리스테렌 칼럼; RP1000-8(8 μ m 입자 크기, 4.6x250mm; 카탈로그 번호 719510) 상에서 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 용리액 A는 물 중의 5% 아세토나이트릴 및 0.05%(v/v) 품산이었고, 용리액 B는 95% 아세토나이트릴, 5% 물 및 0.05% 품산이었다. 유량은 1ml/분이었고, 분리는 40°C에서 수행하였고, 상기에 기술된 바와 같은 처리로 6 μ g(15 μ l)의 단백질 샘플을 수득하였다.
- [0467] 첫 4분 동안 용리물을 폐기물로 보내어 염 오염으로부터 질량 분광계를 보호하였다. ESI-공급원은 121/분의 무수 기체 유동, 350°C의 온도 및 60psi의 네블라이저 압력으로 구동되었다. 양성 이온 모드를 사용하여 380V의 단편화 전압 및 700 내지 3200m/z의 질량 범위를 사용하여 MS 스펙트럼을 획득하였다. 4 내지 17분에서 장비 소프트웨어에 대해서 MS 데이터를 획득하였다.
- [0468] 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 도 10은 83A10-TCB 및 83A10-TCBcv 항체에 대한 상이한 정제 방법 후 최종 단백질 제제의 CE-SDS(비-환원) 그래프를 도시한다. 83A10-TCB 항체에 적용된 단백질 A(PA) 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 정제 단계는 30% 미만의 순도 및 82.8%의 단량체 함량(A)을 유발하였다. 양이온 교환 크로마토그래피(cIEX) 및 최종 크기 배제 크로마토그래피(re-SEC) 단계를 비롯한 추가 정제 단계를 (A)에서 최종 단백질 제제에 적용한 경우, 순도는 93.4%로 증가되었지만, 단량체 함량이 동일하게 유지되었고, 수율은 0.42mg/L로 상당히 감소되었다. 그러나, 특이적 전하 변형을 83A10 항-BCMA Fab CL-CH1, 즉 83A10-TCBcv 항체에 적용한 경우, 95.3%의 순도, 100%의 단량체 함량 및 3.3mg/L까지의 수율에 대해서 예증된 바와 같이, 추가 re-SEC 정제 단계를 포함함에도 불구하고 7.9배 더 낮은 수율 및 17.2% 더 낮은 단량체 함량을 갖는 (B)와 비교하여 PA + cIEX + SEC 정제 단계가 (C)에 적용된 경우에도 TCB 분자의 우수한 생산/정제 프로파일이 이미 관찰될 수 있었다.
- [0469] 이어서 83A10-TCB 대 83A10-TCBcv 항체의 생산/정제 프로파일을 비교하기 위한 헤드-투-헤드 생산을 실시를 수행하여 항체에 적용된 CL-CH1 전하 변형의 이점을 추가로 평가하였다. 83A10-TCB 및 83A10-TCBcv 분자는 도 2A에 기술된 바와 같은 분자 포맷 둘 모두이다. 도 11에 도시된 바와 같이, 83A10-TCB 및 83A10-TCBcv 항체의 특성을 나란히 평가하였고, 각각의 정제 단계 1) PA 친화도 크로마토그래피 단독(A, B), 2) PA 친화도 크로마토그래피 이어서 SEC(C, D) 및 3) PA 친화도 크로마토그래피 이어서 SEC 이어서 cIEX 및 re-SEC(E, F) 이후에 비교하였다. 83A10-TCB 및 83A10-TCBcv 항체에 대한 각각의 정제 방법 후 최종 단백질 용액의 CE-SDS(비-환원) 그래

프가 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 도 11에 제시되어 있다. 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 도 11A 및 도 11B에 도시된 바와 같이, TCB 항체에 전하 변종을 적용하는 것의 개선점은 PA 친화도 크로마토그래피 단독에 의한 정제 후에 이미 관찰되었다. 이러한 헤드-투-헤드 연구에서, 83A10-TCB 항체에 적용된 PA 친화도 크로마토그래피 정제 단계는 61.3%의 순도, 26.2mg/L 및 63.7%의 단량체 함량(11A)을 유발하였다. 비교하면, 83A10-TCBcv 항체를 PA 친화도 크로마토그래피에 의해서 정제한 경우, 81.0%의 더 양호한 순도, 51.5 mg/L의 더 양호한 수율 및 68.2%의 단량체 함량(11B)으로 모든 특성이 개선되었다. 유럽 특허 제EP14179705호의 도 12A 및 12B(참고로 포함됨)에서 인지되는 바와 같이 추가 SEC 정제 단계를 최종 단백질 제제에 적용하는 경우, 83A10-TCB는 각각 91.0% 및 83.9%까지의 개선된 순도 및 단량체 함량 및 10.3mg/L(D)의 수율을 갖는 83A10-TCBcv와 비교할 때 69.5%의 순도, 14.1mg/L의 수율 및 74.7%의 단량체 함량을 얻었다. 수율은 이러한 특정 실험에서 83A10-TCBcv에 대한 것이 83A10-TCB에 대한 것보다 약간 낮았지만(즉, 27% 낮음), 올바른 분자의 백분율은 LC-MS에 의해서 측정되는 경우 각각 90% 대 40 내지 60%로 83A10-TCB에 대한 것보다 83A10-TCBcv에 대한 것이 훨씬 더 양호하였다. 세 번째 헤드-투-헤드 비교에서, 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 도 11C 및 도 11D로부터의 83A10-TCB 및 83A10-TCBcv 최종 단백질 제제를 또 다른 정제 뱃치(동일한 생산)로부터의 각각의 최종 단백질 제제 대략 1L(동일부피)와 함께 풀링시켰고, 그 다음 PA 친화도 크로마토그래피 정제 단계 만을 적용하였다. 이어서 풀링된 단백질 제제를 cIEX 및 SEC 정제 방법에 의해서 추가로 정제하였다. 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 도 11E 및 도 11F에 도시된 바와 같이, 전하 변종을 사용한 TCB 항체의 생산/정제 프로파일의 개선은 전하 변종이 없는 TCB 항체와 비교할 때 일관되게 관찰되었다. 정제 방법의 몇몇 단계(즉 PA +/- SEC + cIEX + SEC)를 사용하여 83A10-TCB 항체를 정제한 후, 단지 43.1% 순도에 도달되었고, 98.3%의 단량체 함량이 달성되었지만, 수율의 손실은 0.43mg/L로 감소되었다. LC-MS에 의해서 측정된 바와 같은 올바른 분자의 백분율은 60 내지 70%로 여전히 불량하였다. 마지막으로, 최종 단백질 제제의 품질은 시험관내 용도를 위해서 허용 가능하지 않았다. 상당히 상반되게, 동일한 연대(chronology)를 갖는 동일한 다수의 정제 단계를 83A10-TCBcv 항체에 적용한 경우, 96.2%의 순도 및 98.9%의 단량체 함량에 도달되었고, 뿐만 아니라 LC-MS에 의해서 측정되는 경우 95%의 올바른 분자에 도달되었다. 그러나 이 수율은 또한 cIEX 정제 단계 후에 0.64 mg/L로 상당히 감소되었다. 이 결과는, 83A10-TCBcv 항체를 사용하면 더 양호한 순도, 더 높은 단량체 함량, 더 높은 올바른 분자의 백분율 및 더 양호한 수율이 단지 2회의 표준 정제 단계, 즉 PA 친화도 크로마토그래피 및 SEC 이후에 달성될 수 있지만(유럽 특허 제EP14179705호의 도 11d), 이러한 특성은 83A10-TCB의 경우에는 추가 정제 단계를 적용한 경우에도 달성될 수 없음을 나타낸다(유럽 특허 제EP14179705호의 도 11e).

[0470] 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 표 12는 PA 정제 단계 이후의 83A10-TCVcv와 비교된 83A10-TCB의 특성을 요약한다. 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 표 13은 PA 및 SEC 정제 단계 이후의 83A10-TCVcv와 비교된 83A10-TCB의 특성을 요약한다. 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 표 14는 PA 및 SEC + PA 단독 이어서 cIEX 및 re-SEC 정제 단계 이후의 83A10-TCVcv와 비교된 83A10-TCB의 특성을 요약한다. 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 표 12 내지 표 14의 경우, 볼드체의 값은 83A10-TCB 대 83A10-TCVcv를 비교할 때 우수한 특성을 강조한다. 대표적일 수는 없는 하나의 예외(즉, 수율, 각각 양, 유럽 특허 제EP14179705호(참고로 포함됨)의 표 13 참고)와 함께, 3개의 헤드-투-헤드 비교 실험으로부터의 모든 생산/정제 파라미터 및 값은 83A10-TCB와 비교할 때 83A10-TCBcv에 대해서 우수하였다. 전체 결과는, TCB 항체에 CL-CH1 전하 변형을 적용하는 경우 생산/정제 특징의 이점이 달성될 수 있고, 단지 2회의 정제 단계(즉, PA 친화도 크로마토그래피 및 SEC)가 매우 발전 가능한 특성을 갖는 이미 매우 높은 품질의 단백질 제제를 달성하는 데 필요하였음을 명백히 예증하였다. 83A10-TCBcv의 개선된 생산/정제 특성을 기반으로, 21-TCBcv, 22-TCBcv, 27-TCBcv, 33-TCBcv, 39-TCBcv 및 42-TCBcv를 83A10-TCBcv와 유사한 방식으로, 전하 변종을 갖도록 생성하였다.

[0471] [표 6: 단백질 A 친화도 크로마토그래피 정제 단계 이후의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생산/정제 프로파일]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
순도 (%)	61.3	81.0
수율 (mg/L)	26.2	51.5
양 (mg)	24.3	50.2
단량체 (%)	63.7	68.2
LC-MS에 의한 올바른 분자 (%)	검출하지 않음	검출하지 않음

[0472]

[표 7: 단백질 A 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피 정제 단계 이후의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생산/정제 프로파일]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
순도 (%)	69.5	91.0
수율 (mg/L)	14.1	10.3
양 (mg)	13.1	10.0
단량체 (%)	74.7	83.9
LC-MS에 의한 올바른 분자 (%)	40-60	90

[0474]

[표 8: 1.a) 단백질 A 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피 및 1.b) 함께 풀링된 단백질 A 친화도 크로마토그래피 단독, 이어서 2) 양이온 교환 크로마토그래피 및 3) 최종 크기 배제 크로마토그래피 정제 단계 이후의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 생산/정제 프로파일]

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
순도 (%)	43.1	96.2
수율 (mg/L)	0.43	0.64
양 (mg)	0.73	1.27
단량체 (%)	98.3	98.9
LC-MS에 의한 올바른 분자 (%)	60-70%	>95%

[0476]

[0477] 실시예 6: BCMA-양성 다발성 골수종 세포주에 대한 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체의 결합(유세포 분석법)

[0478] 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv, 83A10-TCBcv)를 BCMA-발현 H929, L363 및 RPMI-8226 세포 상의 인간 BCMA에 대한 결합에 대해서 유세포 분석법에 의해서 분석하였다. MKN45(BCMA를 발현시키지 않는 인간 위 선암 세포주)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 간략하면, 배양된 세포를 수확하고, 계수하고, 세포 생존력을 비셀을 사용하여 평가하였다. 이어서 생존 가능한 세포를 BSA-함유 FACS 스테인 버퍼(Stain Buffer)(비디 바이오사이언시스) 중에서 ml당 2×10^6 개의 세포로 조정하였다. $100\mu\text{l}$ 의 이러한 세포 혼탁물을 등근-바닥 96-홈 판의 각각의 홈에 분취하고, $30\mu\text{l}$ 의 항-BCMA 항체 또는 상응하는 IgG 대조군과 함께 30분 동안 4°C에서 배양되었다. 모든 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(및 TCB 대조군)를 적정하고, 1 내지 300nM의 최종 농도 범위에서 분석하였다. 이어서 세포를 원심분리(5분, $350 \times g$)하고, $120\mu\text{l}/\text{홈}$ 의 FACS 스테인 버퍼(비디 바이오사이언시스)로 세척하고, 재현탁시키고, 추가 30분 동안 4°C에서 형광색소(fluorochrome)-접합된 PE-접합된 어피니퓨어(AffiniPure) F(ab')2 단편 염소 항-인간 IgG Fc 단편 스페시픽(Specific)(잭슨 이뮤노 리서치 랩(Jackson

Immuno Research Lab); 109-116-170)과 함께 배양시켰다. 이어서 세포를 스테인 버퍼(비디 바이오사이언시스)로 2회 세척하고, 흄당 $100\mu\text{l}$ 의 BD 고정 완충제(#비디 바이오사이언시스, 554655)를 사용하여 4°C에서 20분 동안 고정시키고, $120\mu\text{l}$ FACS 완충제 중에 재현탁시키고, BD FACS 칸토II를 사용하여 분석하였다. 적용 가능한 경우, EC50을 프리즘 그라프패드(Prism GraphPad)(미국 캘리포니아주 라호야 소재)를 사용하여 계산하였고, H929 세포, L363 세포 및 RPMI-8226 세포에 대한 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체의 결합에 대한 최대 결합의 50%에 도달하는 데 요구되는 항체 농도를 나타내는 EC50 값을 각각 표 8, 표 9, 및 표 10에 요약한다. 별표는 프리즘 소프트웨어에 의해서 외삽되고 계산된 예측된 EC50 값을 나타낸다. L363 세포에 대한 21-TCBcv의 결합 및 RPMI-8226 세포에 대한 22-TCBcv의 결합에 대한 EC50 값은 예측될 수 없었다.

[0479] [표 8: H929 다발성 골수종 세포에 대한 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체의 결합에 대한 EC50 값]

예측된 EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	12.0	11.0	7.9	13.6
μg/ml	1.725	1.589	1.142	1.956

[0480] [표 9: L363 다발성 골수종 세포에 대한 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체의 결합에 대한 EC50 값]

예측된 EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	17.4	/	30.0	3.8
μg/ml	2.507	/	4.328	0.5534

[0481] [표 10: RPMI-8226 다발성 골수종 세포에 대한 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체의 결합에 대한 EC50 값]

예측된 EC50	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
nM	~ 188428*	6.8	/	13.2
μg/ml	~ 27151*	0.9817	/	1.907

[0482] [0483] [표 10: RPMI-8226 다발성 골수종 세포에 대한 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체의 결합에 대한 EC50 값]

[0484] [0485] 실시예 7: CD3-양성 T 세포 및 BCMA-양성 다발성 골수종 세포주에 대한 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 결합 시 활성화된 T 세포로부터의 사이토카인 생산(사이토카인 방출 검정법 CBA 분석)

[0486] 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체를 인간 BCMA-발현 인간 골수종 세포(RPMI-8226, JJN-3)의 존재 또는 부재 하에서 T-세포 매개된 사이토카인 생산 신생을 유발하는 이의 능력에 대해서 분석한다. 간략하면, 인간 PBMC를 버피 코트(Buffy Coats)로부터 분리하고, 흄당 0.3×10^6 개 세포를 등근-바닥 96-홈 판에 플레이팅한다. 대안적으로, 건강한 공여자로부터의 $280\mu\text{l}$ 의 전혈을 각각의 깊은-홈 96-홈 판에 플레이팅한다. BCMA-양성 종양 표적 세포를 첨가하여 10:1의 최종 E:T-비를 수득한다. 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체 및 대조군을 0.1pM 내지 10nM의 최종 농도를 위해서 첨가한다. 37°C, 5% CO_2 에서 24시간까지의 배양 후, 검정 플레이트를 5분 동안 350 x g로 원심분리하고, 후속 분석을 위해서 상청액을 새로운 깊은-홈 96-홈 판으로 옮긴다. 인간 Th1/Th2 사이토카인 키트 II(BD #551809) 또한 하기 CBA 플렉스 세트의 조합을 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 FACS 칸토II 상에서 CBA 분석을 수행하였다: 인간 그랜자임 B(BD #560304), 인간 IFN-γ 플렉스 세트(BD #558269), 인간 TNF-α 플렉스 세트(BD #558273), 인간 IL-10 플렉스 세트(BD #558274), 인간 IL-6 플렉스 세트(BD #558276), 인간 IL-4 플렉스 세트(BD #558272), 인간 IL-2 플렉스 세트(BD #558270). 표 13은 83A10-TCBcv가 사이토카인 생산 및 세린 프로테아제 그랜자임 B, 세포독성 T-세포 기능의 마커에서 농도-의존적인 증가를 유발하였음을 나타낸다. 표 11은 EC50 값 및 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체 농도당 분비된 사이토카인/프로테아제의 양을 나타낸다.

[0487] [표 11: RPMI-8226 세포의 존재 하에서 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 사이토카인 및

프로테아제의 분비]

사이토카인 / 프로테아제	EC50 (nM)	83A10-TCBcv 농도(nM)						
		0.00064	0.0032	0.016	0.08	0.4	2	10
TNF- α (pg/mL)	0.52	-6.95	-6.49	-0.65	46.72	161.24	315.11	371.47
IL-10 (pg/mL)	0.30	-9.21	1.95	25.17	125.82	401.42	602.64	680.05
그랜자임 B (pg/mL)	0.34	220.54	331.55	889.13	5855.02	15862.84	21270.43	27120.52

[0488] [0489] 실시예 8: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 BCMA-고 발현 H929 골수종 세포의 재지향된 T-세포 세포독성(비색 LDH 방출 검정법)

[0490] 세포 상의 BCMA에 대한 항원 결합 모이어티의 결합을 통해서 작제물이 가교결합하였을 때 BCMA 고-발현 MM 세포에서 T 세포-매개된 세포자멸률을 유발하는 이의 잠재력에 대해서 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체를 평가하였다. 간략하면, 인간 BCMA 고-발현 H929 다발성 골수종 표적 세포를 세포 해리 완충제를 사용하여 수화하고, 세척하고, 10% 우태아 혈청이 보충된 RPMI(인비트로젠) 중에 재현탁시켰다. 대략, 흄당 30,000개의 세포를 등근-바닥 96-홈 판에 플레이팅하고, 작제물의 각각의 희석물을 목적하는 최종 농도를 위해서 첨가하였고(3회); 최종 농도는 0.1pM 내지 10nM 범위였다. 적절한 비교를 위해서, 모든 TCB 작제물 및 대조군을 동일한 몰 농도로 조정하였다. 인간 PBMC(효과기 세포)를 흄에 첨가하여 1개의 종양 표적 세포에 대해서 대략 3 내지 5개의 T 세포의 E:T비에 상응하는, 10:1의 최종 E:T비를 얻었다. 음성 대조군 군은 효과기 또는 표적 세포 단독에 대해서 대표되었다. 정규화를 위해서, 표적 세포를 세포사를 유발하는 1% 트리톤 X-100과 함께 배양시킴으로써 H929MM 표적 세포의 최대 용해(=100%)를 측정하였다. 최소 용해(=0%)는 효과기 세포 단독과 함께, 즉 어느 T 세포 이중특이적 항체 없이 공동-배양된 표적 세포에 대해서 대표되었다. 37°C, 5% CO₂에서 20 내지 24시간 또는 48시간 배양 후, 이어서 상청액 내에서의 세포자멸성/괴사성 MM 표적 세포로부터의 LDH 방출을 LDH 검출 키트(로체 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))를 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 측정하였다. LDH 방출 백분율을 농도-반응 곡선으로 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 농도에 대해서 플로팅하였다. EC50 값을 프리즘 소프트웨어(그래프패드)를 사용하여 측정하였고, 최대 LDH 방출의 50%를 유발하는 TCB 항체 농도로서 결정하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 모든 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(21-, 22-, 42-, 및 83A10-TCBcv)는 LDH 방출에 대해서 측정되는 바와 같이 BCMA-양성 H929 골수종 세포의 농도-의존적인 사멸을 유발하였다. H929 세포의 용해는 특이적이었는데, 그 이유는 BCMA-양성 표적 세포에 결합하지 않고, T 세포 상의 CD3에만 결합하는 대조군-TCB 항체는 시험된 최고 농도에서도 LDH 방출을 유발시하지 않았기 때문이다. 표 12는 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 대해서 유발된 BCMA 고-발현 H929 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값을 요약한다.

[0491] [표 12: 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 H929 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값]

항-BCMA/항-CD3 TCB 항체	EC50 (pM)					
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5	공여자 6
21-TCBcv	97.1	/	42.1	53.9	38.7	/
22-TCBcv	53.2	/	42.2	23.2	28.9	/
42-TCBcv	9.7	/	11.7	7.2	6.8	/
83A10-TCBcv	3.9	/	8.5	5.0	4.3	1.5

[0492] [0493] 실시예 9: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 BCMA-중/저 발현 L363 골수종 세포의 재지향된 T-세포 세포독성(LDH 방출 검정법)

[0494] 세포 상의 BCMA에 대한 항원 결합 모이어티의 결합을 통해서 작제물이 가교결합하였을 때 BCMA 중/저-발현 MM 세포에서 T 세포-매개된 아포토시스를 유발하는 이의 능력에 대해서 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체를 또한 평가하였다. 간략하게, 인간 BCMA 중/저-발현 L363 다발성 골수종 표적 세포를 세포 해리 완충제를 사용하여 수화하고, 세척하고, 10% 우태아 혈청이 보충된 RPMI(인비트로젠) 중에 재현탁시킨다. 대략, 흄당 30,000개의 세포를 등근-바닥 96-홈 판에 플레이팅하고, 작제물의 각각의 희석물을 목적하는 최종 농도를 위해서 첨가하고(3회); 최종 농

도는 0.1pM 내지 10nM 범위이다. 적절한 비교를 위해서, 모든 TCB 작제물 및 대조군을 동일한 몰 농도로 조정한다. 인간 PBMC(효과기 세포)를 흠에 첨가하여 1개의 종양 표적 세포에 대해서 대략 3 내지 5개의 T 세포의 E:T 비에 상응하는, 10:1의 최종 E:T비를 얻었다. 음성 대조군 군은 효과기 또는 표적 세포 단독에 의해서 대표되었다. 정규화를 위해서, 표적 세포를 세포사를 유발하는 1% 트리톤 X-100과 함께 배양시킴으로써 MM 표적 세포의 최대 용해(=100%)를 측정한다. 최소 용해(=0%)는 효과기 세포 단독과 함께, 즉 어느 T 세포 이중특이적 항체 없이 공동-배양된 표적 세포에 의해서 대표되었다. 37°C, 5% CO₂에서 20 내지 24시간 배양 후, 이어서 상청액 내에서의 세포자멸성/괴사성 MM 표적 세포로부터의 LDH 방출을 LDH 검출 키트(로제 어플라이드 사이언스)를 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 측정하였다. LDH 방출 백분율을 농도-반응 곡선으로 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 농도에 대해서 플롯팅하였다. EC50 값을 프리즘 소프트웨어(그래프패드)를 사용하여 측정하였고, 최대 LDH 방출의 50%를 유발하는 TCB 항체 농도로서 결정하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 모든 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(21-, 22-, 42-, 및 83A10-TCBcv)는 LDH 방출에 의해서 측정되는 바와 같이 BCMA-양성 L363 골수종 세포의 농도-의존적인 사멸을 유발하였다. L363 세포의 용해는 특이적이었는데, 그 이유는 BCMA-양성 표적 세포에 결합하지 않고, T 세포 상의 CD3에만 결합하는 대조군-TCB 항체는 시험된 최고 농도에서도 LDH 방출을 유발하지 않았기 때문이다. 표 13은 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 BCMA 중/저-발현 L363 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값을 요약한다.

[0495] [표 13: 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 L363 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값]

항-BCMA/항-CD3 TCB 항체	EC50 (pM)				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
21-TCBcv	83.6	38.4	18.9	19.1	46.4
22-TCBcv	97.5	27.7	16.5	14.6	56.0
42-TCBcv	15.5	16.7	5.2	2.2	10.6
83A10-TCBcv	16.8	47.8	28.4	12.6	39.0

[0496] [0497] 실시예 10: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 BCMA-중/저 발현 RPMI-8226 골수종 세포의 재지향된 T-세포 세포독성(LDH 방출 검정법)

[0498] 세포 상의 BCMA에 대한 항원 결합 모이어티의 결합을 통해서 작제물이 가교결합하였을 때 BCMA 중/저-발현MM 세포에서 T 세포-매개된 아포토시스를 유발하는 이의 능력에 대해서 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체를 평가하였다. 간략하면, 인간 BCMA 중/저-발현 L363 다발성 골수종 표적 세포를 세포 해리 완충제를 사용하여 수화하고, 세척하고, 10% 우태아 혈청이 보충된 RPMI(인비트로젠) 중에 재현탁시킨다. 대략, 흠당 30,000개의 세포를 등근-바닥 96-흡 판에 플레이팅하고, 작제물의 각각의 희석물을 목적하는 최종 농도를 위해서 첨가하고(3회); 최종 농도는 0.1pM 내지 10nM 범위이다. 적절한 비교를 위해서, 모든 TCB 작제물 및 대조군을 동일한 몰 농도로 조정한다. 인간 PBMC(효과기 세포)를 흠에 첨가하여 1개의 종양 표적 세포에 대해서 대략 3 내지 5개의 T 세포의 E:T비에 상응하는, 10:1의 최종 E:T비를 얻었다. 음성 대조군 군은 효과기 또는 표적 세포 단독에 의해서 대표되었다. 정규화를 위해서, 표적 세포를 세포사를 유발하는 1% 트리톤 X-100과 함께 배양시킴으로써 MM 표적 세포의 최대 용해(=100%)를 측정하였다. 최소 용해(=0%)는 효과기 세포 단독과 함께, 즉 어느 T 세포 이중특이적 항체 없이 공동-배양된 표적 세포에 의해서 대표되었다. 37°C, 5% CO₂에서 20 내지 24시간 배양 후, 이어서 상청액 내에서의 세포자멸성/괴사성 MM 표적 세포로부터의 LDH 방출을 LDH 검출 키트(로제 어플라이드 사이언스)를 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 측정하였다. LDH 방출 백분율을 농도-반응 곡선으로 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 농도에 대해서 플롯팅하였다. EC50 값을 프리즘 소프트웨어(그래프패드)를 사용하여 측정하였고, 최대 LDH 방출의 50%를 유발하는 TCB 항체 농도로서 결정하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, 모든 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(21-, 22-, 42-, 및 83A10-TCBcv)는 LDH 방출에 의해서 측정되는 바와 같이 BCMA-양성 RPMI-8226 골수종 세포의 농도-의존적인 사멸을 유발하였다. RPMI-8226 세포의 용해는 특이적이었는데, 그 이유는 BCMA-양성 표적 세포에 결합하지 않고, T 세포 상의 CD3에만 결합하는 대조군-TCB 항체는 시험된 최고 농도에서도 LDH 방출을 유발하지 않았기 때문이다. 표 13은 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유도된 BCMA 중/저-발현 RPMI-8226 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값을 요약한다.

[0499]

[표 13: 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유도된 RPMI-8226 세포의 재지향된 T-세포 사멸에 대한 EC50 값]

항-BCMA/항-CD3 TCB 항체	EC50 (pM)				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
21-TCBcv	/	41.3	8.8	4.0	8.4
22-TCBcv	/	47.6	7.6	3.2	5.5
42-TCBcv	/	382.8	18.7	3.5	1.5
83A10-TCBcv	/	620.5	229.3	35.0	64.9

[0500]

[0501] 실시예 11: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 BCMA-/저 발현 JJN-3 골수종 세포의 재지향된 T-세포 세포독성(유세포 분석법 및 LDH 방출)

[0502]

세포 상의 BCMA에 대한 항원 결합 모이어티의 결합을 통해서 작제물이 가교결합하였을 때 BCMA 저-발현MM 세포에서 T 세포-매개된 아포토시스를 유발하는 이의 능력에 대해서 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체를 평가하였다. 간략하면, 인간 BCMA 저-발현 JJN-3 다발성 골수종 표적 세포를 세포 해리 완충제를 사용하여 수화하고, 세척하고, 10% 우테아 혈청이 보충된 RPMI(인비트로젠) 중에 재현탁시킨다. 대략, 흄당 30,000개의 세포를 등근-바닥 96-홈 판에 플레이팅하고, 작제물의 각각의 희석물을 목적하는 최종 농도를 위해서 첨가하고(3회); 최종 농도는 0.1pM 내지 10nM 범위이다. 적절한 비교를 위해서, 모든 TCB 작제물 및 대조군을 동일한 물 농도로 조정한다. 인간 PBMC(효과기 세포)를 흄에 첨가하여 1개의 종양 표적 세포에 대해서 대략 3 내지 5개의 T 세포의 E:T비에 상응하는, 10:1의 최종 E:T비를 얻었다. 음성 대조군 군은 효과기 또는 표적 세포 단독에 대해서 대표되었다. 정규화를 위해서, 표적 세포를 세포사를 유발하는 1% 트리톤 X-100과 함께 배양시킴으로써 MM 표적 세포의 최대 용해(=100%)를 측정하였다. 최소 용해(=0%)는 효과기 세포 단독과 함께, 즉 어느 T 세포 이중특이적 항체 없이 공동-배양된 표적 세포에 대해서 대표되었다. i) 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양 후, 배양된 골수종 세포를 수집하고, 세척하고, 세포자멸성 골수종 세포의 측정을 위해서 형광색소-접합된 항체 및 아넥신-V로 염색하였다. 염색 패널은 CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/아넥신-V-PerCP-Cy5.5를 포함하였다. 사용된 형광색소-표지된 항체는 비디 바이오사이언시스(미국 산호세 소재) 및 칼텍 래보러토리즈(미국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)로부터 구입하였다. 다색 유세포 분석기 상에서 획득을 수행하였고, 소프트웨어(예를 들어, FACSDiva 소프트웨어를 구동하는 칸토II 장치 또는 셀퀘스트(Cel1QUEST) 소프트웨어를 사용하는 FACSCalibur 유세포 분석기)를 설치하였다. 페인트-A-게이트(Paint-A-Gate) PRO 프로그램(비디 바이오사이언시스)을 데이터 분석을 위해서 사용하였다. 아넥신-V를 JJN-3 세포 상에서 측정하고, 아넥신-v-양성 JJN-3 세포의 백분율을 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 농도에서 대해서 플로팅하였다. 주어진 TCB 농도에서 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치를 측정하고, 그것을 TCB가 없는 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치로부터 뺄셈하고; TCB가 없는 아넥신-V-음성 JJN-3 세포의 절대 계수치로 나눔으로써 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 특이적 농도에 대해서 유발되는 JJN-3 세포의 용해 백분율을 또한 결정하였다. 도 7은 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(22-, 42-, 및 83A10-TCBcv)가 유세포 분석법에 대해서 측정되는 바와 같이 BCMA 저-발현 JJN-3 골수종 세포의 농도-의존적인 사멸도 유발하였음을 나타낸다. JJN-3 세포의 용해는 특이적이었는데, 그 이유는 BCMA-양성 표적 세포에 결합하지 않고, T 세포 상의 CD3에만 결합하는 대조군-TCB 항체는 시험된 최고 농도에서도 아넥신-v 양성 JJN-3 세포 또는 JJN-3 용해를 유발하지 않았기 때문이다. 표 14 및 표 15는 각각 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 대해서 유발된 아넥신-v 양성 JJN-3 세포의 백분율 및 JJN-3 세포의 용해 백분율을 요약한다.

[0503]

37°C, 5% CO₂에서 20 내지 24시간 또는 48시간 배양 후 LDH의 검출을 또한 수행한다. 이어서 상청액 내에서의 세포자멸성/괴사성 JJN-3 MM 표적 세포로부터의 LDH 방출을 LDH 검출 키트(로세 어플라이드 사이언스)를 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 측정한다. LDH 방출 백분율을 농도-반응 곡선으로 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 농도에 대해서 플로팅한다. EC50 값을 프리즘 소프트웨어(그래프패드)를 사용하여 측정하였고, 최대 LDH 방출의 50%를 유발하는 TCB 항체 농도로서 결정한다.

[0504]

[표 14: 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 BCMA 저-발현 JJN-3 세포의 재지향된 T-세포 사멸: 아넥신-v 양성 세포의 백분율]

아넥신-Ⅴ 양성 JJN-3 세포 (%)	실험 1						
	항-BCMA/항-CD3 TCB 농도 (pM)						
10000	1000	100	10	1	0.1	0	
83A10-TCBcv	16.78	10.21	9.12	11.11	11.36	8.14	9.6
42-TCBcv	24.83	16.84	8.62	12.3	11.9	/	9.6
22-TCBcv	22.95	26.15	12.48	13.29	9.3	12.48	9.6
대조군-TCB	8.84	/	/	/	/	/	/

아넥신-Ⅴ 양성 JJN-3 세포 (%)	실험 2						
	항-BCMA/항-CD3 TCB 농도 (pM)						
10000	1000	100	10	1	0.1	0	
83A10-TCBcv	22.86	17.53	16.5	15.94	14.32	13.07	10.74
42-TCBcv	26.88	21.68	14.42	13.6	13.47	12.75	10.74
22-TCBcv	29.72	26.97	18.35	15.94	15	14.8	10.74
대조군-TCB	12.82	/	/	/	/	/	/

[표 15: 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 BCMA 저-발현 JJN-3 세포의 재지향된 T-세포 사멸: JJN-3 세포의 유행의 백분율]

JJN-3 세포의 용해 (%)	항-BCMA/항-CD3 TCB 농도 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	70.30	26.66	18.43	41.88	24.42	-14.45	0.00
42-TCBcv	92.92	84.02	41.87	38.96	40.29	/	0.00
22-TCBcv	88.02	90.54	56.26	73.56	-4.29	26.28	0.00
대조군-TCB	-6.55	/	/	/	/	/	/

JJN-3 세포의 용해 (%)	항-BCMA/항-CD3 TCB 농도 (pM)						
	10000	1000	100	10	1	0.1	0
83A10-TCBcv	51.18	25.30	20.12	39.58	-1.88	22.28	0.00
42-TCBcv	90.37	81.12	55.32	39.44	34.94	17.62	0.00
22-TCBcv	91.21	94.12	53.03	41.66	24.36	36.47	0.00
대조군-TCB	4.18	/	/	/	/	/	/

실시예 12: 다방성 골수종 환자로부터의 골수 골수종 혼진 세포 산에서의 BCMA 발현

관심 종양 표적을 발현시키는 인간 세포주는 T 세포의 존재 하에서 종양 세포 세포독성을 유발하는 TCB 항체 효력의 측정, EC50 값의 결정을 위해서 그리고 TCB 분자를 순위 매기는데 매우 유용하고 실용적인 툴이다. 그러나, 용이하게 접근 가능하고, 실용적임에도 불구하고, 인간 골수종 세포주는 분자 수준에서 상당한 이질성을 특징으로 하는 매우 복잡한 질환인 다발성 골수종의 이질성을 나타내지 않는 경고 사항을 갖는다. 또한, 골수종 세포주는 나머지 것보다 더 강하게 BCMA를 발현시키는 일부 세포(예를 들어, H929 세포대 RPMI-8226 세포)와 동일한 강도 및 밀도로 BCMA 수용체를 발현시키지 않고, 세포 수준에서의 이러한 이질성은 상이한 환자들 간에서 관찰될 수 있다. 다발성 골수종에서의 주요 오피니언 리더와의 학술 협력을 통해서, 환자 샘플에서의 BCMA 발현 및 밀도의 결정 및 임상 환자 샘플을 사용한 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체의 평가가 조사되고 있다. 지역 윤리 위원회 지침 및 헬싱키 선언에 따라서, 정보가 제공된 동의를 얻은 후 다발성 골수종 환자로부터 혈액 및 골수 흡입물을 수집한다.

a) 멀티파라미터 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 BCMA 발현(평균 형광 강도)

골수 골수종 세포 상에서의 BCMA 수용체의 발현을 측정하기 위해서, 새로 분리된 전체 골수 흡인물을 사용하여 면역표현형 분석(immunophenotypic analysis)을 수행하였다. 적혈구-용해된 K₃-EDTA(에틸렌다이아민테트라아세트산) 항응고 처리된 전체 골수 샘플을 면역표현형 분석을 위해서 사용하였다. 튜브당 총 2×10^6 개의 세포를 직접 면역형광 기술 및 다색 염색을 염색, 용해, 이어서 세척하였고, 이것은 CD138+ CD38+ CD45+ CD19- CD56+로서 식별된 악성 형질 세포의 특이적 식별 및 면역표현형 특징 규명을 목적으로 하였다. 이어서 세포를 적어도 CD38-FITC/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/CD45-V450/BCMA-APC를 비롯한 형광색소-접합된 항체의 패널을 사용하여 염색하였다. 사용된 형광색소-표지된 항체는 비디 바이오사이언시스(미국 산호세 소재) 및 칼텍 래보러토리즈(미국 캘리포니아주 소재)에서 제조된 제품이다.

국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)로부터 구입한다. 본 실험실의 APC-접합된 항-인간 BCMA 항체를 면역표현형 분석에서 사용하였다. 다색 유세포 분석기 상에서 획득을 수행하였고, 소프트웨어(예를 들어, FACSDiva 소프트웨어를 구동하는 칸토II 장치 또는 셀퀘스트 소프트웨어를 사용하는 FACSCalibur 유세포 분석기)를 설치하였다. 페인트-A-게이트 PRO 프로그램(비디 바이오사이언시스)을 데이터 분석을 위해서 사용하였다. 악성 형질 세포 집단 상에 게이팅된(gated) BCMA 발현을 측정하였고, 평균 형광 강도(MFI) 값을 측정하고, 골수종 환자들 사이에서 비교하였다.

[0512] [표 16: 멀티파라미터 유세포 분석법에 의해서 검출된 바와 같은 환자 골수 골수종 형질 세포 상에서의 BCMA 발현(평균 형광 강도)]

환자 번호	MFI _{BCMA}
P1	2863
P2	3528
P3	602
P4	389
P5	955
P6	1475
P7	282
P8	1621
P9	116
P10	125
P11	1495
P12	2451
P13	398
P14	2040
P15	678
P16	945
P17	1672
P18	1491
P19	2198
P20	1058
P21	3594
P22	615
P23	159

[0513] b) BCMA 특이적 항원 결합 능력의 측정(정량적 유세포 분석법 측정)

[0514] 큐피킷(Qifikit)(다코(Dako)) 방법을 사용하여 환자 골수 골수종 형질 세포의 세포 표면 상에서의 BCMA 특이적 항원 결합 능력(SABC)을 정량분석하였다. 전체 골수 흡인물로부터 분리된 골수종 형질 세포를 FACS 완충제(PBS, 0.1% BSA) 중에 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도(또는 포화 농도)로 희석된 $50\mu\text{l}$ 의 마우스 항-인간 BCMA IgG(바이오레전드(BioLegend) #357502) 또는 마우스 IgG2a 아이소타입 대조군(바이오레전드 #401501)으로 염색하고, 30분 동안 4°C 에서 암실에서 염색을 수행하였다. 다음으로, $100\mu\text{l}$ 의 셋-업(Set-up) 또는 캘리브레이션 비드(Calibration Bead)를 개별 흠 및 세포에 첨가하고, 뿐만 아니라 비드를 FACS 완충제로 2회 세척하였다. 세포 및 비드를 큐피킷에 의해서 제공된 플루오레세인 접합된 항-마우스 2차 항체를 (포화 농도로) 함유하는 $25\mu\text{l}$ FACS 완충제 중에 재현탁시켰다. 세포 및 비드를 45분 동안 4°C 에서 암실에서 염색하였다. 세포를 1회 세척하고, 모든 샘플을 $100\mu\text{l}$ FACS 완충제 중에 재현탁시켰다. 샘플을 다색 유세포 분석기 상에서 즉시 분석하였고, 소프트웨어(예를 들어, FACSDiva 소프트웨어를 구동하는 칸토II 장치 또는 셀퀘스트 소프트웨어를 사용하는 FACSCalibur 유세포 분석기)를 설치하였다.

[0515] [표 17: 정량적 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 환자 골수 골수종 형질 세포 상에서의 BCMA 특이적 항원 결합 능력]

환자 번호	SABC _{BCMA}
P1	해당 없음
P2	해당 없음
P3	679
P4	145
P5	957
P6	969
P7	554
P8	4479
P9	350
P10	414
P11	2756
P12	2911
P13	1267
P14	3453
P15	1006
P16	1097
P17	1622
P18	429
P19	1684
P20	383
P21	1602
P22	799
P23	204

[0517]

[0518]

실시예 13: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 자가 골수 침윤 T 세포의 존재 하에서의 골수 환자 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 세포독성(멀티파라미터 유세포 분석법)

[0519]

다발성 골수종을 위한 TCB 항체 후보물질의 전임상 평가 동안 가장 의미있고 중요한 시험관내 특징 규명 중 하나는 TCB 분자가 환자의 T 세포를 활성화시키고, 환자의 골수로부터의 1차 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 사멸을 유발하는지의 여부이다. 골수 골수종 형질 세포의 재지향된 T-세포 사멸을 유발하는 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체의 효과를 평가하기 위해서, 전체 골수 흡인물을 EDTA-코팅된 튜브 내에서 다발성 골수종 환자로부터 수집하고, 세포 배양 분석을 위해서 즉시 사용하였다. 전체 골수 샘플 중에 존재하는 효과기 세포 대 종양 세포의 비(E:T비)를 결정하고, 유세포 분석법에 의해서 측정하였다. 간략하면, 200 μ l의 골수 샘플을 96 깊은-홈 판으로 옮겼다. 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체 및 대조군 항체 희석물을 멀균 배지 중에서 제조하고, 10 μ l의 제조물을 0.1pM 내지 30nM 범위의 최종 농도로 각각의 홈에 첨가하였다. 골수-항체 혼탁물을 온화한 진탕에 의해서 혼합하고, 이어서 파라핀 필름으로 밀봉하고 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 배양시켰다. 배양 기간 후, CD138-APCC750/CD38-FITC/CD5-BV510/CD56-PE/CD19-PerCP-Cy7/ CD45-V450/BCMA-APC/아넥신-V-PerCP-Cy5.5를 비롯한 항체-페널을 기반으로 제조된 상응하는 FACS 항체 용액 20 μ l를 96-U-바닥 판에 첨가하였다. 형광색소-표지된 항체는 비디 바이오사이언시스(미국 산호세 소재) 및 칼텍 래보리토리즈(미국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)로부터 구입하였고, 본 실험실의 APC-접합된 항-인간 BCMA 항체를 사용하였다. 이어서 샘플을 암실에서 실온에서 15분 동안 배양시키고, 다색 유세포 분석기를 사용하여 획득 및 분석하였다. 골수종 세포 집단 CD138+ CD38+ CD45+ CD19- CD56+ 상에 게이팅된 아넥신-V 양성 발현을 평가함으로써 골수종 세포의 세포사를 측정하였다. 이어서 골수종 세포사의 백분율을 측정하였다. 주어진 TCB 농도에서 아넥신-V-음성 골수종 형질 세포의 절대 계수치를 측정하고, 그것을 TCB가 없는 아넥신-V-음성 골수종 형질 세포의 절대 계수치로부터 뺄셈하고; TCB가 없는 아넥신-V-음성 골수종 형질 세포의 절대 계수치로 나눔으로써 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 특이적 농도에 의해서 유발되는 환자 골수 골수종 형질 세포의 용해 백분율을 또한 결정하였다. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 특이성을 검증하기 위해서, 아넥신-V 발현을 다른 골수 세포 유형, 예컨대 T 세포, B 세포 및 NK 세포에서 또한 평가하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 환자 골수종 형질 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 존재하는 반면, T 세포, B 세포, 및 NK 세포의 용해는 관찰되지 않았다. 또한, CD3에만 결합하고 BCMA에 결합하지 않는 대조군 -TCB는 TCB의 최고 농도에서 골수종 형질 세포의 세포사를 유발하지 않았다. 표 18에 도시된 바와 같이, 최고 농도(30 nM)에서 아넥신-V 양성 환자 골수 골수종 세포의 백분율은 83A10-TCBcv에 대해서 29.31%와 비교할 때 각각 42-TCBcv 및 22-TCBcv에 대해서 최대 52.54% 및 55.72%에 도달되었고, 이는

42-TCBcv 및 22-TCBcv가 환자 골수 골수종 형질 세포의 사멸을 유발하는데 있어서 83A10-TCBcv보다 더 강력하다는 것을 나타낸다.

[0520] [표 18: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 환자 골수 흡인물로부터의 아넥신-V 양성 골수종 형질 세포의 백분율]

형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	29.31	30.95	23.14	15.74	16.76	13.11
42-TCBcv	52.54	39.87	29.96	10.51	19.6	13.11
22-TCBcv	55.72	51.71	31.01	14.81	14.19	13.11
대조군-TCB	15.18	10.93	/	/	/	/

[0521] [0522] 5명의 상이한 MM 환자로부터의 골수 흡인물에서의 또 다른 연구에서, 아넥신-V 음성 세포 집단 상에 게이팅시키고, 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 대해서 플로팅함으로써 생존 가능한 골수종 형질 세포의 백분율을 측정하였다. EC50 값을 측정하였고, 최대 생존 가능한 골수종 형질 세포의 50%를 유발하는 TCB 항체 농도로서 결정한다. 각각의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 존재 하에서 생존 가능한 골수종 형질 세포의 최대치로서 EMAX(%)를 측정하였다. 83A10-TCBcv는 5명의 골수종 환자 골수 흡인물 샘플 대부분에서 골수종 형질 세포의 용해를 유발하는데 있어서 22-TCBcv 및 42-TCBcv보다 훨씬 덜 강력하였다(표 26; 도 9는 예로서 환자 5명 중 2명에 대한 농도 반응 곡선을 나타낸다). 22-TCBcv 또는 42-TCBcv로 치료된 5/5 환자 샘플에서 생존 가능한 골수종 세포의 농도-의존적인 감소가 관찰되었고, 그에 비해서 83A10-TCBcv의 경우에는 1/5 환자 샘플만이 농도-의존적인 감소가 관찰되었다. 표 19는 83A10-TCBcv와 22-TCBcv 및 42-TCBcv의 비교 및 골수 골수종 형질 세포의 생존력에 대한 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 효과를 나타낸다. 이 결과는 각각의 환자 샘플에서 22-TCBcv 및 42-TCBcv 대 83A10-TCBcv에 대한 더 낮은 EMAX(%) 값에 의해서 예증되는 바와 같이 4/5 환자 샘플에서 22-TCBcv 및 42-TCBcv를 사용한 경우 더 적은 생존 가능한 골수 골수종 형질 세포가 존재하였음(즉 골수 골수종 형질 세포의 더 많은 용해)을 명확히 나타낸다. 환자 골수종 형질 세포의 농도-의존적이고 특이적인 용해가 관찰된 반면, 비-악성 골수 세포의 용해는 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0523] [표 19: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 존재 하에서 환자 골수 흡인물로부터의 아넥신-V 음성 생존 가능한 골수종 형질 세포에 대한 EMAX(%) 값]

골수 흡인물 환자 샘플 (연구 2)	83A10-TCBcv	EMAX (%)	
		22-TCBcv	42-TCBcv
환자 001	100	7.6	22.6
환자 003	54.3	38.9	44.6
환자 004	100	66.6	53.9
환자 006	81.8	65.9	73.5
환자 007	81.8	48.6	72.8

[0524] [0525] 83A10-TCBcv와 비교한 새로운 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 추가 연구에서, 7개의 새로 취한 환자 전체 골수 샘플/흡인물을 CD138 자성 마이크로비드(밀테니이 바이오테크(Miltenyi Biotec), 독일 베기쉬 글라트 바흐 소재)로 염색하고, 오토MACS 세포 분리 칼럼을 통해서 통과시키고, 통상적으로 4% 초파의 골수종 형질 세포의 MM 형질 세포의 충분한 잔류하는 수를 갖는 수집된 분획을 추가 실험을 위해서 사용하였다. 24홈 판에서, 500,000개 세포/홈을 배양시키고, 48시간 동안 배양하였다. 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체 및 대조군 항체 희석물을 0.1pM 내지 10nM 범위의 최종 TCB 농도를 위해서 각각의 홈에 첨가하였다. 각각의 용량 지점을 3회 수행하였다. 형질 세포 및 골수 미세환경의 세포의 생존력을 유세포 분석법(FACSCalibur; 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))을 사용하여 프로피디움 아이오다이드/CD138FITC 이중염색에 의해서 조사하였다. FACS디바 소프트웨어(벡톤 디킨슨)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 막대 플롯은 각각의 배지 대조군(MC)의 3회 반복에 걸친 평균에 대해서 정규화된 평균값을 나타낸다. 통계학적 분석을 위해서, 일측 t시험을 사용하였다. 10nM(IMAX10)의 농도에서 MM 형질 세포 성장의 최대 저해 및 1nM(IMAX1)에서 측정된 저해 각각을 배지 대조군에 대한 백분율로서 제공하였다. 배지 대조군과 비교한 대조군-TCB 항체(10nM)의 최대 저해를 또한 도시하였다. IMAX 값(마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel®); 마이크로소프트 오피스 프로페셔널(Microsoft Office Professional) 2013)의 계산을 제외하고, R 3.1.19, 및 바이오컨더터(Bioconductor) 2.1310을 사용하여 계산을 수행하였다. 이의 상응하는 통계학적 시험의 P값이 5%(*) 미만, 1%(**) 미만 또는 0.1%(***) 미만이면,

효과는 통계학적으로 유의미하다고 간주되었다. 도 10A 내지 10G에 도시된 바와 같이, 이 결과는 83A10-TCBcv와 비교할 때 7/7 환자 샘플에서 22-TCBcv 및 42-TCBcv를 사용한 경우 더 적은 생존 가능한 골수 골수종 형질 세포가 존재하였음(즉 골수 골수종 형질 세포의 더 많은 용해)을 명확히 나타낸다. 표 20은 배지 대조군에 대한 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 환자 골수 흡인물로부터의 생존 가능한 골수종 형질 세포의 백분율을 나타낸다. 표 21은 IMAX10 및 IMAX1 값을 나타낸다. 이 결과는 22-TCBcv 및 42-TCBcv가 환자 골수 골수종 형질 세포의 사멸을 유발하는 데 있어서 83A10-TCBcv보다 더 명백하게 강력함을 입증한다. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발되고, 모든 골수 환자 샘플에서 관찰된 골수 형질 세포(BMPC)의 특이적 용해에도 불구하고, 골수 미세환경(BMME)은 각각의 샘플에서 영향을 받지 않았다(도 10h, 7개의 환자 샘플을 대표함).

[표 20. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 환자 골수 흡인물로부터의 프로파디움 아이오다이드 음성 생존 가능한 골수종 형질 세포의 상대적인 백분율]

환자 샘플 번호 1 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	181.3	106.3	31.3	9.4
42-TCBcv	81.3	15.6	9.4	9.4
22-TCBcv	37.5	6.3	6.3	9.4
대조군-TCB	/	/	/	162.5
환자 샘플 번호 2 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	89.5	31.6	5.3	0
42-TCBcv	42.1	10.5	0	0
22-TCBcv	15.8	5.3	0	0
대조군-TCB	/	/	/	94.7
환자 샘플 번호 3 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	76.7	35.0	1.7	0
42-TCBcv	13.3	0	0	0
22-TCBcv	3.3	0	0	0
대조군-TCB	/	/	/	86.7
환자 샘플 번호 4 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	93.9	51.5	9.1	6.1
42-TCBcv	9.1	0	0	0
22-TCBcv	15.2	15.2	0	0
대조군-TCB	/	/	/	127.3
환자 샘플 번호 5 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	100	91.4	62.9	20.0
42-TCBcv	71.4	34.3	22.9	11.4
22-TCBcv	20.0	22.9	14.3	11.4
대조군-TCB	/	/	/	85.7

환자 샘플 번호 6 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	55.6	22.2	6.7	4.4
42-TCVcv	35.6	6.7	4.4	4.4
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
대조군-TCB	/	/	/	117.8

환자 샘플 번호 7 / 생존 가능한 골수종 형질 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (nM)			
	0.01	0.1	1	10
83A10-TCBcv	84.4	82.6	46.8	19.3
42-TCVcv	67.0	33.9	12.8	5.5
22-TCVcv	24.4	3.3	8.9	2.2
대조군-TCB	/	/	/	106.4

[0528]

[표 21. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 존재 하에서 환자 골수 흡인물로부터의 프로페디움 아이오다이드 음성 생존 가능한 골수종 형질 세포를 기준으로 10nM IMAX 10에서의 MM 형질 세포 성장의 최대 저해된 1nM IMAX1에서의 저해에 관련된 IMAX10 및 IMAX1 값]

환자 샘플 번호	83A10-TCBcv		42-TCBcv		22-TCBcv		대조군-TCB
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	IMAX10 (%)
1	90.6	68.8	90.6	90.6	90.6	93.8	-62.5
3	100	94.7	100	100	100	100	5.3
4	100	98.3	100	100	100	100	13.3
5	93.9	90.9	100	100	100	100	-27.3
6	80.0	37.1	88.6	77.1	88.6	85.7	14.3
7	95.6	93.3	95.6	95.6	97.8	91.1	-17.8
8	80.7	53.2	94.5	87.2	97.2	97.2	-6.4

[0530]

실시예 14: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 환자 골수 T 세포의 T-세포 활성화(멀티파라미터 유세포 분석법)

[0532]

항-BCMA/항-CD3 TCB 항체가 골수종 환자 CD4+ 및 CD8+ T 세포(즉, 골수 침윤 T 세포(MIL))의 활성화를 유발하는지를 평가하기 위해서, 배양 48시간 후 각각의 처리군, 미처리군, 및 대조군 군으로부터의 샘플을 하기 8개의 마커를 포함하는 항체-페널을 기반으로 제조된 FACS 항체로 염색하였다: CD8/CD69/TIM-3/CD16/CD25/CD4/HLA-DR/PD-1. 이어서 샘플을 암실에서 실온에서 15분 동안 배양시키고, 다색 유세포 분석기를 사용하여 획득 및 분석하였다. CD4+ 및 CD8+ T-세포 집단 상에 게이팅된 CD25, CD69 및/또는 HLA-DR 양성 발현을 평가함으로써 T-세포 활성화를 측정하였다. 이어서 T-세포 활성화 백분율을 측정하였다. 도 11은 다발성 골수종 환자로부터의 골수-침윤된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서 CD69 및 CD25의 농도-의존적인 상향조절을 나타낸다. 표 22는 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 의해서 유발된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서의 CD69 및 CD25 발현의 증가를 요약한다; 1명의 환자로부터의 데이터.

[0533]

[표 22: 환자 골수 골수종 형질 세포의 존재 하에서 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 골수종 환자 자가 T 세포의 T-세포 활성화]

CD69+ / CD4 T 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	21.8	14.93	1.80	0.93	1.02	0.85
42-TCBcv	29.6	24.8	1.90	1.57	0.94	0.85
22-TCBcv	34.99	30.72	3.62	1.69	2.31	0.85
대조군-TCB	0.7	0.62	/	/	/	/
CD69+ / CD8 T 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	25.50	22.07	8.330	5.60	5.14	5.30
42-TCBcv	23.61	24.22	11.125	9.26	6.28	5.30
22-TCBcv	25.48	28.14	11.460	6.64	14.08	5.30
대조군-TCB	5.71	4.93	/	/	/	/
CD25+ / CD4 T 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	17.47	12.86	5.18	4.58	4.07	7.5
42-TCBcv	8.65	7.42	3.51	2.71	2.81	7.5
22-TCBcv	12.34	11.52	5.23	4.89	4.90	7.5
대조군-TCB	6.90	6.50	/	/	/	/
CD25+ / CD8 T 세포 (%)	항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체 농도 (pM)					
	30000	10000	1000	100	10	0
83A10-TCBcv	9.79	6.560	0.42	0.13	0.12	0.12
42-TCBcv	2.20	2.231	0.42	0.14	0.08	0.12
22-TCBcv	3.57	4.110	0.65	0.10	0.08	0.12
대조군-TCB	0.09	0.100	/	/	/	/

[0534] [0535] 실시예 15: 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 환자 골수 T 세포의 증가된 T-세포 기능 (사이토카인 생산)(멀티플렉스-비드 기반 면역검정법/유세포 분석법)

[0536] 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체(83A10-TCBcv, 22-TCBcv 및 42-TCBcv)가 T-세포 활성화 및 골수종 환자 골수 침윤 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증가된 기능을 유발하는지를 평가하기 위해서, 상청액을 48시간의 배양 후에 각각의 처리군, 미처리군 및 대조군 군의 배양물로부터 수집하고, 사이토카인 및 세린 프로테아제의 함량을 측정하였다. 인간 Th1/Th2 사이토카인 키트 II(BD #551809) 또는 하기 CBA 플렉스 세트의 조합을 사용하여 제조원의 지시서에 따라서 다색상 유세포 분석기 상에서 사이토카인 비드 어레이(CBA)분석을 수행하였다: 인간 그랜자임 B(BD #560304), 인간 IFN- γ 플렉스 세트(BD #558269), 인간 TNF- α 플렉스 세트(BD #558273), 인간 IL-10 플렉스 세트(BD #558274), 인간 IL-6 플렉스 세트(BD #558276), 인간 IL-4 플렉스 세트(BD #558272), 인간 IL-2 플렉스 세트(BD #558270).

[0537] 실시예 16: 시노몰구스 원숭이에서의 약동학/약력학(PK/PD) 연구

[0538] 다른 이중특이적 항체, 예컨대 (scFV)₂(예를 들어, 국제 특허 제W02013072415호 및 제W02013072406호에 기술된 바와 같은 BCMAxCD3 이중특이적 T-세포 관여기 BiTE®)에 비해서 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체가 가질 수 있는 명백한 이점은 훨씬 더 긴 반감기/더 낮은 생체내 클리어런스인데, 이는 수주에서 수개월 동안 환자에 의해서 보유된 펌프를 통해서 투여되는 치료가 요구되는 (scFV)₂의 매우 짧은 제거 반감기(예를 들어, 1 내지 4시간)와 비교할 때 주 1회 IV 또는 SC 투여를 가능하게 할 수 있다(문헌[Topp et al. J Clin Oncol 2011; 29(18): 2493-8]). 주 2회 또는 1회 투여는 환자에게 훨씬 더 편리하고, 또한 훨씬 덜 위험하다(예를 들어, 펌프 고장, 카테터가 갖는 문제 등).

[0539] a) 생체내에서 항-BCMA/항-CD3 83A10-TCBcv 항체의 제거 반감기/클리어런스를 검증하기 위해서, 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이중특이적 항체(83A10-TCBcv, 22-TCBcv 및 42-TCBcv)를 사용한 단일 용량 약동학(PK) 약력학(PD) 연구를 숙련된 AAALAC-승인된 CRO에서 수행하였다. 약 2살이고 체중이 대략 3kg인 생물학적 미경험 성인 시노몰구스 원숭이를 적어도 40일 동안 순응시키고, 체중, 임상 관찰 및 임상 병리학 검사를 기초로 선택하였다. 동물을 개별 문선 및 색상-코드 케이지 카드로 식별하였다. 모든 동물 절차(사육, 건강 모니터, 억제, 투여 등) 및 윤리적 변경은 생물의학 연구에서 사용되는 동물 보호 지침을 집행하는 현재 국가 법률에 따라서 수행하였다. 동물을 가장 최근의 시험전 체중을 기초로 치료 군에 무작위로 배정하였다. 허용 가능하지 않은 시험전 발견을 갖는

동물을 제외시킨 후, 시험전 체중과 관련하여 균형을 달성하도록 설계된 프리스티마(Pristima[®]) 시스템에 포함된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 체중 극한치 둘 모두로부터의 동물을 제외시키고, 나머지 동물을 치료 군으로 무작위화하였다. 동물을 0.003; 0.03; 및 0.3mg/kg의 83A10-TCBcv(n=2마리 동물, 즉, 군당 1마리의 암컷 및 1마리의 수컷)로의 3개의 치료군에 배정하였다. 동물에게 83A10-TCBcv의 단일 iv. 주사를 제공하고, 하기 수집 스케줄 및 절차에 따라서 PK 평가를 위해서 말초 정맥을 통해서 시간지점마다 적어도 0.8ml의 혈액 샘플을 수집하였다: 투여 전, 투여 후 30, 90, 180분, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504시간. 혈액 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 투브에서 응고시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다(적어도 10분, 1200g, +4°C). 생성된 혈청(약 300μl)을 추가 분석 시까지 -80°C에서 직접 저장하였다. PK 평가를 위한 골수 샘플을 또한 마취/진통제 처치 하에서 투여 전, 하기 수집 스케줄에 따라서 대퇴골에서 수집하였다: 투여 후 96 및 336시간. 골수 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 투브에서 응고시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다(적어도 10분, 1200g, +4°C). 생성된 골수 (약 1ml)를 추가 분석 시까지 -80°C에서 직접 저장하였다. PK 데이터 분석 및 평가를 수행한다. 표준 비 구획적 분석을 왓슨 패키지(v 7.4, 써모 피셔 사이언티픽 월트만, 미국 매사추세츠주 소재) 또는 포에닉스 원논린 시스템(v. 6.3, 서타라 컴퍼니, 미국 소재)을 사용하여 수행한다. 도 12 및 표 23에 나타난 바와 같이, IV 주사 후 상이한 시간지점에서 수집된 혈청 샘플로부터 ELISA에 의해서 83A10-TCBcv의 혈청 농도를 측정하였다. 표 24는 각각의 치료 군에 대해서 ELISA에 의해서 측정된 바와 같은 골수에서의 83A10-TCBcv의 농도를 나타낸다(BLQ는 정량분석의 수준 미만을 의미한다).

[0540] 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 잠재적인 임상 용도를 위한 관련된 몇몇 정보를 도 12, 표 23 및 표 24로부터 입수할 수 있다:

[0541] - MM 환자로부터의 골수 흡인물에서, 본 발명의 TCB의 1nM 또는 10nM의 농도는 MM 형질 세포의 상당하거나 심지어는 전체 사멸을 유발하며; 용량 0.03mg/kg에서 주사로부터 168시간(7일)까지의 간격에서 대략 1nM 내지 4nM의 혈장 농도가 달성되었고, 이는 대략 0.03mg/kg의 용량의 주 1회 요법이 양호하게 실현 가능할 수 있음을 나타낸다(200ng/ml는 대략 1nM에 상응한다).

[0542] - 도 12는 관찰된 용량 범위에서 PK는 대체로 용량에 대해서 선형임을 나타내는데; 이는 농도가 용량에 비례함을 의미하고; 임상 요법에 유용한 특성이다.

[0543] - MM은 골수에 주로 위치된 질환이며; 골수에서 검출된 83A10-TCBcv의 농도는 혈청 농도와 유사하고(표 24), 예를 들어, 주입 후 96시간에서 대략 1 및 2nM의 골수 농도가 측정되었고; 이는 MM 형질 세포의 상당한 사멸이 MM 환자로부터 새로 취한 골수 흡인물 중에서 관찰된 본 발명의 TCB의 농도이고; 다시 편리한 투여 간격, 예컨대 주 1회에 대한 가능성을 입증한다.

[0544] - 투여 후 24시간 내지 504시간 사이에서, 제거는 대략 6일 내지 8일의 제거 반감기를 갖는 주로 1차 함수이며, 이는 예를 들어 주 1회 투여에 대한 가능성을 다시 나타낸다.

[0545] [표 23. 시노몰구스 원숭이에서 IV 치료 후 83A10-TCBcv의 혈청 농도]

농도 (ng/mL)	83A10-TCBcv					
	0.003mg/kg IV		0.03mg/kg IV		0.3mg/kg IV	
	A	B	C	D	E	F
투여 전	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
30분	75.69	74.99	668.66	796.54	17207.20	14943.95
90분	70.92	74.56	951.81	628.72	12831.54	16248.97
180분	76.54	62.55	981.42	722.27	10653.28	6824.72
7시간	53.17	77.39	700.67	972.38	8204.77	4560.36
24시간	33.16	50.41	358.90	532.11	4609.28	4127.41
48시간	26.05	37.40	279.80	433.30	3546.09	2700.43
96시간	17.28	19.52	226.01	429.80	1959.96	2006.92
168시간	17.33	15.87	55.58	365.67	1918.06	1382.57
336시간	11.21	4.43	102.94	153.54	1102.96	773.55
504시간	4.33	BLQ	43.99	130.14	952.03	377.04

[0546]

[0547] [표 24. 시노몰구스 원숭이에서 단일 IV 치료 후 83A10-TCBcv의 골수 농도]

농도 (ng/mL)	0.003ng/kg		0.03ng/kg		0.3ng/kg	
	A	B	C	D	E	F
투여 전	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
96시간	25.07	37.15	179.87	469.08	3432.54	2674.70
336시간	9.92	6.90	59.39	47.22	1987.48	850.87

[0548] [0549] 약력학(PD) 측정: 유세포 분석법에 의한 PD 평가를 위해서 혈액 샘플(시간지점: 투여 전, 투여 후 24, 48, 96, 168, 336, 504시간) 및 골수 샘플(시간지점: 투여 전, 투여 후 96 및 336시간)을 7.5% K3 EDTA를 함유하는 튜브에 수집하여 단일 용량으로서 i.v로 제공된 83A10-TCBcv의 혈액 및 골수 형질 세포, B 세포, 및 T 세포에 대한 효과를 평가하였다. 표면 마커의 "용해 및 세척" 직접 면역형광 염색 방법을 적용하였다. 간략하면, 100 μ l의 혈액 또는 골수를 CD45/CD2/CD16/CD20/CD27/CD38 또는 CD45/CD2/CD16/CD4/CD25/CD8을 비롯한 2종의 항체 혼합물과 암실에서 30분 동안 +4°C에서 배양시켰다. 적혈구를 용해시키기 위해서, 2ml의 용해 완충제 용액을 샘플에 첨가하고, 실온에서 암실에서 15분 동안 배양시켰다. 세포를 원심분리에 의해서 수집하고, 염색 완충제(PBS 2% 우태아 혈청)로 세척하였다. 동일한 날의 세포측정기로의 획득 시까지 염색된 샘플을 냉동실에 유지시키고, 광으로부터 보호하였다. 488 및 635 레이저 라인이 장치된 벡톤 디킨슨 유세포 분석기, BD FACS 칸토 II를 사용하여 FACS 데이터 획득을 수행하였다. BD FACSDiva 소프트웨어를 데이터 수집 및 분석을 위해서 사용하였다. 혈액 분석기(ADVIA™) 120, 지멘스(Siemens))에 의해서 수득된 WBC 계수치를 기초로, 이중 플랫폼을 사용하여 절대 세포수 열거를 수행하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 83A10-TCBcv의 단일 용량 IV 치료가 제공된 모든 동물에서 회전 T 세포 계수치의 감소에 의해서 나타난 바와 같은 말초 T-세포 재분포가 관찰되었다. 도 14A에 도시된 바와 같이, 83A10-TCBcv 0.3mg/kg으로의 치료 후 이미 24시간에, 혈액 형질 세포(BCMA-양성 세포)에서의 감소가 치료된 동물에서 관찰되었지만, 총 B 세포(BCMA-음성 세포)에서는 감소되지 않았다. 도 14b는 시노몰구스 원숭이에서 83A10-TCBcv 0.3mg/kg으로의 치료 후 혈액에서 형질 세포 감소의 속도를 나타낸다.

[0550] [0551] 혈액 샘플을 하기 스케줄에 따라서 사이토카인 분석(IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α 및 IFN- γ)을 위해서 혈장 수집을 위해서 가공하였다. 투여 전, 투여 후 30, 90, 180분, 7, 24, 48, 96, 168시간. 혈액 샘플을 병육에서 유지되는 플라스틱 튜브에 넣고, 이어서 원심분리하였다(적어도 10분, 1200g, +4°C). 생성된 혈장을 분석 시까지 -80°C에서 직접 저장하였다. 멀티플렉스 비드-기반 사이토카인 면역검정법(루미넥스 테크놀로지(Luminex Technology))을 사용하여 사이토카인 분석을 수행한다. 바이오-플렉스 매니저(Bio-Plex Manager) 4.1 소프트웨어(바이오-래드(Bio-Rad))를 사용하여 데이터를 분석하고: 5-파라미터 로지스틱 회귀 모델(5PL)을 사용한다.

b) 추가 연구에서, 시노몰구스 원숭이를 42-TCBcv 또는 22-TCBcv로 치료하였다. 동물(n=2/군)에게 42-TCBcv의 단일 IV(0.01; 0.1; 및 1.0mg/kg) 또는 SC(0.01 및 0.1mg/kg) 주사 또는 22-TCBcv(0.1mg/kg)로의 단일 IV 주사 를 제공하였다. 혈액 샘플 및 골수 샘플을 정의된 수집 스케줄에 따른 시간지점에 수집하고, 이에 따라서 PK 및 PD 측정을 위해서 가공하였다(면역형검사(immunophenotyping) 및 사이토카인 생산).

[0552] [0553] 동물에게 42-TCBcv 또는 22-TCBcv(IV 만)의 단일IV 또는 SC. 주사를 제공하고, 하기 수집 스케줄 및 절차에 따라서 PK 평가를 위해서 말초 정맥을 통해서 시간지점마다 혈액 샘플을 수집하였다: 투여 전, 투여 후 30, 90, 180분, 7, 24, 48, 96, 168, 336, 504시간. 혈액 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 튜브에서 응고시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다(적어도 10분, 1200g, +4°C). 생성된 혈청(약 300 μ l)을 추가 분석 시까지 -80°C에서 직접 저장하였다. PK 평가를 위한 골수 샘플을 또한 마취/진통제 처리 하에서 투여 전, 하기 수집 스케줄에 따라서 대퇴골에서 수집하였다: 투여 후 96 및 336시간. 골수 샘플을 60분 동안 실온에서 혈청 분리를 위해서 튜브에서 응고시켰다. 혈병을 원심분리에 의해서 회전시켰다(적어도 10분, 1200g, +4°C). 생성된 골수(약 1ml)를 추가 분석 시까지 -80°C에서 직접 저장하였다. PK 데이터 분석 및 평가를 수행하였다. 표준 비 구획적 분석을 왓슨 패키지(v 7.4, 써모 피셔 사이언티픽 월트만), 미국 매사추세츠주 소재) 또는 포에닉스 원논린 시스템(v. 6.3, 서타라 컴퍼니, 미국 소재)를 사용하여 수행하였다. 도 19 및 표 24A 내지 D에 나타낸 바와 같이, IV 또는 SC 주사 후 상이한 시간지점에서 수집된 혈청 샘플 및 골수 샘플로부터 ELISA에 의해서 42-TCBcv의 농도를 측정하였다. 다발성 골수종 환자 골수 흡인물에서 42-TCBcv의 효과적인 농도는 10pm 내지 10nM(회색 면적)에 상응한다. 팔호 안의 농도는 nM 단위이다. BLQ, 정량분석의 수준 미만; i/m, 결정적이지 않은 측정치.

[0553] [표 24A. 시노몰구스 원숭이에서 IV 치료 후 42-TCBcv의 혈청 농도]

농도 (ng/mL)	42-TCBcv					
	0.01mg/kg IV		0.1mg/kg IV		1.0mg/kg IV	
	수컷	암컷	수컷	암컷	수컷	암컷
투여 전	BLQ	BLQ	i/m	BLQ	BLQ	BLQ
30분	468.57	613.44	4720.33	4506.64	41939.31	32677.23
90분	333.09	427.16	4284.66	3214.61	30889.73	103925.73
180분	392.37	422.36	4336.89	2865.36	29201.69	36157.78
7시간	421.96	356.34	4028.47	3070.84	25064.81	29962.62
24시간	242.64	305.74	2996.24	2321.66	19365.86	23656.65
48시간	i/m	192.97	2595.62	1781.91	20539.59	13523.68
96시간	128.50	148.02	2153.34	1277.02	13147.09	12755.58
168시간	51.13	72.64	1388.24	948.31	6189.79	3952.05
336시간	27.68	13.03	195.51	190.87	5337.85	54.15
504시간	18.17	8.04	275.93	13.96	3678.69	37.88

[0554]

[0555] [표 24B. 시노몰구스 원숭이에서 단일 IV 치료 후 42-TCBcv의 골수 농도]

농도 (ng/mL)	42-TCBcv					
	0.01mg/kg IV		0.1mg/kg IV		1.0mg/kg IV	
	암컷	수컷	암컷	암컷	수컷	암컷
투여 전	BLQ	BLQ	406.99	BLQ	BLQ	BLQ
96시간	54.39	130.03	956.56	1022.87	4089.88	4339.33
336시간	27.23	18.49	227.20	170.34	3705.74	62.44

[0556] [표 24C. 시노몰구스 원숭이에서 SC 치료 후 42-TCBcv의 혈청 농도]

농도 (ng/mL)	42-TCBcv			
	0.01mg/kg SC		0.1mg/kg SC	
	수컷	암컷	수컷	암컷
투여 전	4.76	12.41	BLQ	BLQ
30분	8.25	12.51	25.11	14.62
90분	16.38	22.71	140.73	145.39
180분	23.75	48.51	334.95	269.66
7시간	37.46	63.48	836.86	565.10
24시간	68.15	115.31	2100.42	904.22
48시간	116.63	118.03	1956.60	1111.06
96시간	150.77	120.62	1810.13	1817.52
168시간	106.28	98.64	1192.65	1653.26
336시간	67.02	46.21	482.39	571.04
504시간	25.69	31.99	4.08	83.91

[0558]

[0559] [표 24D. 시노몰구스 원숭이에서 단일 SC 치료 후 42-TCBcv의 골수 농도]

농도 (ng/mL)	42-TCBcv			
	0.01mg/kg SC		0.1mg/kg SC	
	암컷	수컷	암컷	암컷
투여 전	5.59	10.70	BLQ	BLQ
96시간	109.88	73.93	1064.66	1066.79
336시간	29.35	48.78	518.40	906.48

[0560]

표 24A 및 24C로부터의 결과는 42-TCBcv를 사용한 주 1회 또는 2주 1회 치료에 적합한 혈청 농도 프로파일을 나타낸다. IV 및 SC 투여 후 혈청 농도에 대한 곡선 하 면적 AUC를 측정하였고, 그 AUC 값의 비교는 42-TCBcv의 SC 투여를 사용한 경우 100%에 근접한 높은 생체이용률을 나타내었다. 또한, 그 결과는 골수 중의 42-TCBcv의 농도는 42-TCBcv 혈청 농도와 매우 유사함을 나타낸다. 혈청 중의 42-TCBcv 농도는 골수 중에서 사용

가능한 42-TCBcv의 농도, 즉, 골수종 종양 세포가 풍부한 주요 위치에서의 농도를 잘 나타낼 수 있다.

[0562] 약력학(PD) 측정치는 PK 측정치를 뒷받침하는 유용한 정보이다. 추가 PD 분석을 수행하였다. 혈액으로부터의 시노몰구스 CD20+B 세포는 또한 세포 표면 상에서 BCMA를 발현시키고, 혈액에서 형질 세포보다 상당히 더 풍부(더 높은 절대 계수치)하다. 혈액 B-세포 감소는 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체의 신뢰할 만한 약력학적 효과로서 사용되며, 83A10-TCBcv, 42-TCBcv 및 22-TCBcv 사이에서 생체내 효능을 비교하였다. 절대 B-세포 계수치를 유세포 분석법 및 혈액학 분석기로 수득된 WBC 계수치로 이루어진 이중 플랫폼을 기초로 계산하였고, 하기 시간지점에서 측정하였다: 투여 전, 10분 IV 주입 후 24시간, 48시간, 96시간 및 196시간. B-세포 감소의 백분율을 하기와 같이 계산하였다:

$$= \frac{[투여 전 절대 B-세포 계수치] - [시간지점에서의 절대 B-세포 계수치]}{[투여 전 절대 B-세포 계수치]} * 100$$

[0563] [표 24E: 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체의 약력학적 효과: B-세포 감소]

IV 주사 후 시간 (시간)	투여 전에 대한 B-세포 감소 (%)		
	83A10-TCBcv 0.3mg/kg (n=2)	42-TCBcv 0.1mg/kg (n=2)	22-TCBcv 0.1mg/kg (n=2)
24시간	19.9 ± 0.21	91.4 ± 3.8	77.8 ± 3.7
48시간	11.9 ± 17.6	88.8 ± 3.9	61.5 ± 9.8
96시간	5.0 ± 10.8	93.0 ± 7.2	89.2 ± 4.8
168시간	-0.23 ± 61.4	96.6 ± 3.5	91.9 ± 3.9

[0564] [0565] 42-TCBcv 및 22-TCBcv는 단일 용량 IV 주사 후에 시노몰구스 원숭이에서 BCMA-발현 B 세포의 감소를 유발하는데 있어서 83A10-TCBcv보다 더 강력하다(표 24E 참고). 3개의 분자는 동일한 문자 구조 및 CD3 결합기를 공유하기 때문에, 시노몰구스 원숭이에서의 효능 차이는 주로 각각의 BCMA 항체로 인한 것일 수 있다.

[0566] [0567] IV 주사 후 시노몰구스 원숭이에서 BCMA-발현 B 세포의 감소가 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체의 기전적 약력학적 효과의 결과임을 확인하기 위해서, 활성화된 CD8+ 세포독성 T 세포(즉, 효과기 세포)의 증가를 IV 주사 후 4일(96시간) 및 3주(336시간)에 BCMA-양성 세포(즉, 표적 세포)가 풍부한 골수에서 측정하였다. 절대 CD8+ CD25+ 활성화된 T-세포 계수치를 유세포 분석법 및 혈액학 분석기로 수득된 WBC 계수치로 이루어진 이중 플랫폼을 기초로 계산하였다.

[0568] [표 24F: 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체의 약력학적 효과: CD8⁺ CD24⁺ 활성화된 T 세포의 증가]

IV 주사 후 시간 (시간)	투여 전에 대한 CD8 ⁺ CD24 ⁺ 활성화된 T 세포의 증가 (%)		
	83A10-TCBcv 0.3mg/kg (n=2)	42-TCBcv 0.1mg/kg (n=2)	22-TCBcv 0.1mg/kg (n=2)
96시간	284 ± 244 %	585 ± 496 %	1449 ± 1715 %
336시간	-0.9 ± 1.3%	110 ± 187 %	-6.6 ± 45.3 %

[0569] [0570] 42-TCBcv 및 22-TCBcv는 단일 용량 IV 주사 후에 시노몰구스 원숭이에서 T-세포 활성화를 유발하는데 있어서 83A10-TCBcv보다 더 강력하다(표 24F 참고). 3개의 분자는 동일한 문자 구조 및 CD3 결합기를 공유하기 때문에, 시노몰구스 원숭이에서의 약력학적 효과의 차이는 주로 각각의 BCMA 항체로 인한 것일 수 있다. 이 결과는 골수 및 혈액 중에서 BCMA-양성 B 세포의 감소는 대부분 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체에 의해서 유발된 세포독성 T 세포의 활성화의 결과로 인한 것임을 나타낸다.

[0571] [0572] 실시예 17: PBMC-인간화 NOG 마우스를 사용하여 H929 인간 골수종 이종이식 모델에서 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된 항종양 활성

긴 제거 반감기와 관련하여, Fc-함유 항-BCMA/항-CD3 TCBcv 항체는 주 1회 스케줄로 동일물량 용량으로 제공된 (scFv)₂-기반 이중특이적 항체, 예컨대 BCMA50-BiTE®보다 더 효능이 있을 수 있다. 83A10-TCBcv 및 BCMA50-BiTE®(국제 특허 공개 제W02013072415호 및 제W02013072406호에 기술된 바와 같음)의 생체내 효과를 PBMC-인간화 NOG 마우스에서 H929 인간 골수종 이종이식 모델에서 비교 및 평가하였다. NOG 마우스는 인간화 마우스 모델에 적절한데, 그 이유는 이것이 상주하는 NK 세포 집단을 비롯한 면역 세포가 완전히 존재하지 않고, 따라서 인간 이종 세포의 종양 이식에 보다 관대하기 때문이다(문헌[Ito et al. CurrTop Microbiol Immunol 2008;

324: 53-76]). 간략하면, 연구 0일(d0)에, 50:50 마트리겔을 함유하는 $100\mu\ell$ RPMI 1640 배지(비디 바이오사이언시스, 프랑스 소재) 중의 5×10^6 개의 인간 골수종 세포주 NCI-H929(NCI-H929, ATCC®, CRL-9068™)를 8 내지 10주령의 면역결핍성 NOD/Shi-scid IL2r 감마(null)(NOG) 암컷 마우스(타코닉(Taconic), Ry, 텐마크 소재)의 우측 옆구리에 피하(SC) 주사하였다. H929 종양 세포 SC 이식 24시간 내지 72시간 전에, 모든 마우스를 g-공급원(1.44 Gy, ^{60}Co , 바이오맵(BioMep), 프랑스 브레테니에레스 소재)으로 전신 조사하였다. 15일(d15)에, NOG 마우스에게 2×10^7 개의 인간 PBMC의 단일 복강내(IP) 주사를 제공하였다($500\mu\ell$ PBS 1X pH7.4). 인간 PBMC의 특징 규명을 면역 면역형검사(유세포 분석법)에 의해서 수행하였다. 이어서 비보 매니저(Vivo manager)(등록상표) 소프트웨어(바이오시스템스(Biosystems), 프랑스 카우터논 소재)를 사용하여 마우스를 주위 깊게 상이한 치료군 및 대조군으로 무작위화하고($n=9$ /군), 통계학적 시험(분산 분석)을 수행하여 군들 간의 동질성에 대해서 시험하였다. 종양 부피가 모든 마우스에서 적어도 100 내지 150mm^3 에 도달한 경우, 항체 치료를 19일(d19), 즉, H929 종양 세포의 SC 주사 후 19일에 시작하였고, 평균 종양 부피는 매개체 치료된 대조군의 경우 300 ± 16^3 , $2.6\text{nM}/\text{kg}$ 대조군-TCB 치료군의 경우 $315 \pm 148\text{mm}^3$, $2.6\text{nM}/\text{kg}$ 83A10-TCBcv 군의 경우 $293 \pm 135\text{mm}^3$ 및 $2.6\text{nM}/\text{kg}$ BCMA50-(scFv)2(BCMA50-BiTE®) 군의 경우 $307 \pm 138\text{mm}^3$ 이었다. TCB 항체 치료 스케줄은 83A10-TCBcv로 수득된 이전의 약동학적 결과를 기초로 하였고, 최대 3주 동안 주 1회 IV 투여(TCB 항체 총 3회 주사)로 이루어졌다. 인간 PBMC를 사용하여 숙주 마우스를 재구성한 후 4일(d19)에, 제1 용량의 항-BCMA/항-CD3 83A10-TCBcv 항체($2.6\text{nM}/\text{kg}$ 각각 $0.5\text{mg}/\text{kg}$)를 꼬리 정맥 주사를 통해서 제공하였다. 83A10-TCBcv 및 대조군-TCBcv로 치료된 모든 군으로부터의 마우스에서 혈액 샘플을 각각의 치료 1시간 전, 제2 치료 2시간 전 및 종료 시에 경정/하약 정맥 천자(마취 하에서)에 의해서 수집하였다. 혈액 샘플을 즉시 응고 활성인자 함유 투브(T MG 투브, 선홍색 뚜껑, 카피젝트(Capject®), 테루모(Terumo®))로 즉시 옮겼다. 투브를 실온에서 30분 동안 방치하여 응고를 허용하였다. 이어서 혈병/혈청 분리를 위해서 투브를 1,300g로 5분 동안 원심분리하였다. 혈청 분취물을 제조하였고, 액체 질소 중에서 플래쉬 동결시키고, 추가 분석 시까지 -80°C 에서 저장하였다. 연구 동안 종양 부피(TV)를 캘리퍼에 의해서 측정하였고, TV의 군간 비교에 의해서 진행을 평가하였다. TG(%)로서 정의된 종양 성장의 백분율은 $\text{TG} (\%) = 100 \times (\text{분석된 군의 중간 TV}) / (\text{대조군 매개체 치료군의 중간 TV})$ 를 계산함으로써 결정되었다. 도덕적인 이유를 위해서, TV가 적어도 2000mm^3 에 도달된 경우 마우스를 안락사시켰다. 도 15는 실험군당 각각의 개별 마우스의 TV를 나타낸다. (A) 매개체 대조군(실선) 및 대조군 TCB(점선)을 포함하는 대조군, (B) 83A10-TCBcv($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 군, 및 (C) BCMA50-BiTE®($2.6\text{nM}/\text{kg}$). 83A10-TCBcv($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 군에서, 9마리의 마우스 중 6마리(67%)는 심지어는 d19에서 기록된 TV보다 낮게 그들의 종양이 퇴행하였고, 즉 제1 TCB 치료 및 종양 퇴행은 연구 종료까지 유지되었다. 종양 퇴행을 나타내는 데 실패한 83A10-TCBcv($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 치료군에서의 3마리는 d19에서 각각 376, 402 및 522mm^3 에 동일한 이들의 TV를 가졌다. 이에 반해서, 3주 동안 주 1회 스케줄로 동일물량 용량의 BCMA50-BiTE®($2.6\text{nM}/\text{kg}$)로 치료된 9마리 마우스 중 어느 것도(0%) 어느 시간지점에서 이들의 종양이 퇴행되지 않았다. 표 25는 모든 실험군에서 시간에 따른 종양 부피의 진행을 나타낸다. 종양 성장의 백분율을 d19 내지 d43 동안 계산하였고, 83A10-TCBcv($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 군과 BCMA50-BiTE®($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 군 사이에서 비교하였다(도 16). 결과는 TG(%)가 83A10-TCBcv($2.6\text{nM}/\text{kg}$) 군에서 일관되고 유의하게 감소되고, 뿐만 아니라 TG(%)는 BCMA50-BiTE®($2.6\text{nM}/\text{kg}$)에 비해서 항상 더 낮음을 입증한다. 표 26는 19일 내지 43일에서 중간 종양 부피(TV) 및 종양 성장의 백분율(TG(%))을 나타낸다. 전체 결과는 치료가 3주 동안 주 1회 스케줄로 동일물량 용량으로 제공되는 경우 생체내에서 항종양 활성을 유발하는 데 있어서 83A10-TCBcv가 BCMA50-BiTE®보다 우수함을 명백하게 입증하였다.

[표 25. 대조군 매개체 군으로부터의 마우스 및 동일물량 용량의 대조군-TCB, 83A10-TCBcv 및 BCMA50-(scFv)2(BCMA50-BiTE®)로 치료된 마우스에서 시간에 따른 종양 부피의 진행]

종양 부피 (mm ³)	대조군 매개체 군 A										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	평균	SD
5일	95	58	63	71	63	68	67	65	36	65	15
8일	70	61	71	70	56	68	74	70	49	66	8
12일	66	65	53	50	57	58	60	59	56	58	5
15일	101	95	131	80	61	65	89	37	161	91	37
19일	333	327	566	123	197	191	444	92	427	300	161
23일	565	481	1105	470	310	309	517	281	581	513	249
27일	1071	877	1989	823	560	675	1089	530	870	943	440
30일	1870	1129	x	419.2	867	1060	1368	673	1331	1090	450
34일	x	1653		507	1056	1521	1805	1008	2042	1370	535
37일		2140		2043	1309	2017	2394	1267	x	1862	464
40일		x		x	1592	x	x	1346		1469	174
43일					1548			1994		1771	314
47일				x			x				
51일											

[0574]

종양 부피 (mm ³)	2.6nM/kg 대조군 TCB 군 B										
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	평균	SD
5일	68	65	84	83	46	63	73	74	67	69	11
8일	55	64	54	73	60	103	56	55	76	66	16
12일	45	92	73	76	83	78	103	69	76	77	16
15일	72	169	64	99	69	150	223	115	88	117	54
19일	257	334	71	318	268	460	602	236	285	315	148
23일	430	773	95	444	553	738	808	381	461	520	227
27일	924	1252	232	780	768	1009	915	606	630	791	289
30일	1191	1714	326	867	1230	1349	1118	817	783	1044	398
34일	1684	x	592	1466	1660	1954	1765	1180	576	1359	529
37일	2522		597	1735	1105	x	x	1402	861	1370	691
40일	x		978	2388	1952			2277	1365	1792	604
43일			1302	x	x			x	1895	1599	419
47일			2346						2373	2359	19
51일			x					x			

[0575]

종양 부피 (mm ³)	2.6nM/kg 83A10-TCBcv 군 C										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	평균	SD
5일	78	79	55	77	53	47	39	53	60	60	15
8일	69	37	67	75	62	59	59	77	75	64	12
12일	58	61	60	69	48	59	46	63	87	61	12
15일	136	41	61	138	48	57	76	71	217	94	58
19일	376	151	238	522	154	133	377	287	402	293	135
23일	656	322	375	847	311	249	642	395	681	498	210
27일	1119	376	443	1400	253	253	678	371	1166	673	441
30일	1607	187	260	1975	88	113	219	191	1590	692	783
34일	2143	68	100	x	34	54	63	53	2429	618	1033
37일	x	41	44		43	34	34	35	x	38	5
40일		64	40		43	38	32	39		43	11
43일		40	43		33	24	32	25		33	8
47일		14	21		16	12	19	14		16	3
51일		15	30		20	20	15	18		20	6

[0576]

종양 부피 (mm ³)	2.6nM/kg BCMA50-(scFv) ₂ (BCMA50-BiTE®) 군 D										
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	평균	SD
5일	75	92	78	86	57	91	74	58	62	75	13
8일	51	87	61	99	70	88	90	73	71	77	15
12일	70	73	63	76	84	76	85	58	113	78	16
15일	142	72	61	128	87	77	121	60	188	104	44
19일	232	212	81	474	303	260	360	304	539	307	138
23일	560	483	121	811	665	408	654	457	1115	586	278
27일	827	879	216	1224	1092	732	886	908	1526	921	359
30일	1026	1414	227	1476	1373	1256	1210	1228	2433	1294	567
34일	1368	1855	418	2185	1734	1936	1465	1645	x	1576	535
37일	1691	2754	599		2542		2102	2062		1958	765
40일	2764	x	706		x		x	x		1735	1455
43일	x		807						807	해당 없음	
47일			x								
51일											

[0577]

[0578]

[표 26. 19일 내지 43일에서 중간 종양 부피(TV) 및 종양 성장의 백분율(TG(%)): BCMA50-BiTE®와 비교된 83A10-TCBcv]

종양 성장 저해 TG(%)	매개체 치료된 대조군		83A10-TCBcv 2.6nM/kg		BCMA50-BiTE® 2.6nM/kg		대조군-TCB 2.6nM/kg	
	중간 TV	TG (%)	중간 TV	TG (%)	중간 TV	TG (%)	중간 TV	TG (%)
19일	327	100	287	87.8	303	92.7	285	87.2
23일	481	100	395	82.1	560	116.4	461	95.8
27일	870	100	443	50.9	886	101.8	780	89.7
30일	1094.5	100	219	20.0	1256	114.8	1118	102.1
34일	1521	100	65.5	4.3	1689.5	111.1	1563	102.8
37일	2030	100	38	1.9	2082	102.6	1253.5	61.7
40일	1469	100	39.5	2.7	1735	118.1	1952	132.9
43일	1771	100	32.5	1.8	807	45.6	1598.5	90.3
47일	/	/	15	/	/	/	2359.5	/
51일	/	/	19	/	/	/	/	/

[0579]

[0580]

실시예 18: PBMC-인간화 NOG 마우스에서 RPMI-8226 인간 골수종 이종이식 모델에서 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종 특이적 항체에 의해서 유발된 항종양 활성

[0581]

H929 골수종 세포주에 대해서 대안적으로, 표면 BCMA의 발현 수준이 H929보다 더 낮고, 1차 골수종 세포 상에서 검출된 수준을 보다 대표하는 인간 골수종 RPMI-8226 세포주를 종양 이종이식편으로서 사용한다. 간략하면, 연구 0일(d0)에, 50:50 마트리겔을 함유하는 200 μ l의 0.9% NaCl 용액(비디 바이오사이언시스, 프랑스 소재) 중의 10 x 10⁶ 내지 20 x 10⁶ 개의 인간 골수종 세포주 RPMI-8226(ATCC® CCL-155™)을 8 내지 10주령의 면역결핍성 NOD/Shi-scid IL2r 감마(null)(NOG) 암컷 마우스(타코닉, Ry, 덴마크 소재)의 우측 옆구리에 피하(SC) 주사한다. RPMI-8226 종양 세포주 SC 이식 24시간 내지 72시간 전에, 모든 마우스를 g-공급원(1.44 Gy, ⁶⁰Co, 바이오맵(BioMep), 프랑스 브레테니에레스 소재)으로 전신 조사하였다. 종양 부피가 적어도 100 내지 150mm³에 도달된 직후에 9일(d9) 내지 45일(d45)에 NOG 마우스에게 2 x 10⁷ 개의 인간 PBMC의 단일 복강내(IP) 주사를 제공한다 (500 μ l PBS 1X pH7.4). 인간 PBMC의 특징 규명을 면역 면역형검사(유세포 분석법)에 의해서 수행한다. 이어서 비보 매니저® 소프트웨어(바이오시스템스, 프랑스 카우터는 소재)를 사용하여 마우스를 주위 깊게 상이한 치료군 및 대조군으로 무작위화하고(n=9/군), 통계학적 시험(분산 분석)을 수행하여 군들 간의 동질성에 대해서 시험한다. 인간 PBMC IP 주사 후 적어도 24시간 내지 48시간에 그리고 종양 부피가 모든 마우스에서 적어도 100 내지 150mm³에 도달한 후 항체 치료를 시작한다. TCB 항체 치료 스케줄은 이전 약동학적 결과를 기초로고 하고,

최대 3주 동안 꼬리 정맥을 통한 주 1회 또는 2회 TCB 항체 총 3회 주사)로 이루어졌다. 혈액 샘플을 각각의 치료 1시간 전, 제2 치료 2시간 전 및 종료 시에 경정/하악 정맥 천자(마취 하에서)에 의해서 수집한다. 혈액 샘플을 즉시 응고 활성인자 함유 튜브(T MG 튜브, 선홍색 뚜껑, 카피젝트®, 테루모®)로 즉시 옮긴다. 튜브를 실온에서 30분 동안 방치하여 응고를 허용한다. 이어서 혈병/혈청 분리를 위해서 튜브를 1,300g로 5분 동안 원심분리한다. 혈청 분취물을 제조하였고, 액체 질소 중에서 플래쉬 동결시키고, 추가 분석 시까지 -80°C에서 저장한다. 연구 동안 종양 부피(TV)를 캘리퍼에 의해서 측정하고, TV의 군간 비교에 의해서 진행을 평가한다. 저해로서 정의된 바와 같은 종양 성장의 백분율 TG(%)는 $TG (\%) = 100 \times (\text{분석된 군의 중간 TV}) / (\text{대조군 매개체 치료군의 중간 TV})$ 를 계산함으로써 결정된다.

[0582] PBMC-인간화 NOG 마우스에서 RPMI-8226 인간 골수종 이종이식의 모델 개발을 먼저 수행하여 이종이식 모델이 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이종특이적 항체의 시험에 적절하였음을 보장하였다. BCMA⁺-발현 RPMI-8226 MM 세포를 0 일에 NOG 마우스에게 SC로 주사하였다. 22일에, 인간 PBMC를 IP로 주사하였고, 인간 T 세포를 1주 후에 혈액에서 검출할 수 있었다(데이터 나타내지 않음). 도 20에 도시된 바와 같이, 종양 성장 및 체중을 50일까지 측정하였다. 불행하고 예상치 못하게, 이러한 이종이식 모델은 하기 이유로 인해서 항-BCMA/항-CD3 T-세포 이종특이적 항체의 항종양 활성을 시험하기에 적합하지 않은 것으로 드러났다. 1) RPMI-8226 인간 골수종 이종이식편은 PBMC-인간화 NOG 마우스에서 일관되게 성장하지 않았음; 2) RPMI-8226가 이식된 PBMC-인간화 NOG 마우스는 인간 PBMC의 IP 주사 직 후 체중이 줄어들기 시작했는데, 이는 이식편-대 숙주 질환의 징후임. 이들 마우스를 도덕적 이유를 위해서 안락사시켰음; 3) 숙주 마우스의 죽음 시 SC 주사 후 종양 이종이식편에서 BCMA 발현의 손실이 관찰됨.

[0583] 실시예 19: 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종특이적 항체에 의해서 유발된 자가-T-세포의 존재 하에서의 형질 세포 백혈병(PCL)을 갖는 환자의 말초 혈액 단핵 세포 또는 골수 흡인물로부터의 형질 세포의 재지향된 T-세포 세포독성

[0584] 형질 세포 백혈병 (PCL)은 신생 또는 임상적으로 이미 존재하는 다발성 골수종(MM)으로부터 발생하는 골수종의 백혈병 변이종이다. 현재 사용 가능한 치료는 더 제한적이며, 주로 MM 약물과 화학요법의 조합으로 이루어진다. 현재까지 어떤 요법도 이러한 상당히 공격적이고 치명적인 질환을 위해서 명시적으로 등록되어 있지 않다. BCMA는 정상 형질 세포의 생존에 본질적인 역할을 하고, 본 발명에 따른 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종특이적 항체는 상기 질환을 앓고 있는 환자에서 형질 세포 백혈병 치료를 위해서 사용될 수 있다. 높은 백혈구 수치의 80% 초과의 형질 세포를 함유하는 형질 세포 백혈병 환자 샘플로부터의 새로 취한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 피콜(Ficoll) 또는 다른 대등한 방법을 사용하여 밀도 구배에 의해서 분리하고, 24시간 및 48시간 동안 0.1pM 내지 30nM의 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종특이적 항체 농축물 또는 대조군 항체와 함께 37°C 가습 공기 대기에서 배양시킨다. 형질 세포 백혈병 환자로부터의 전체 골수 흡인물을 또한 샘플로서 사용할 수 있다. 각각의 용량 지점을 3회 수행한다. 세포자멸을 디바 소프트웨어(BD)를 사용하여 FACSCalibur 상에서 전체 집단 및 CD138 양성 세포의 아넥신/프로페디움 아이오다이드 염색에 의해서 측정한다. 형질 세포 및 PBMC 전체 집단의 생존력을 유세포 분석법(FACSCalibur; 벡톤 디킨슨)을 사용하여 프로페디움 아이오다이드/CD138FITC 이중 염색에 의해서 조사한다. FACSDiva 소프트웨어(벡톤 디킨슨)를 사용하여 데이터 분석을 수행한다. 평균 값을 각각의 배지 대조군(MC)의 3회 반복에 걸친 평균에 대해서 정규화한다. 통계학적 분석을 위해서, 일축 t시험을 사용한다. 10nM(IMAX10)의 농도에서 PCL 세포 성장의 최대 저해 및 1nM(IMAX1)에서 측정된 저해 각각을 배지 대조군에 대한 백분율로서 제공한다. 배지 대조군과 비교한 대조군-TCB 항체(10 또는 30nM)의 최대 저해를 또한 측정한다. IMAX 값(마이크로소프트 엑셀®; 마이크로소프트 오피스 프로페셔널 2013)의 계산을 제외하고, R 3.1.19, 및 바이오컨터터 2.1310을 사용하여 계산을 수행한다. 이의 상응하는 통계학적 시험의 P값이 5%(*) 미만, 1%(**) 미만 또는 0.1%(***) 미만이면, 효과는 통계학적으로 유의미하다고 간주된다. BCMA 발현을 또한 형질 세포 백혈병 환자 샘플로부터의 PBMC CD138+ 형질 세포 상에서 측정하고, 뿐만 아니라 효과기 세포 대 종양 세포(E:T)비를 결정한다. 도 20에 도시된 바와 같이, 이 결과는 배지 대조군과 비교할 때 2개의 형질 세포 백혈병 환자 샘플에서 42-TCBcv를 사용하여 생존 가능한 골수 형질 세포 백혈병 세포가 상당히 감소되었음(즉, 골수 형질 세포 백혈병 세포의 더 많은 용해)을 명확히 나타낸다. 표 27은 환자 골수 흡인물 또는 말초 혈액으로부터의 형질 세포 백혈병 세포의 최대 저해 백분율이 배지 대조군에 대해서 10nM(IMAX10) 및 1nM(IMAX1) 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종특이적 항체에 의해서 유발되었음을 예증한다. 이 결과는 42-TCBcv가 환자 골수 형질 세포 백혈병 세포의 사멸을 유발하는데 있어서 매우 강력함을 입증한다. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이종특이적 항체 및 관찰된 골수 샘플(PCL 환자 1)에 의해서 유발된 골수 형질 세포 백혈병 세포의 특이적 용해에도 불구하고, 골수 미세환경(BMME)은 각각의 샘플에서 영향을 받지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0585] [표 27. 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 존재하에서 환자 골수 흡인물로부터의 프로페디움 아이오다이드 음성 생존 가능한 형질 세포 백혈병 세포를 기준으로 10nM(IMAX10)에서의 형질 세포 백혈병 형질 세포 정상의 최대 저해 및 1nM(IMAX1)에서의 저해에 관련된 IMAX10 및 IMAX1 값]

환자 샘플 번호	42-TCBcv		대조군-TCB IMAX10 (%)
	IMAX10 (%)	IMAX1 (%)	
1	99.6	88.2	-2.7
2	~60.0	~40.0	~8.0

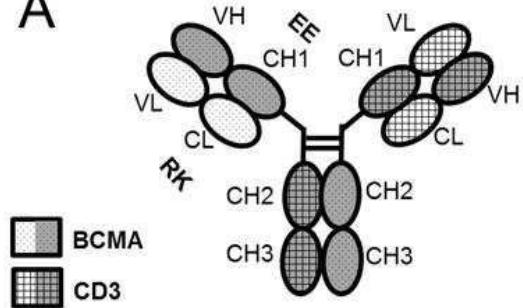
[0586] [0587] 실시예 20: 유세포 분석법에 의해서 측정된 바와 같은 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체에 의해서 유발된자가 T 세포의 존재 하에서의 AL 아밀로이드증을 갖는 환자로부터의 골수 형질 세포의 재지향된 T-세포 세포독성

[0588] AL 아밀로이드증은 50 내지 80세인 인간(그 환자의 2/3는 남성)에 통상적으로 영향을 주는 골수의 장애에 의해서 유발되는 희귀 질환이다. AL 아밀로이드증은 형질 세포에 의한 형질 세포에 의한 항체/면역글로불린 단백질의 비정상적인 생산에 의해서 반영된다. AL 아밀로이드증에서, 항체의 경쇄(LC)는 잘못 폴딩되고(misfolded), 비정상적인 LC 잘못 폴딩된 단백질 결과가 아밀로이드의 형성이다. 이러한 잘못 폴딩된 아밀로이드 단백질은 조직, 신경 및 기관 및 그 주변에 침착된다. 이러한 아밀로이드가 기관, 신경 또는 조직에 축적될 때, 그것은 서서히 손상을 유발하고 이들의 기능에 영향을 미친다. AL 아밀로이드증을 갖는 환자는 종종 하나를 초과하는 기관에서 영향을 받는다. BCMA는 정상 형질 세포의 생존에서 본질적인 역할을 하기 때문에, AL 아밀로이드증에서 형질 세포를 사멸시키는 데 있어서 항-BCMA/항-CD3 T 세포 이중특이적 항체의 효과를 평가하는 것이 매우 정당하다. 새로 취한 AL 아밀로이드증 환자 전체 골수 샘플/흡인물을 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체에 직접 노출시키거나 또는 CD138 자성 마이크로비드(밀테니이 바이오테크, 독일 베기쉬 글라트바흐 소재)로 염색하고, 오토MACS 세포 분리 칼럼을 통해서 통과시키고, 통상적으로 4% 초과의 AL 아밀로이드증 형질 세포의 충분한 잔류하는 수를 갖는 수집된 분획을 추가 실험을 위해서 사용한다. 24홈 판에서, 500,000개 세포/홈을 배양시키고, 48시간 동안 배양한다. 항-BCMA/항-CD3 TCB 항체 및 대조군 항체 희석물을 0.1pM 내지 30nM 범위의 최종 TCB 농도를 위해서 각각의 홈에 첨가한다. 각각의 용량 지점을 3회 수행한다. 형질 세포 및 골수 미세환경의 세포의 생존력을 유세포 분석법(FACSCalibur; 벡톤 디킨슨)을 사용하여 프로페디움 아이오다이드/CD138FITC 이중염색에 의해서 조사한다. FACSDiva 소프트웨어(벡톤 디킨슨)를 사용하여 데이터 분석을 수행한다. 평균 값을 각각의 배지 대조군(MC)의 3회 반복에 걸친 평균에 대해서 정규화한다. 통계학적 분석을 위해서, 일축 t시험을 사용한다. 10nM(IMAX10)의 농도에서 PCL 세포 성장의 최대 저해 및 1nM(IMAX1)에서 측정된 저해 각각을 배지 대조군에 대한 백분율로서 제공한다. 배지 대조군과 비교한 대조군-TCB 항체(10 또는 30nM)의 최대 저해를 또한 측정한다. IMAX 값(마이크로소프트 엑셀®; 마이크로소프트 오피스 프로페셔널 2013)의 계산을 제외하고, R 3.1.19, 및 바이오컨터 2.1310을 사용하여 계산을 수행한다. 이의 상응하는 통계학적 시험의 P값이 5%(*) 미만, 1%(**) 미만 또는 0.1%(***) 미만이면, 효과는 통계학적으로 유의미하다고 간주된다. BCMA 발현을 또한 AL 아밀로이드증 환자 샘플로부터의 골수 CD138+ 형질 세포 상에서 측정하고, 뿐만 아니라 효과기 세포 대 종양 세포(E:T)비를 결정한다.

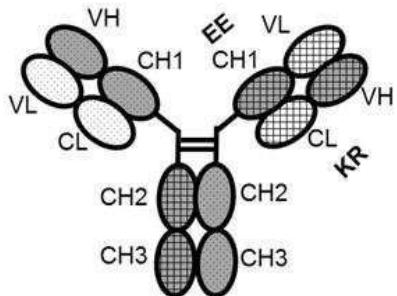
도면

도면1

A

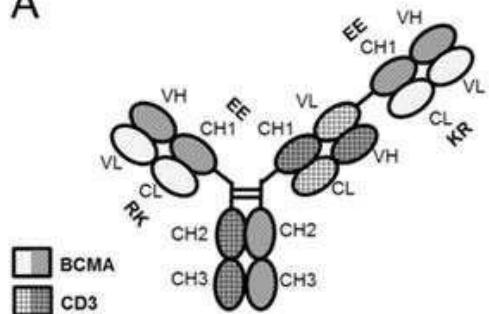


B

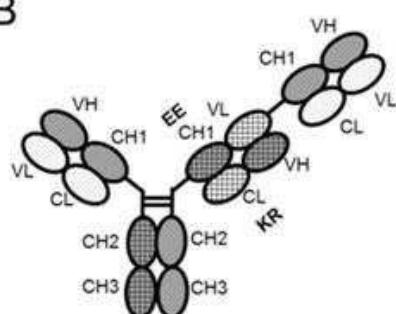


도면2

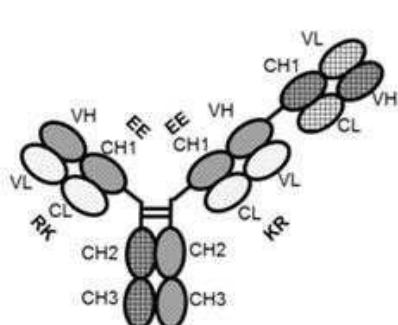
A



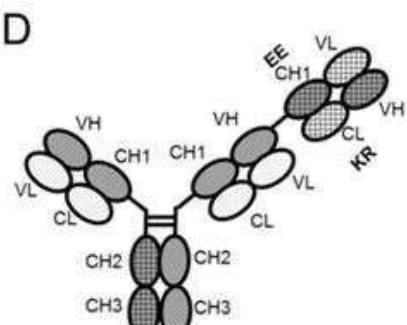
B



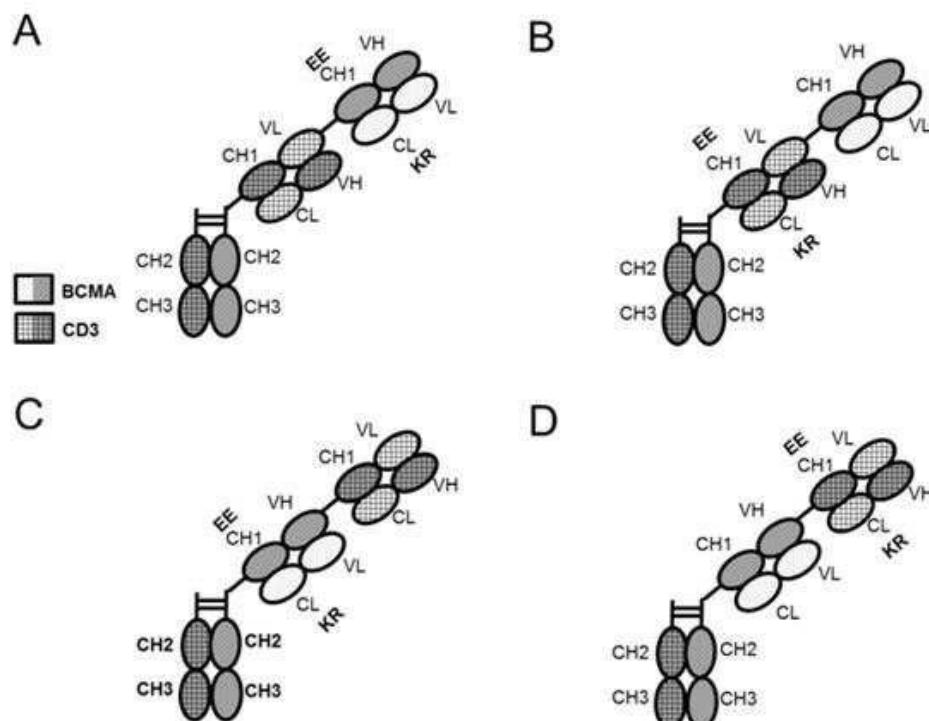
C



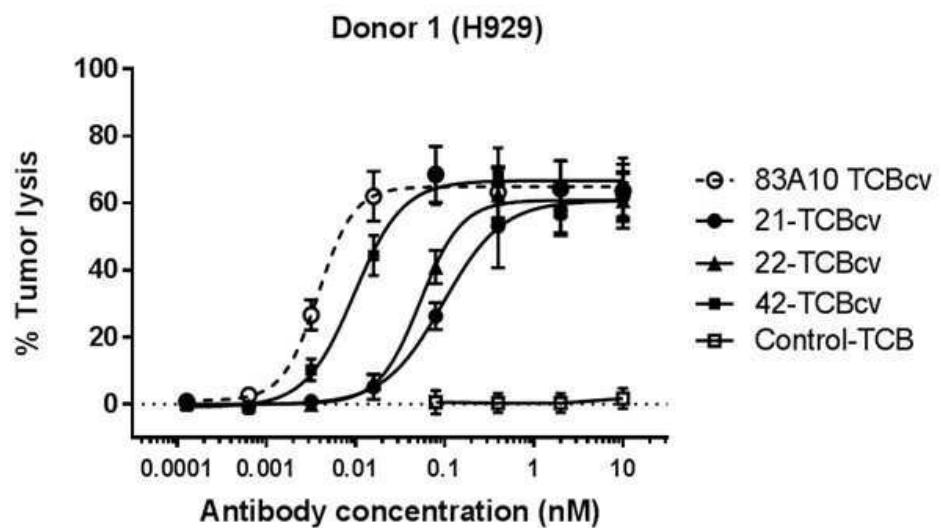
D



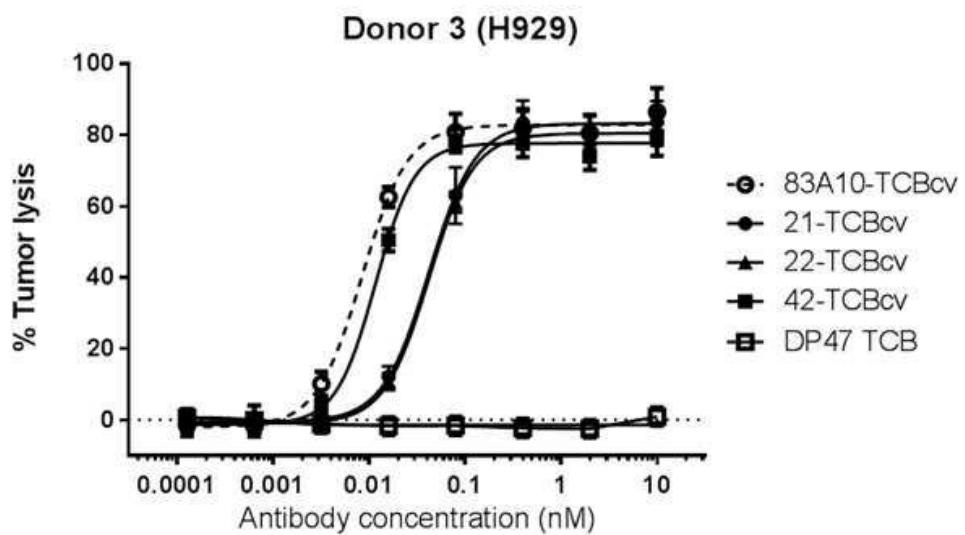
도면3



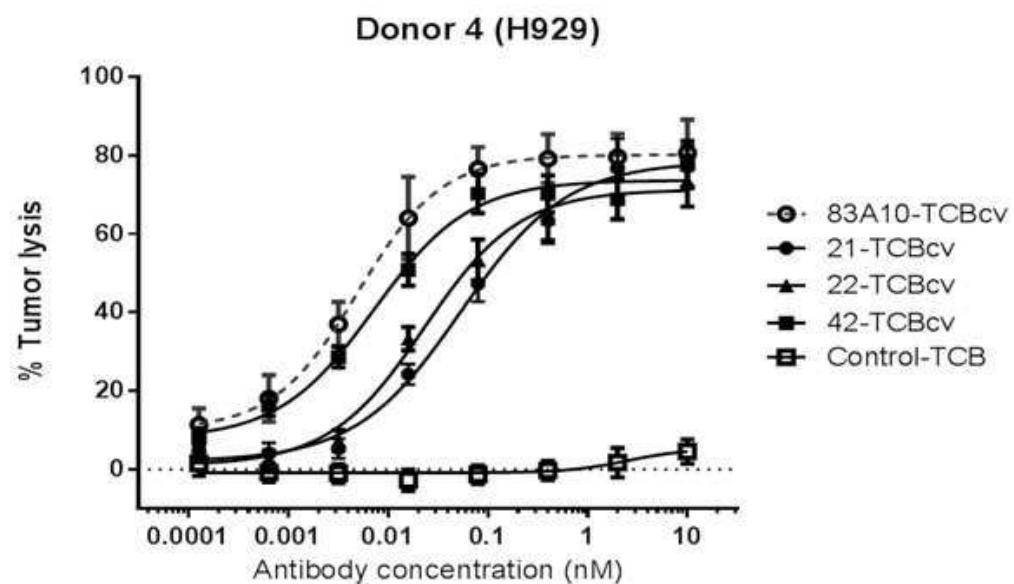
도면4a



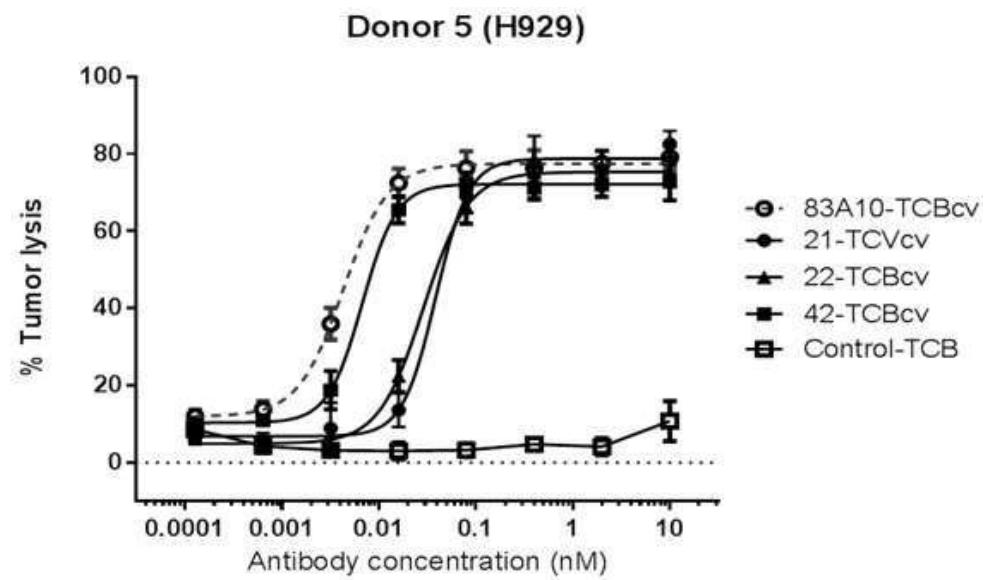
도면4b



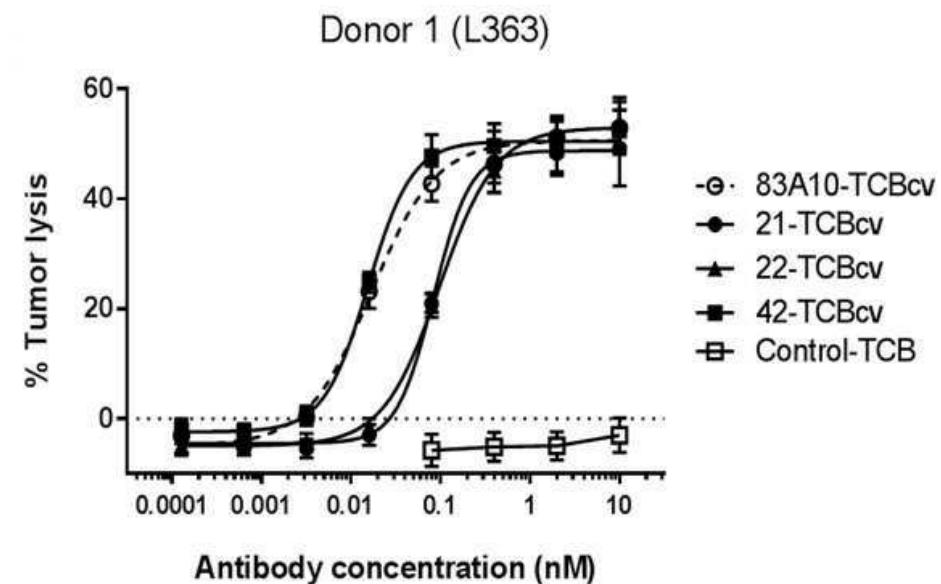
도면4c



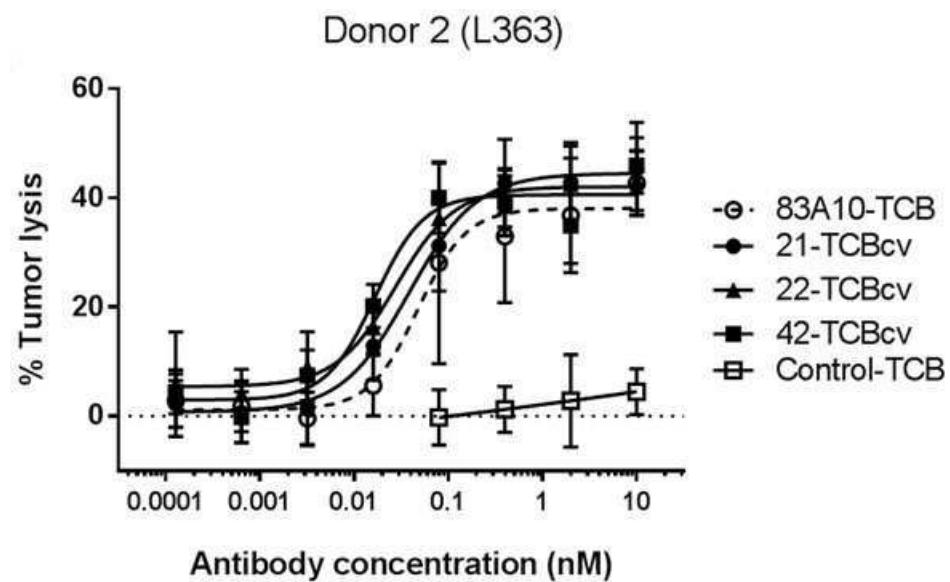
도면4d



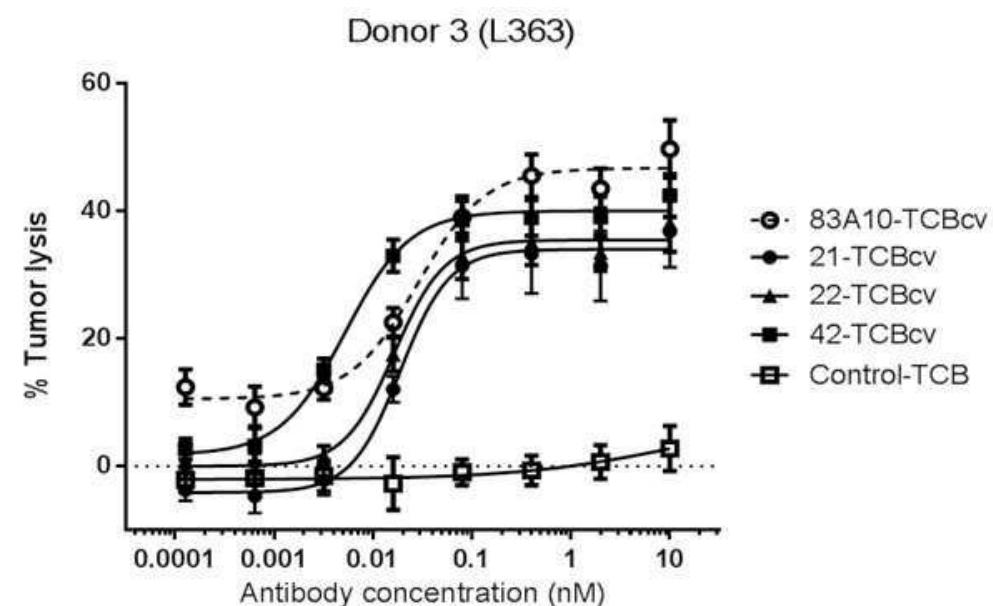
도면5a



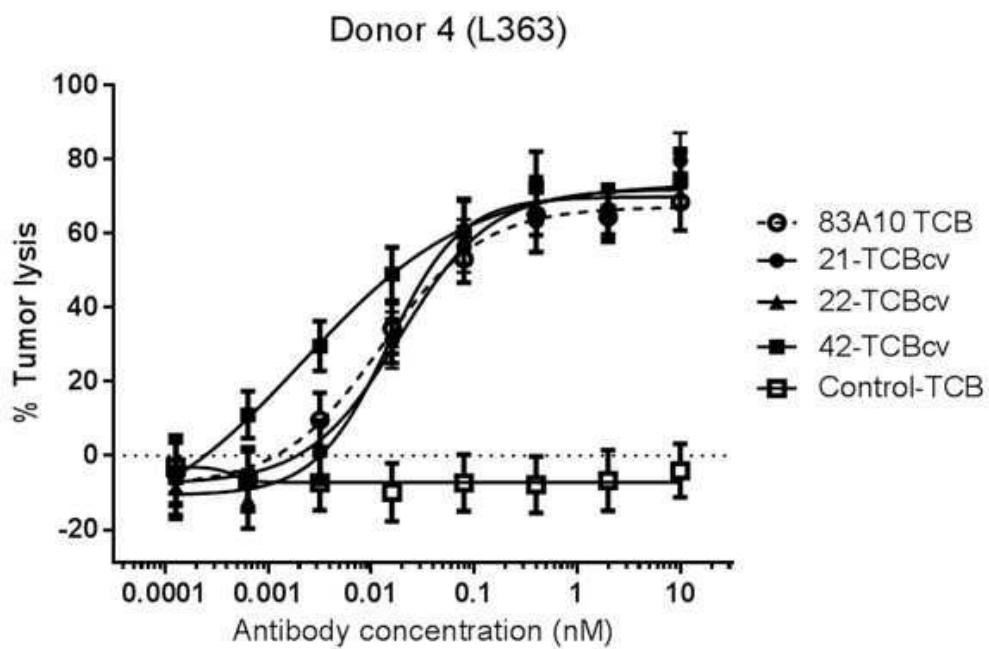
도면5b



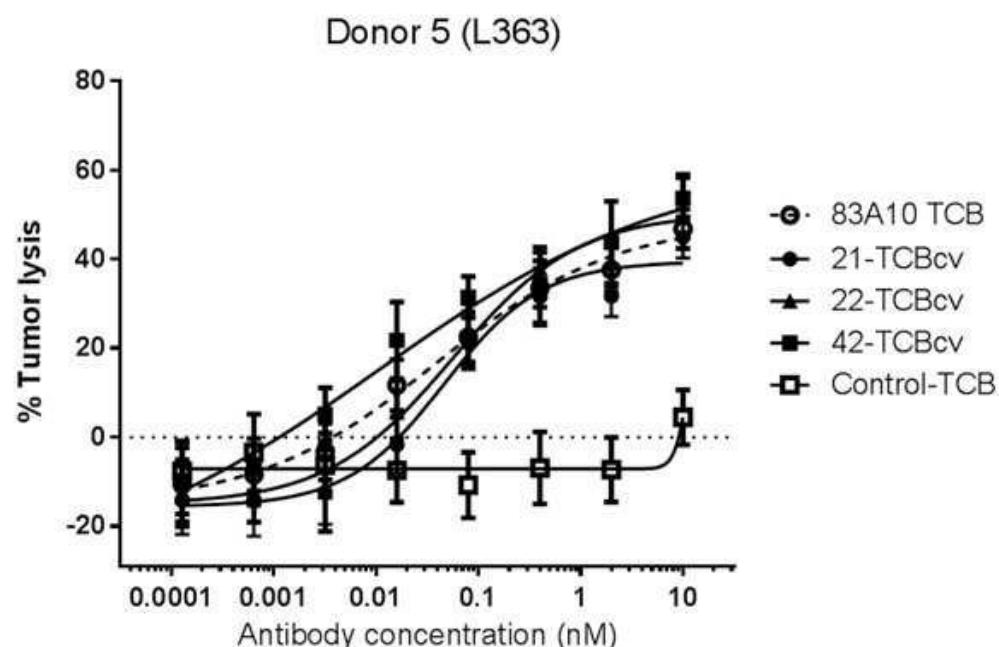
도면5c



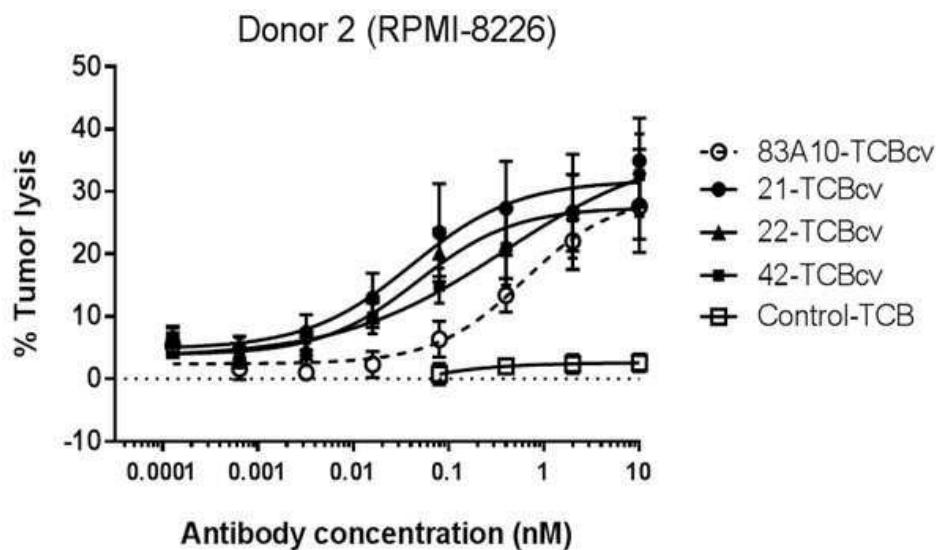
도면5d



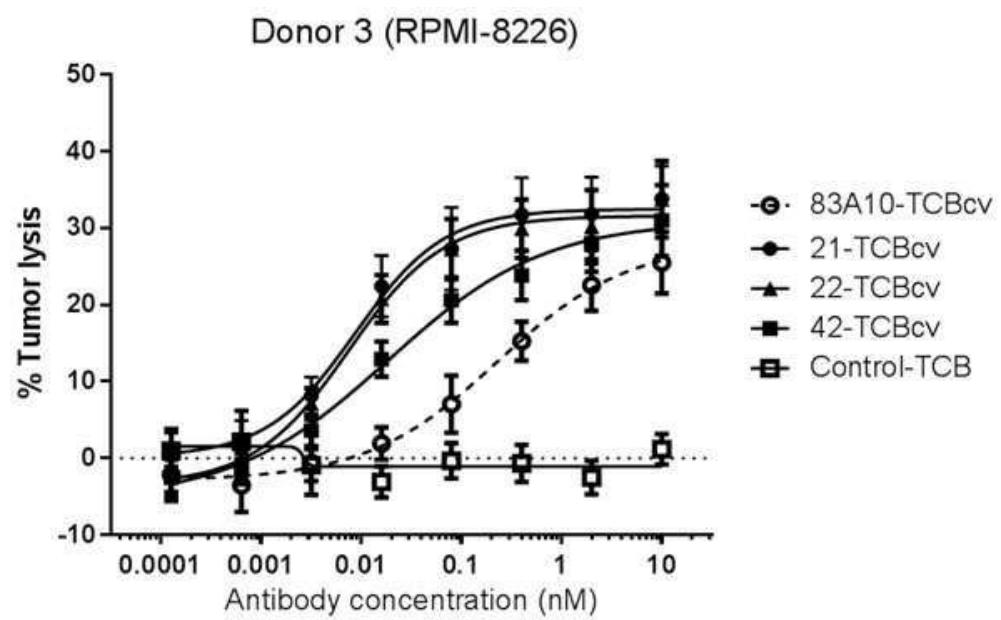
도면5e



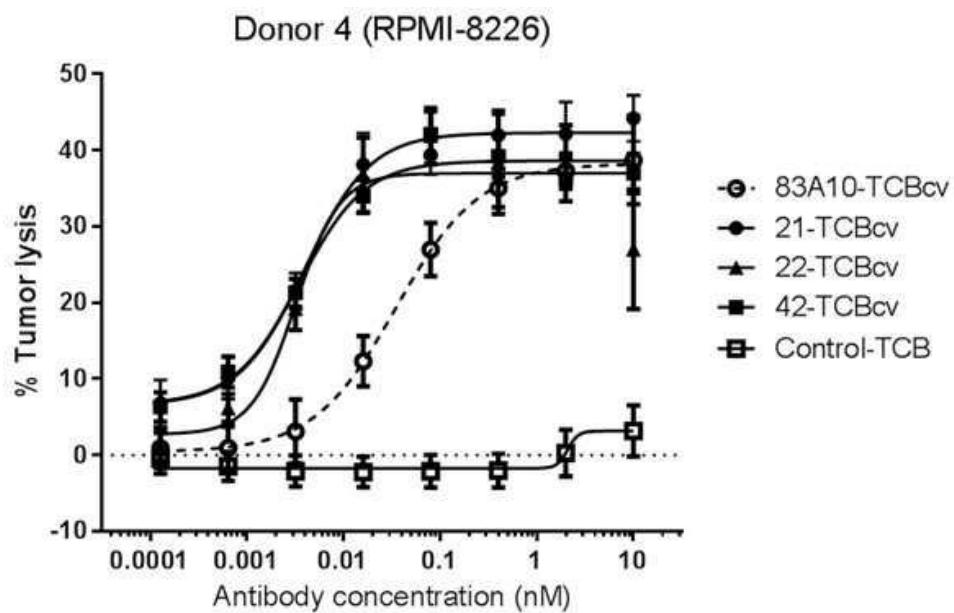
도면6a



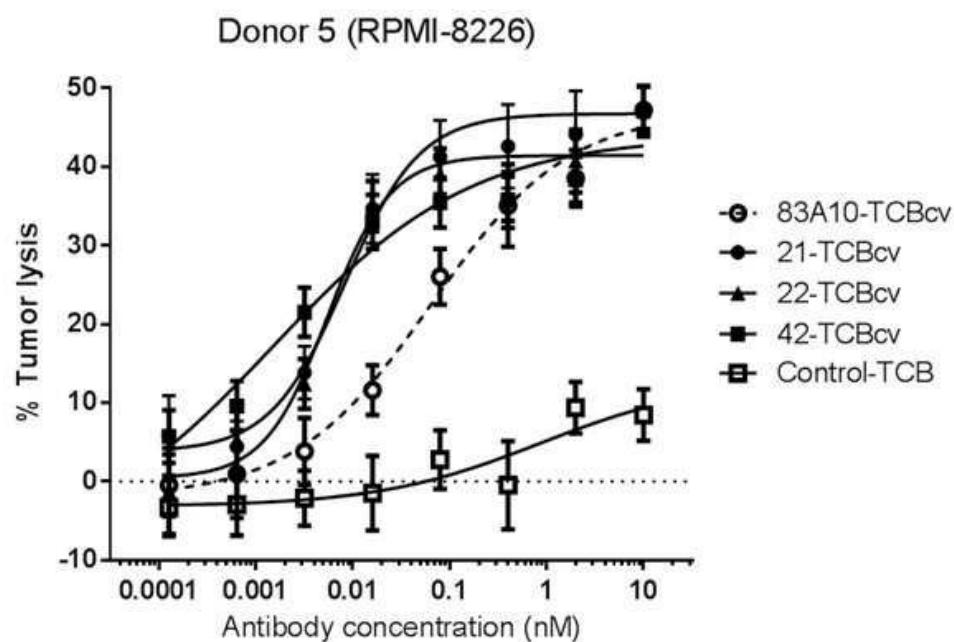
도면6b



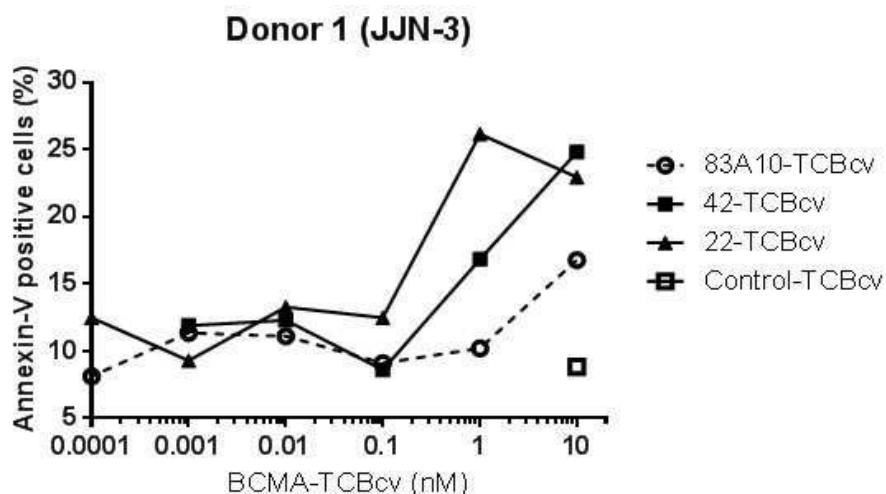
도면6c



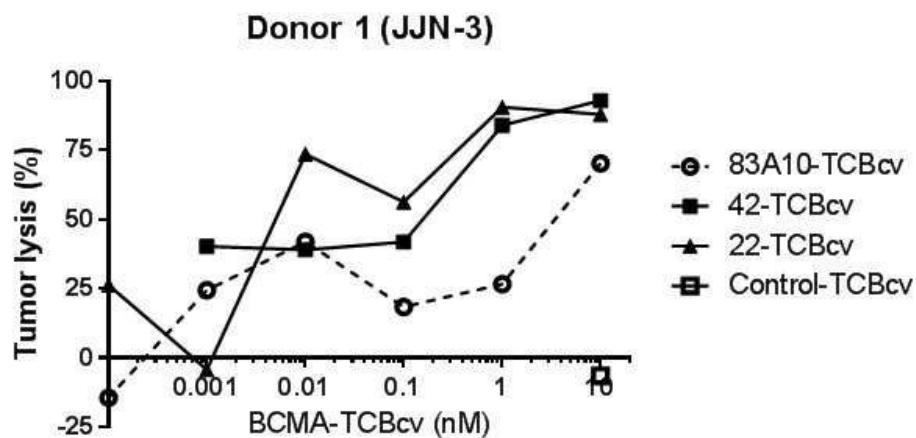
도면6d



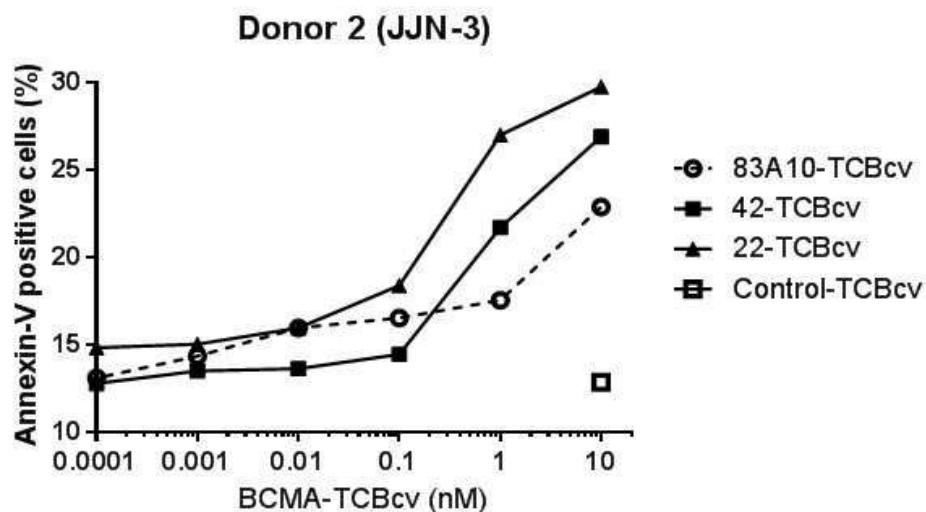
도면7a



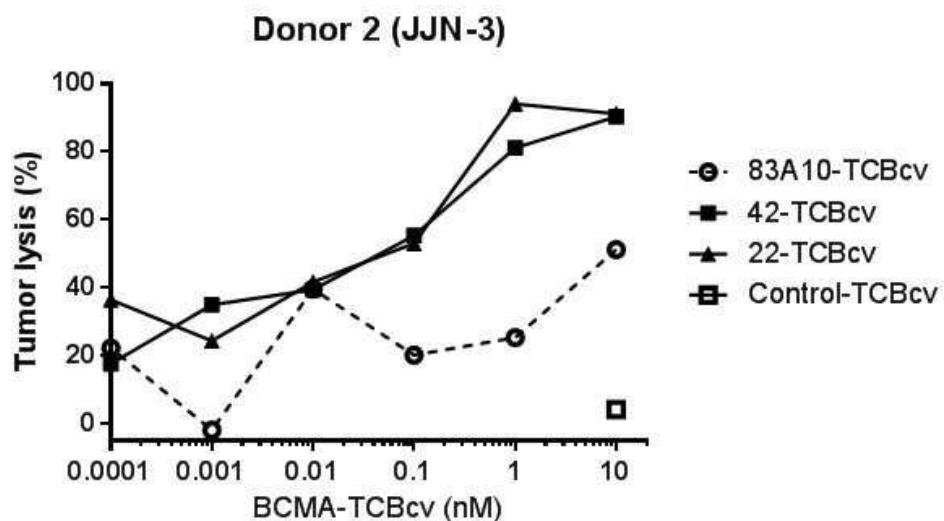
도면7b



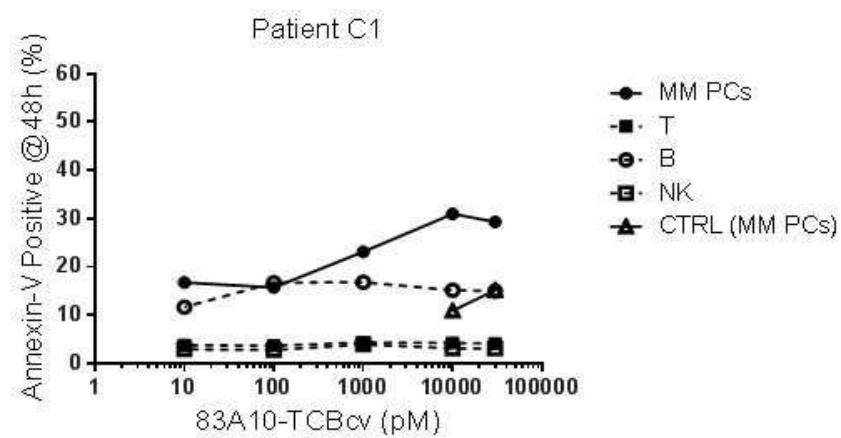
도면7c



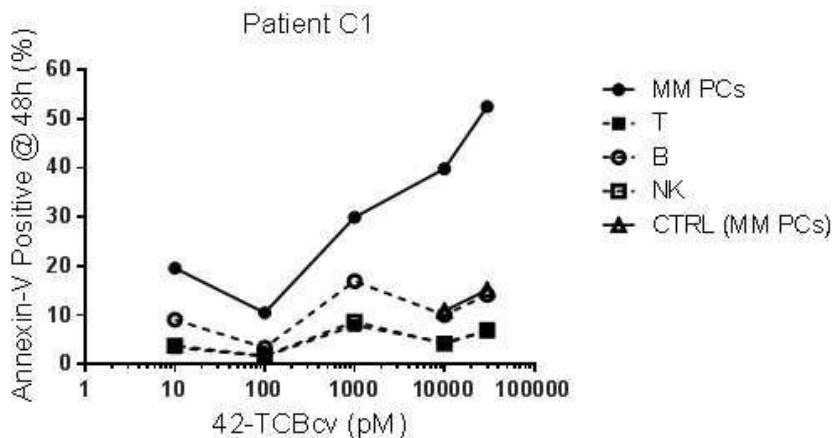
도면7d



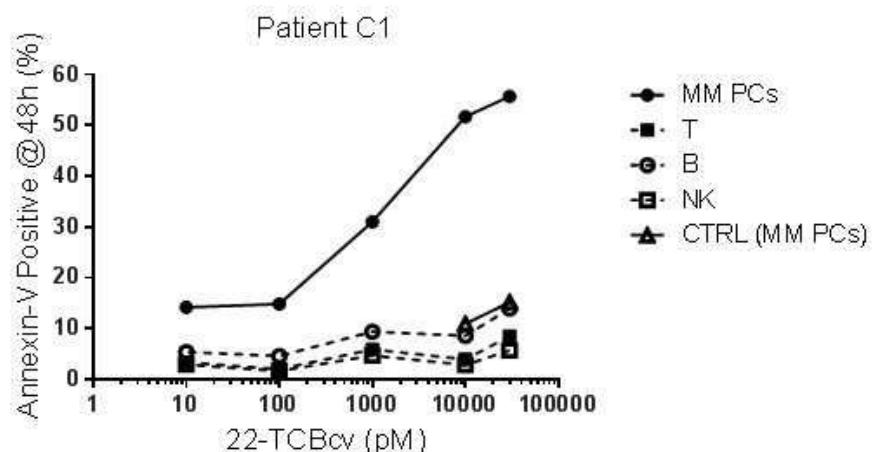
도면8a



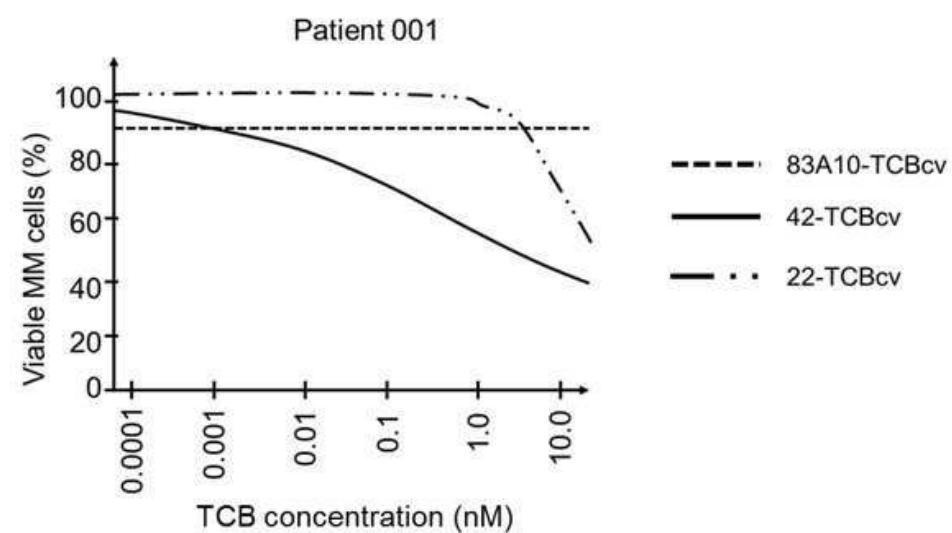
도면8b



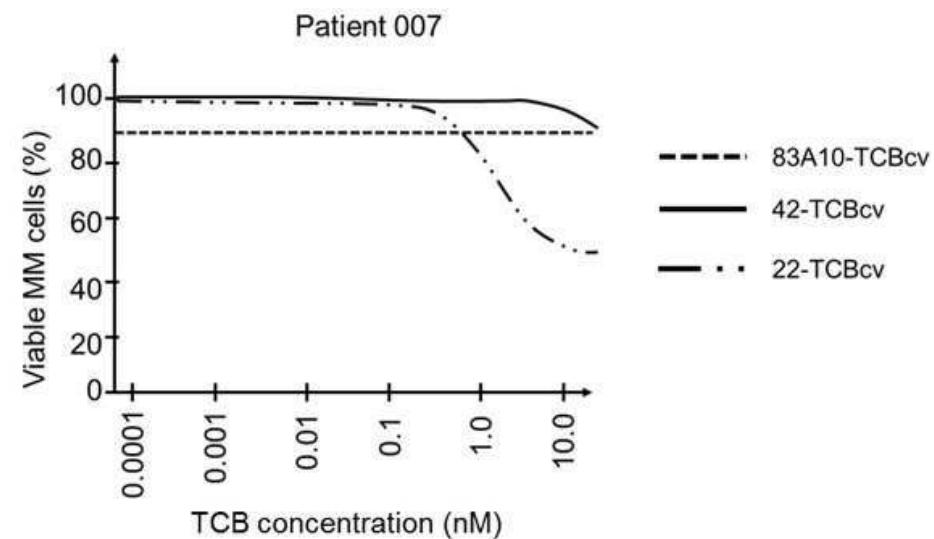
도면8c



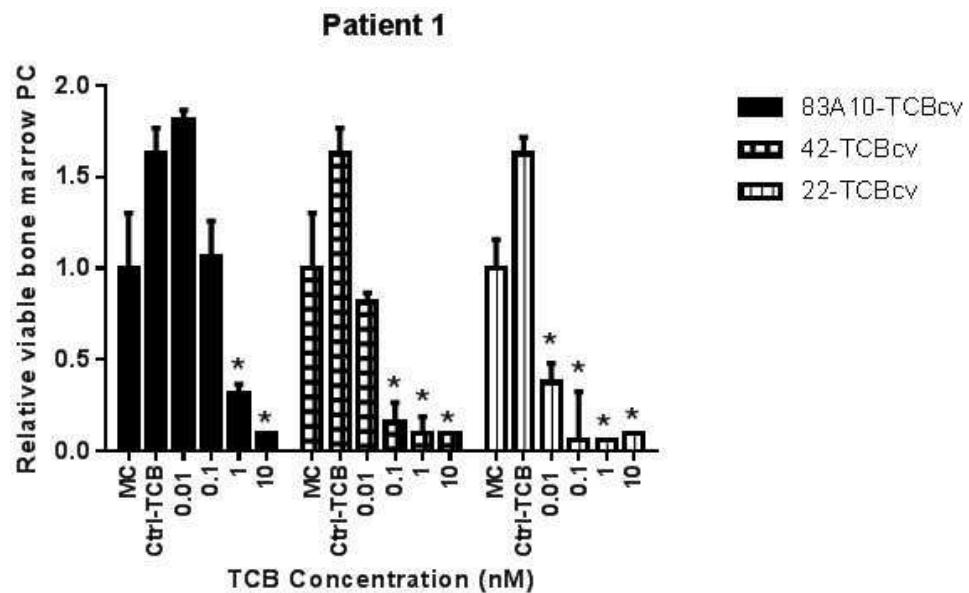
도면9a



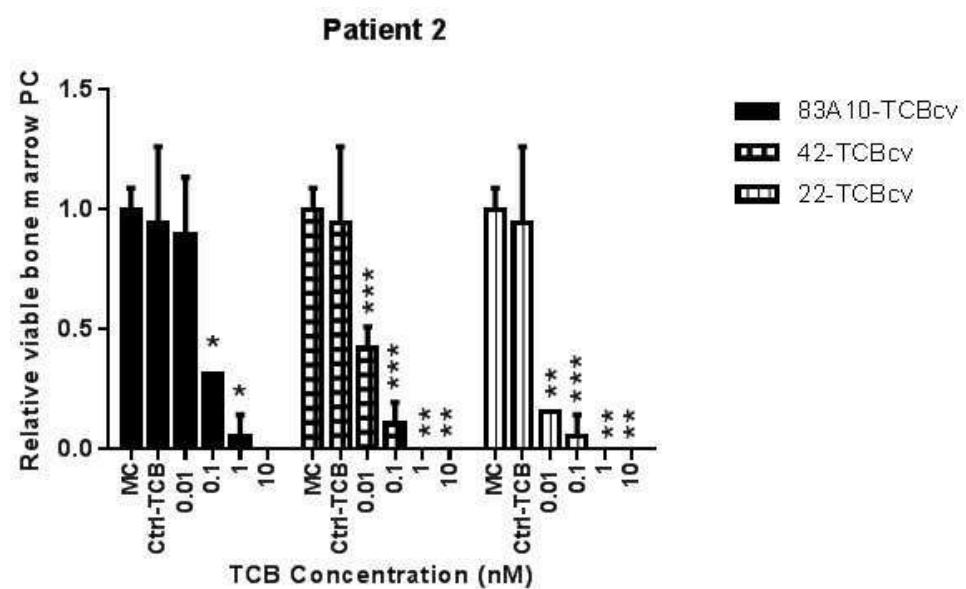
도면9b



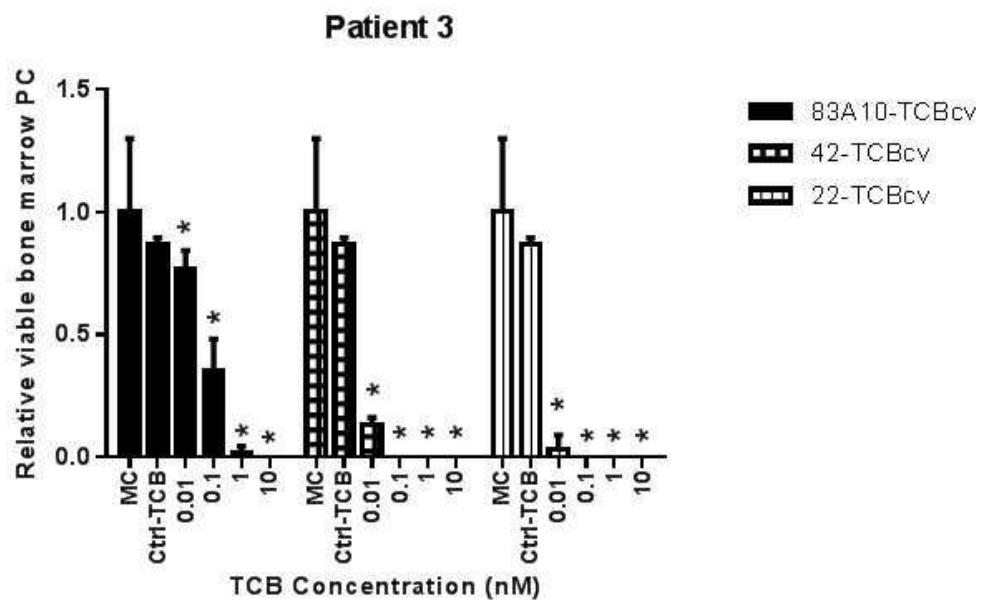
도면10a



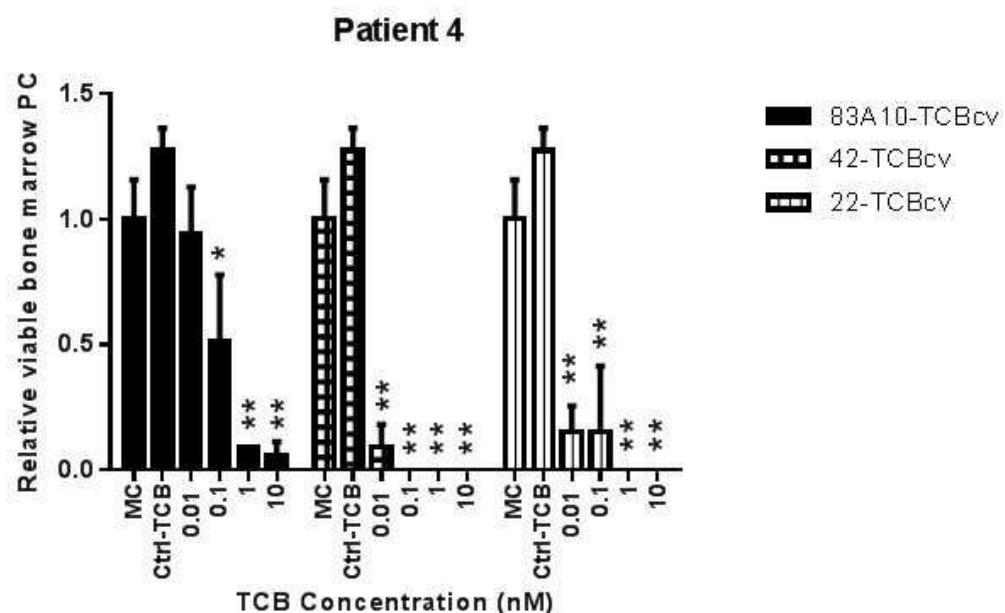
도면10b



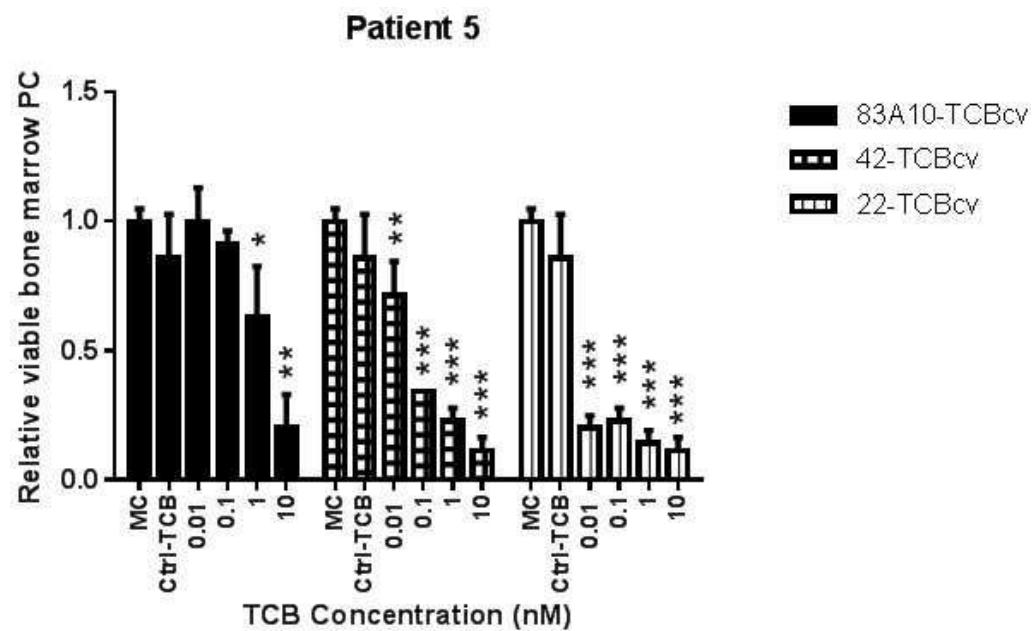
도면10c



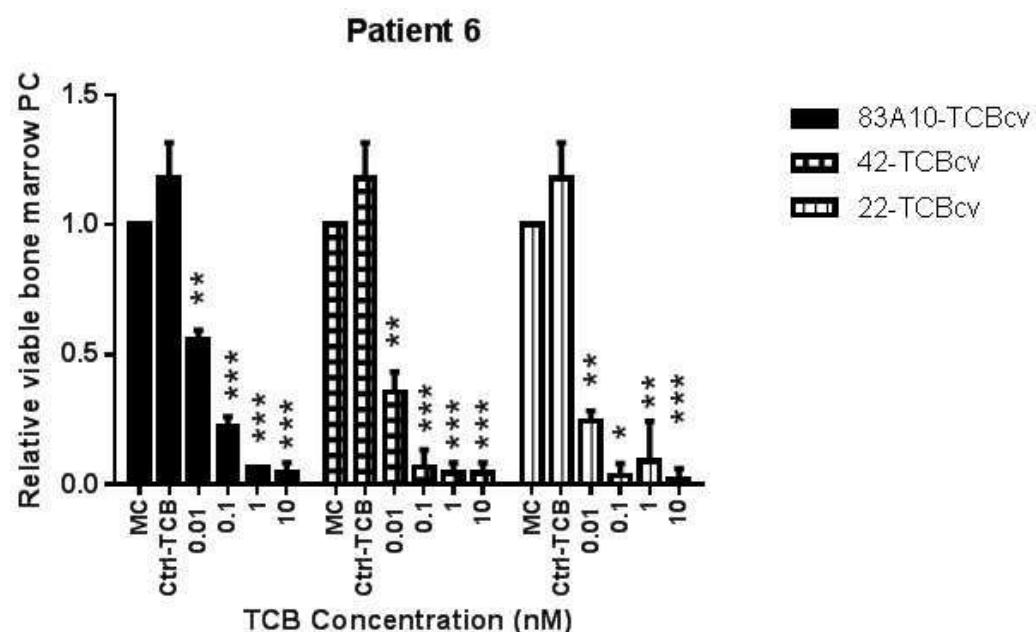
도면10d



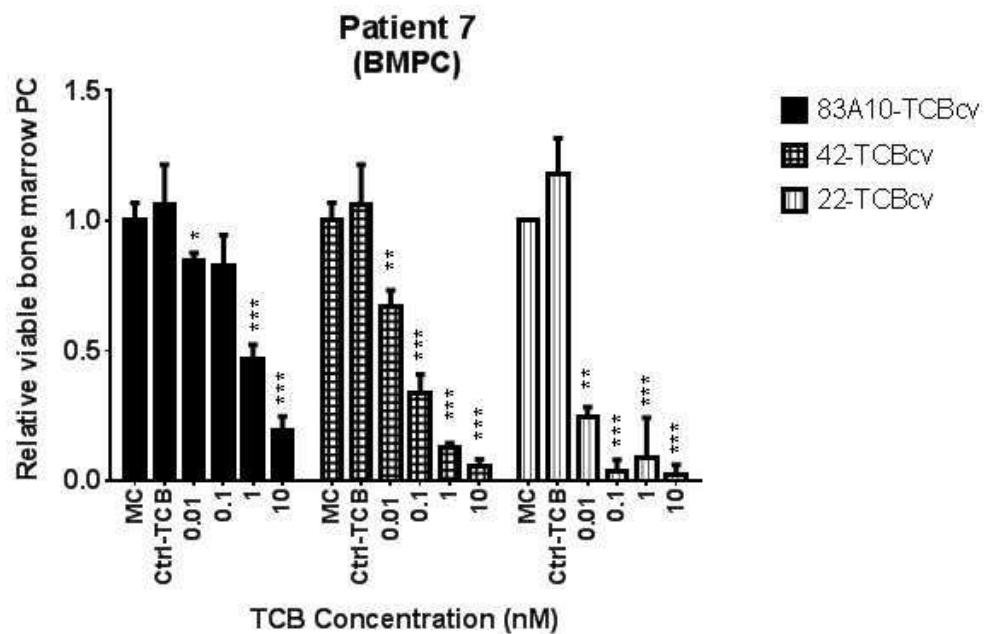
도면10e



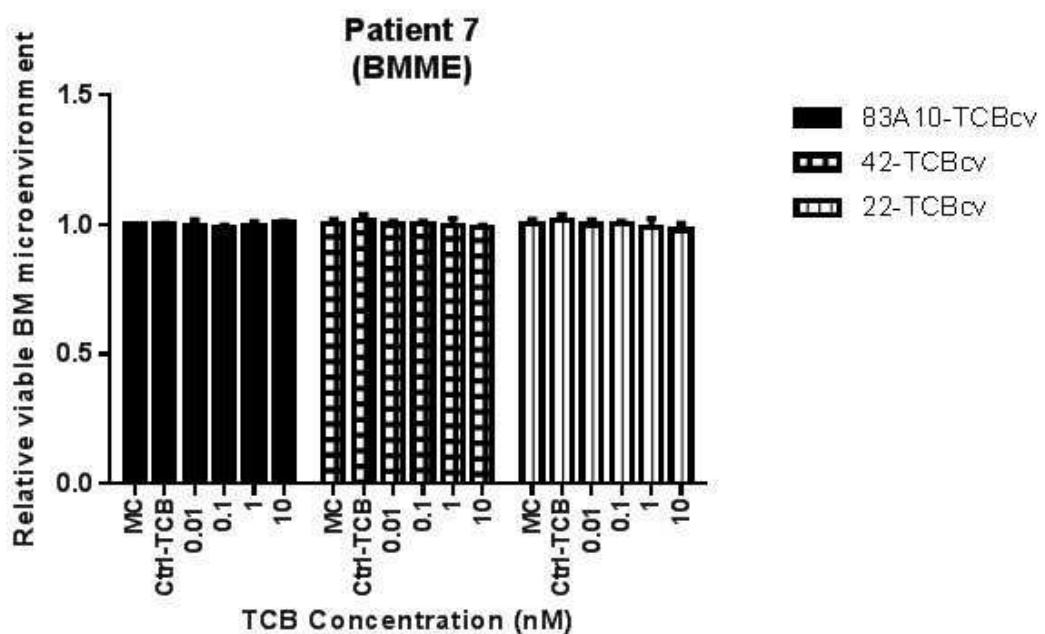
도면10f



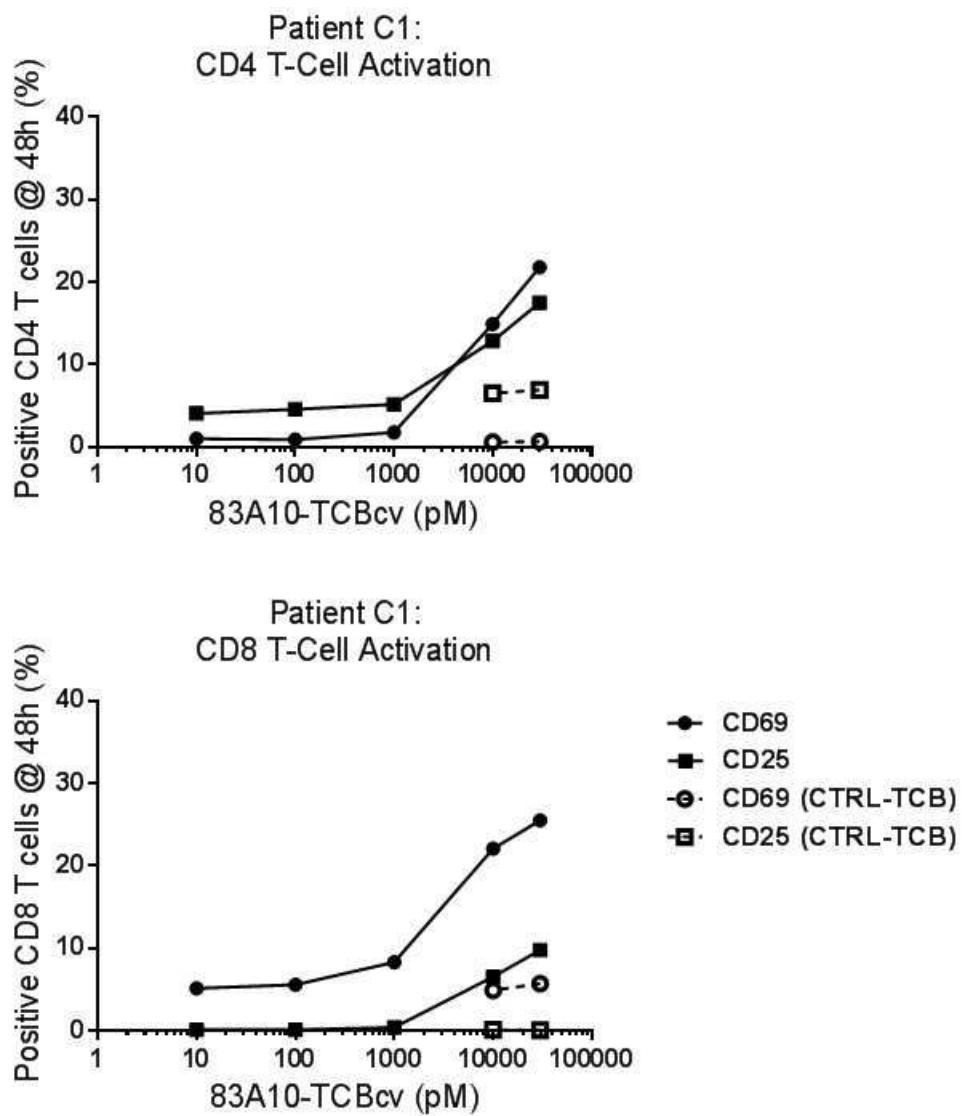
도면10g



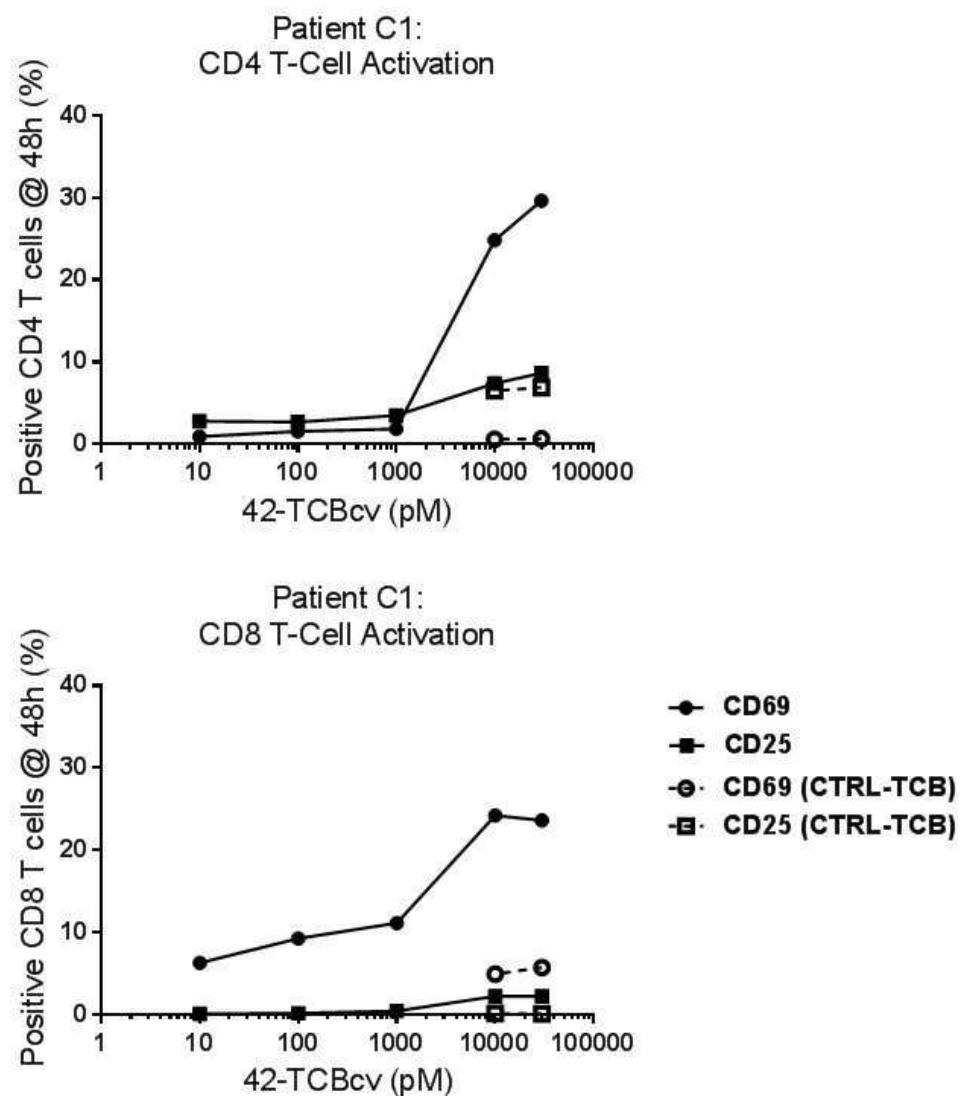
도면10h



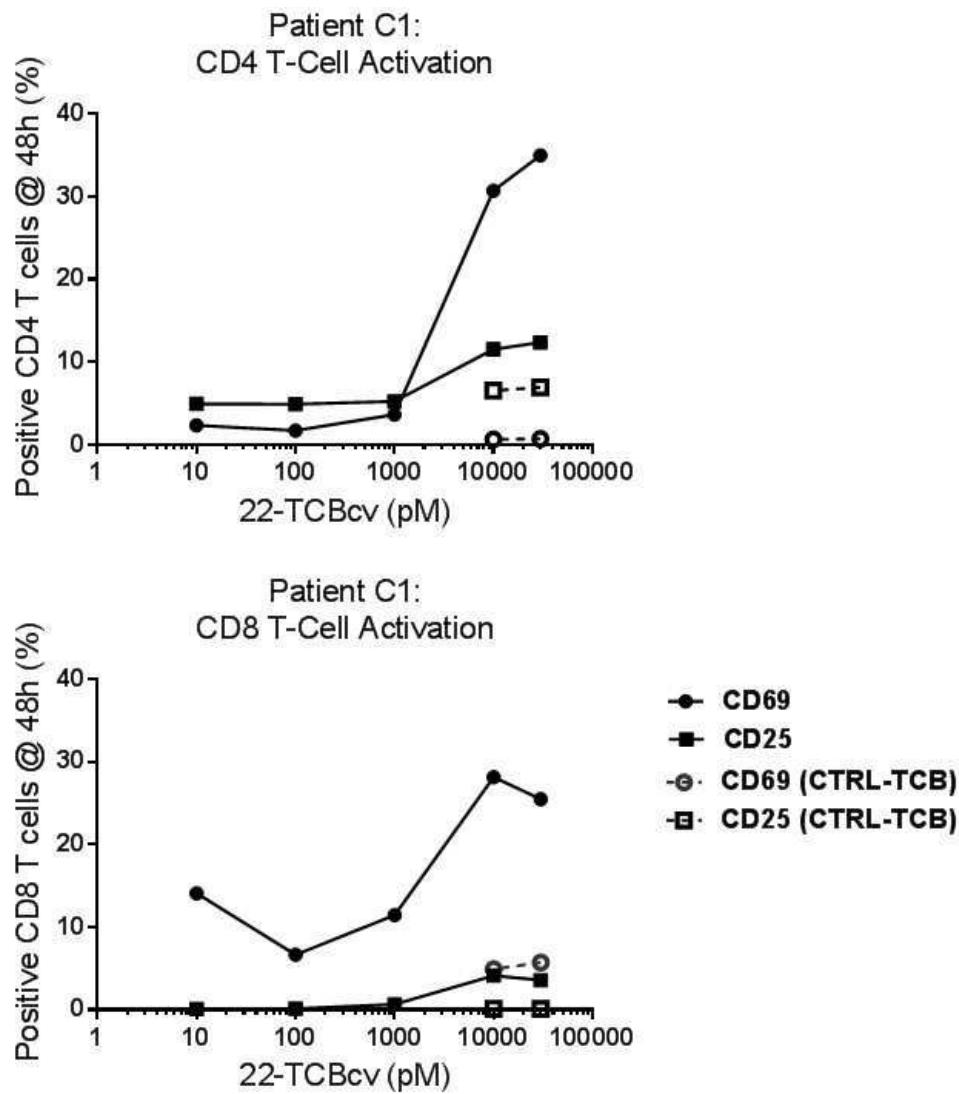
도면11a



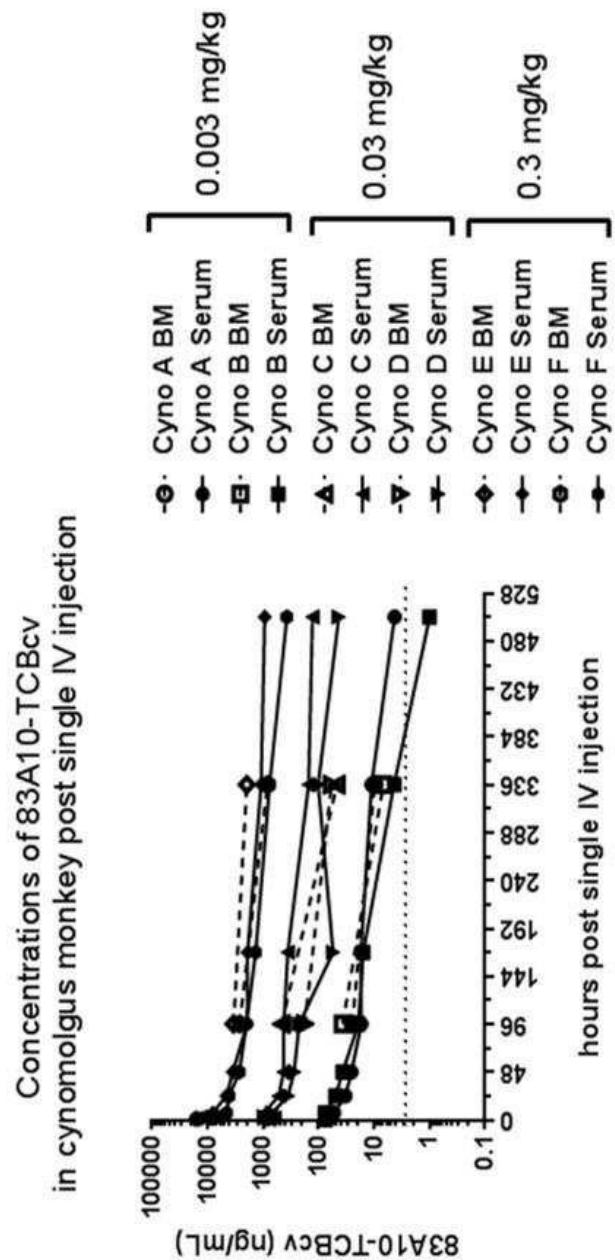
도면 11b



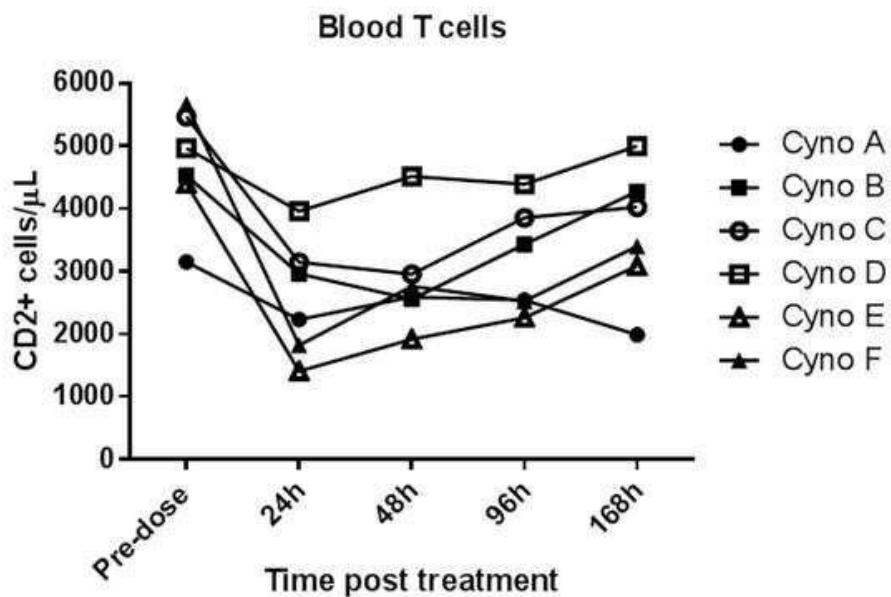
도면11c



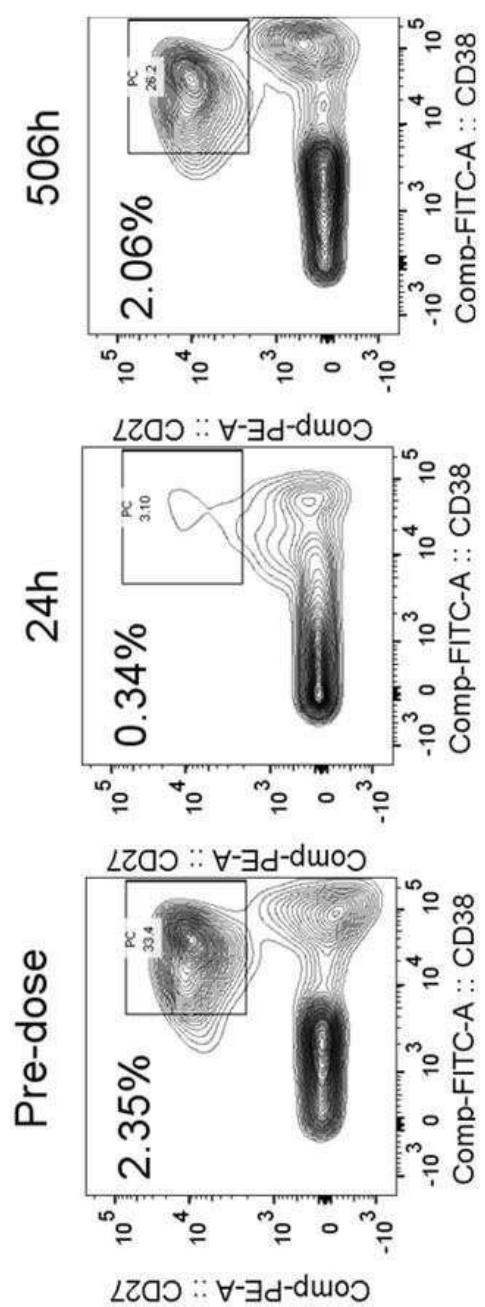
도면12



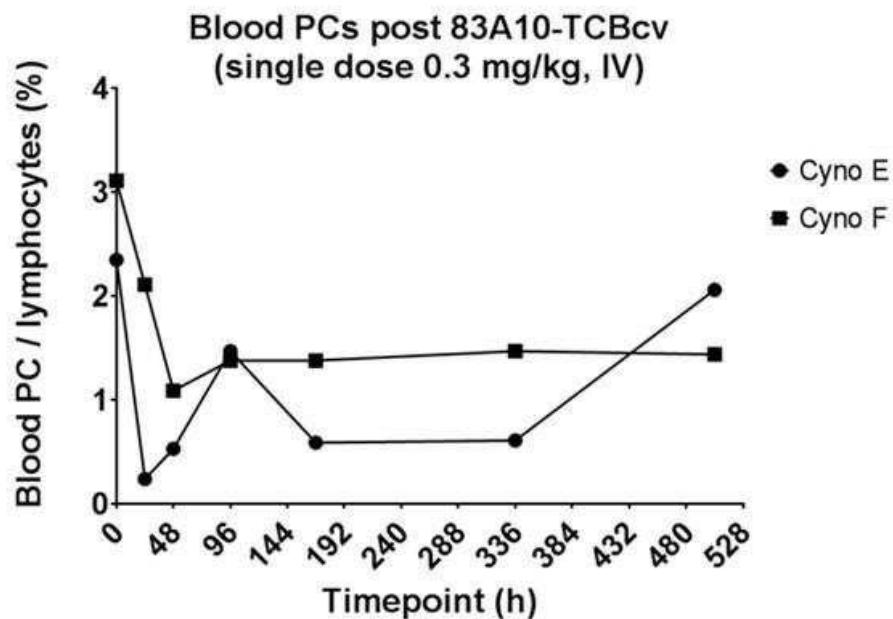
도면13



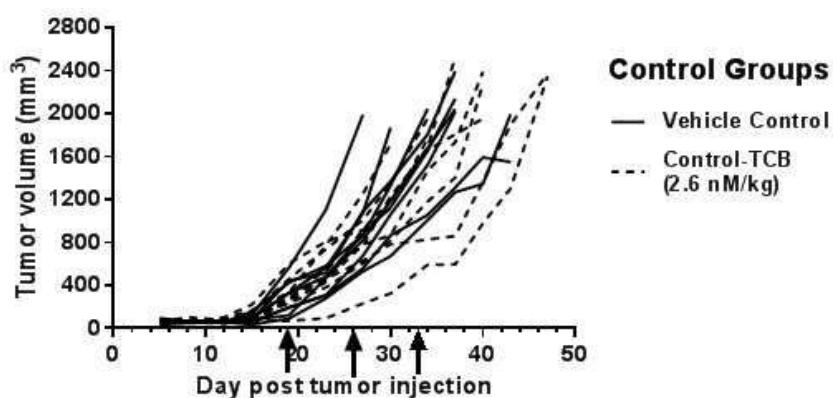
도면 14a



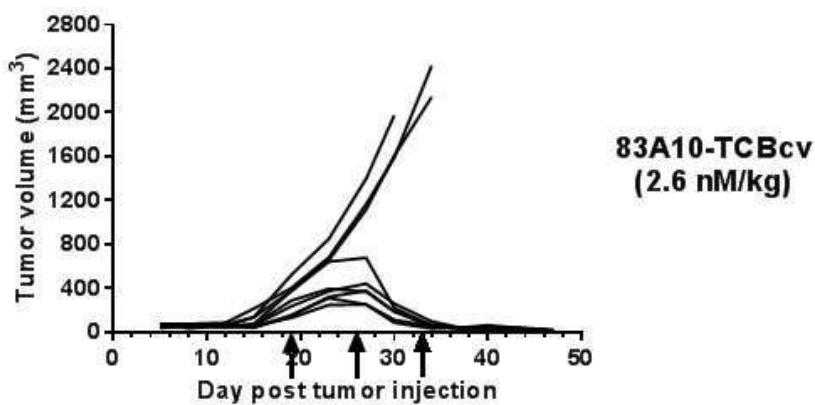
도면14b



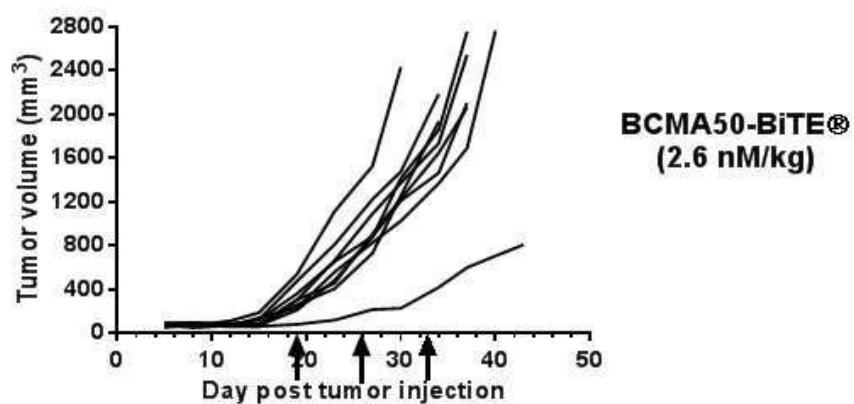
도면15a



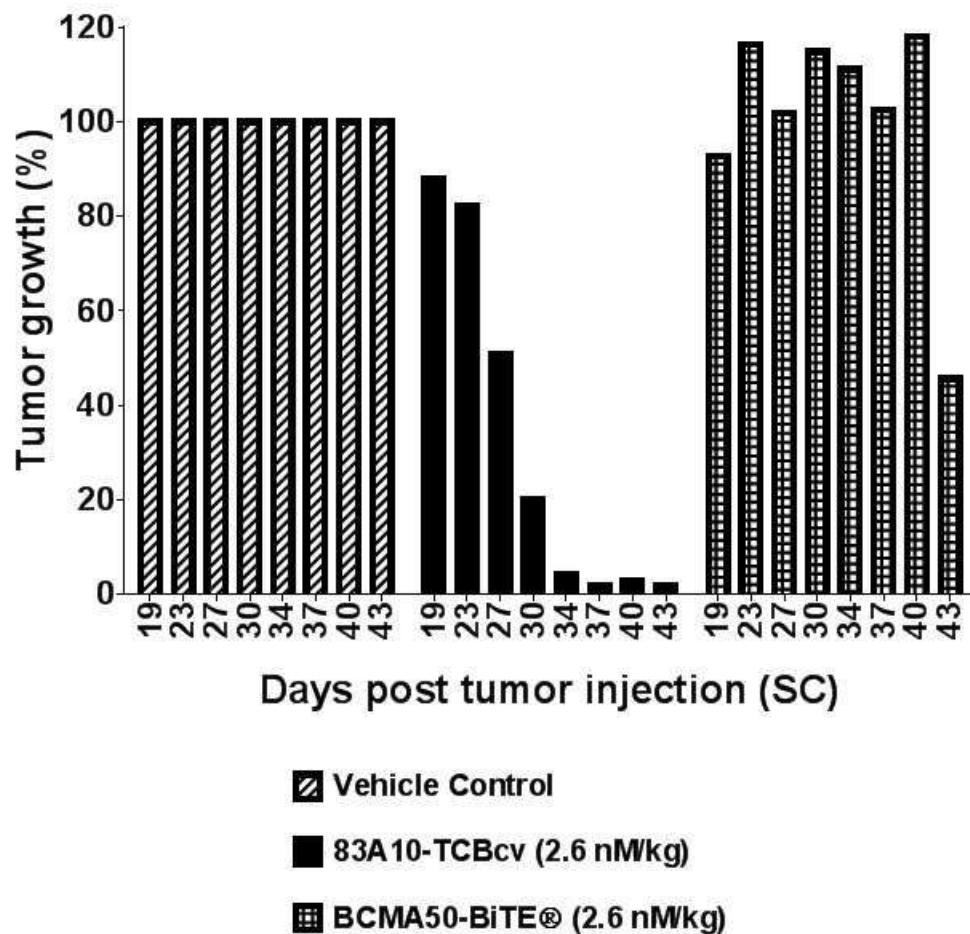
도면15b



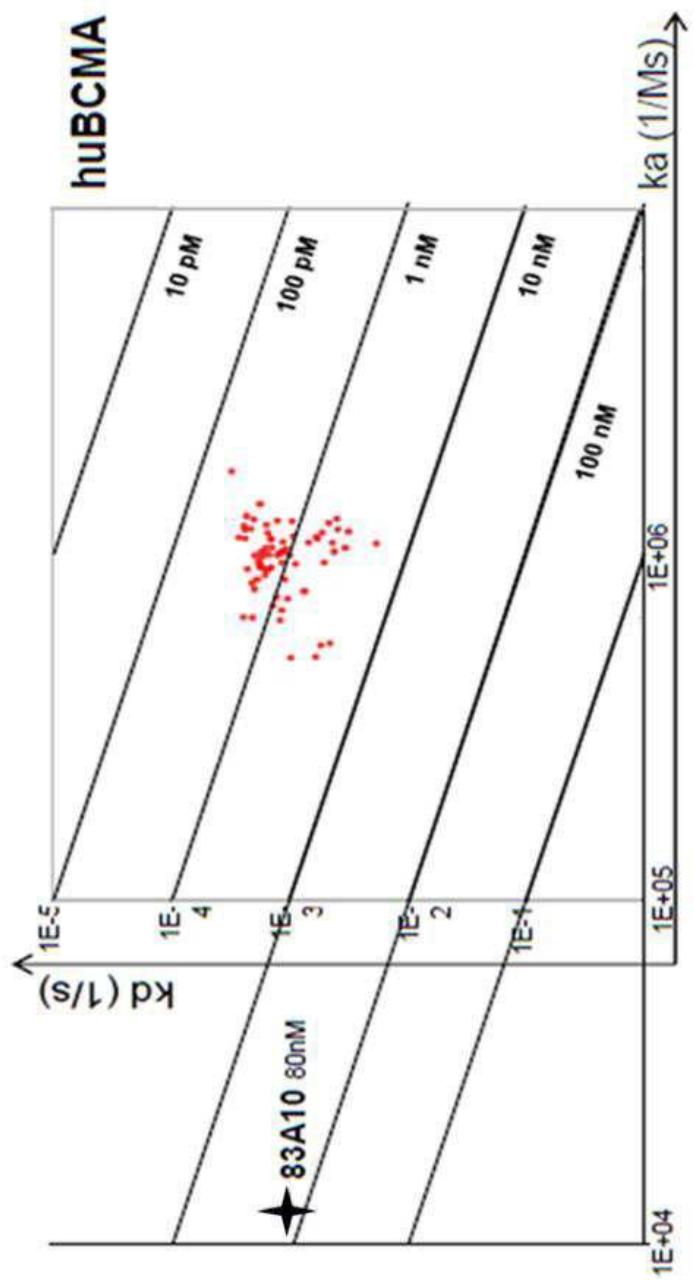
도면 15c



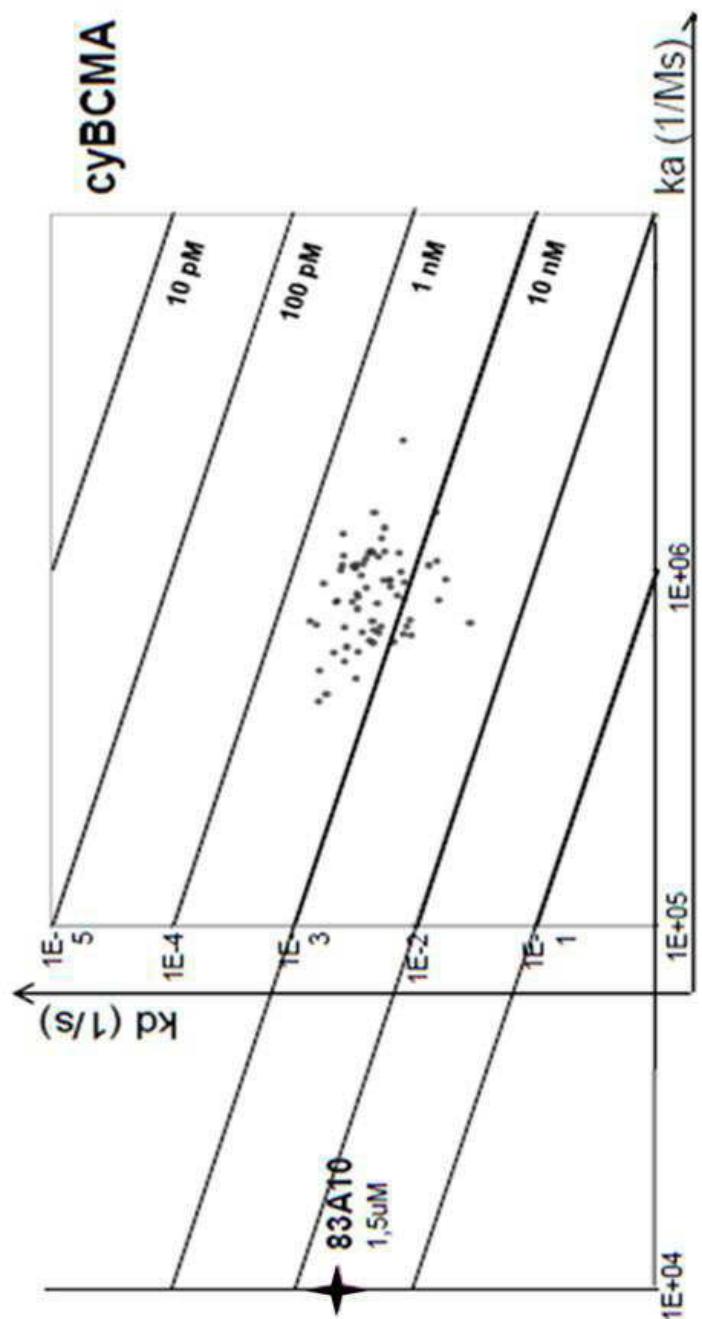
도면 16



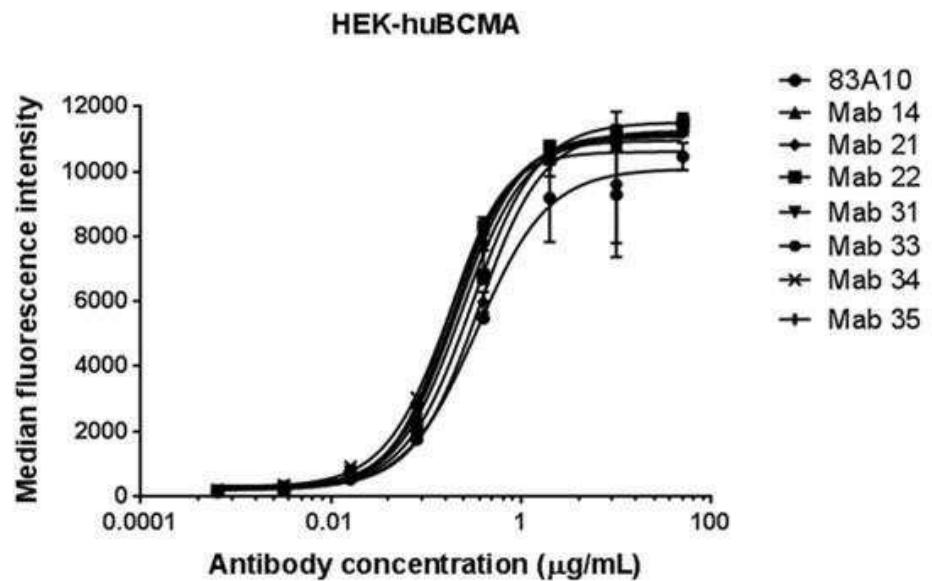
도면 17a



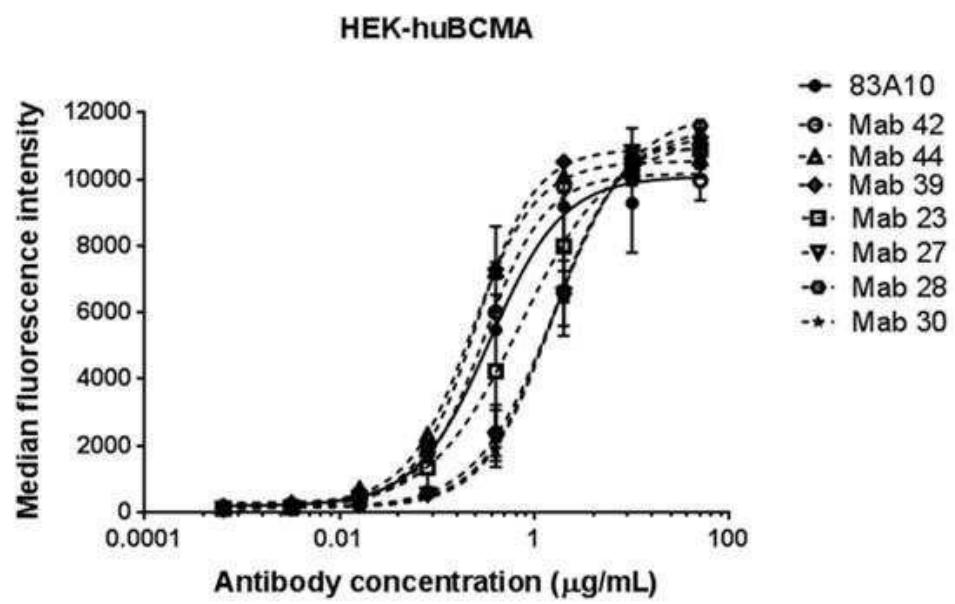
도면 17b



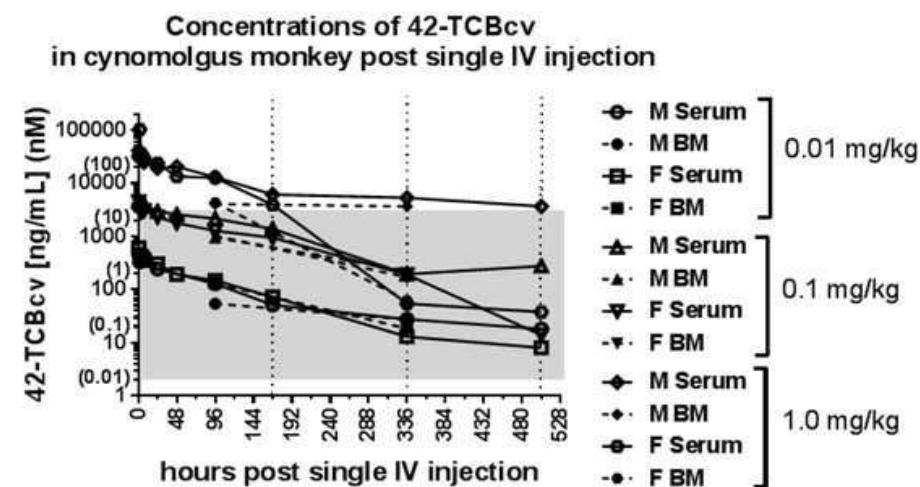
도면 18a



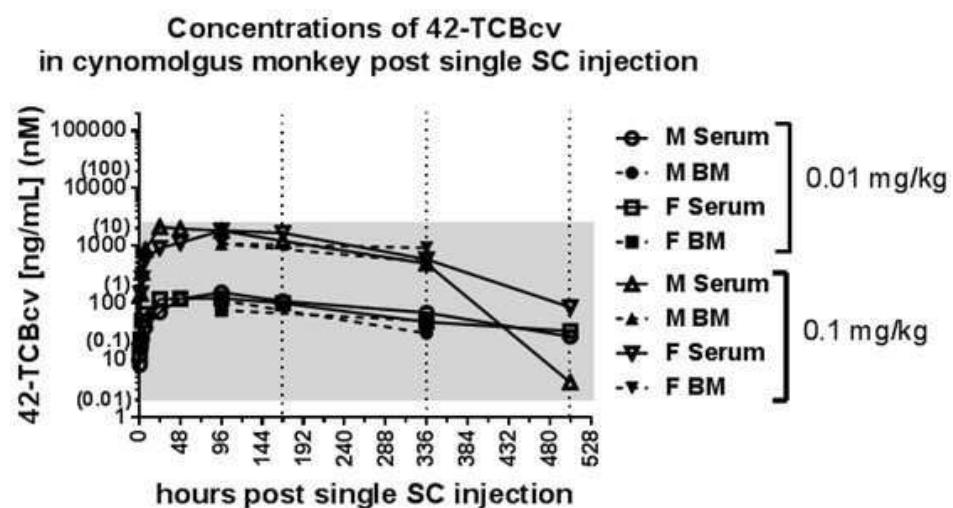
도면 18b



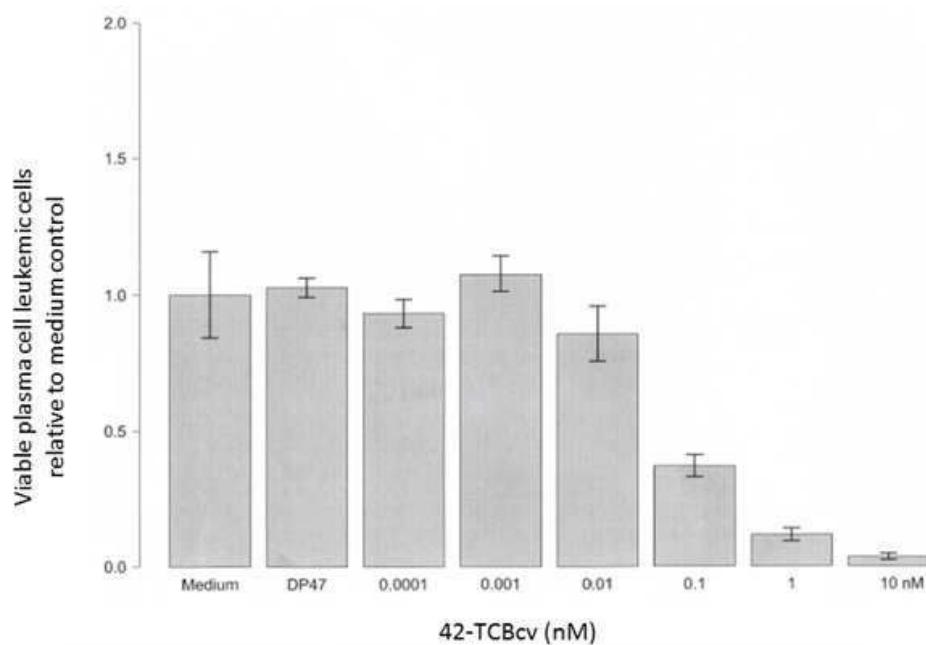
도면19a



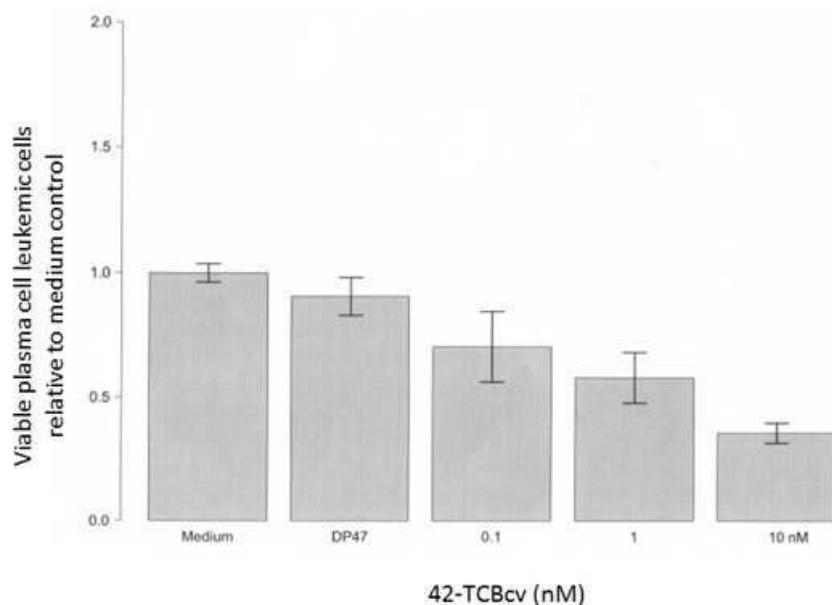
도면19b



도면20a



도면20b



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ENGMAB AG

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST BCMA

<130> B218-0005W01

<150> EP15179549.9

<151> 2015-08-03

<160> 57

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213>

Mus musculus

<400> 6

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

9

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VH

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VH

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VL 83A10

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VL

<400> 12

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VL Mab22

<400> 13

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable region VL Mab42

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 83A10 CDR1H

<400> 15

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 83A10 CDR2H

<400> 16

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDRH3

<400> 17

Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr

1	5
---	---

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 83A10 CDR1L

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp

1	5	10
---	---	----

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 83A10 CDR2L

<400> 19

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDRL3

<400> 20

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1H

<400> 21

Asp Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2H

<400> 22

Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab21 CDR1L

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala Trp

1 5 10

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab21 CDR2L

<400> 24

Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab22 CDR1L

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp

1 5 10

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab22 CDR2L

<400> 26

Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab42 CDR1L

<400> 27

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Trp

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab42 CDR2L

<400> 28

His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab27 CDR1H

<400> 29

Ser Ala Pro Met Gly

1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab27 CDR2H

<400> 30

Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CDR1L
 <400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CDR2L
 <400> 32

His Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1	5
---	---

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CDR3L
 <400> 33

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr

1	5	10
---	---	----

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Mab33 CDR1H

<400> 34

Thr Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab33 CDR2H

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab39 CDR1H

<400> 36

Gln Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab39 CDR2H

<400> 37

Ala Ile Ser Pro Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab27 VH

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala

20 25 30

Pro Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Tyr Ile Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab33 VH

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Arg Phe Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab39 VH

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gln Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Pro Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CH1 domain

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

100

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CL domain

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg

1 5 10 15

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 43

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3 CH1

<400> 43

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 100

<210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD3 CL
 <400> 44

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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

65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 45
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 83A10 knob HC
 <400> 45

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly

210 215 220

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu

225 230 235 240

Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr

245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro

260 265 270

Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys

305 310 315 320

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu

325 330 335

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

340 345 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

355 360 365

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

370 375 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

385 390 395 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

405 410 415

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

420 425 430

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

435 440 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

450 455 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

465 470 475 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

485 490 495

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 580 585 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 660 665 670

<210> 46

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 83A10 hole HC

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 47

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 83A10 LC

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 48

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD3 LC

<400> 48

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

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

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

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 49

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab21 knob HC

<400> 49

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly

210 215 220

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu

225 230 235 240

Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr

245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro

260 265 270

Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys

305 310 315 320

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu

325 330 335

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

340 345 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

355 360 365

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

370 375 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

385 390 395 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

405 410 415

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

420 425 430

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

435 440 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

450 455 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

465 470 475 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

485 490 495

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

500 505 510

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

515 520 525

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

530 535 540

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

545 550 555 560

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

565 570 575

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

580 585 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

595 600 605

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

610 615 620

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

625 630 635 640

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

660 665 670

<210> 50

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab21 hole HC

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 51

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab21 LC

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Glu Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Glu His Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 52

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab22 knob HC

<400> 52

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr
 245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro
 260 265 270

Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 275 280 285

Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala
 290 295 300
 Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys
 305 310 315 320

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
 325 330 335

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 340 345 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 370 375 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 405 410 415

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 420 425 430

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

435 440 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

450 455 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

465 470 475 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

485 490 495

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

500 505 510

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

515 520 525

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

530 535 540

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

545 550 555 560

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

565 570 575

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

580 585 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

595 600 605

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

610 615 620

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

625 630 635 640

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

660 665 670

<210> 53

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab22 hole HC

<400> 53

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210> 54

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab22 LC

<400> 54

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Ser Gly Ala Gly Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195

200

205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 55

<211> 671

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mab42 knob HC

<400> 55

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly

210 215 220

Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu

225 230 235 240

Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr

245 250 255

Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro

260 265 270

Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys

305 310 315 320

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

325 330 335

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

340 345 350

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

355 360 365

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

370 375 380

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

385 390 395 400

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

405 410 415

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

420 425 430

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

435 440 445

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

450 455 460

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

465 470 475 480

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

485 490 495

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

500 505 510

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

515 520 525

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

530 535 540

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

545 550 555 560

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

565 570 575

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

580 585 590

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

595 600 605

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

610 615 620

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

625 630 635 640

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

660	665	670
<210> 56		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Mab42 hole HC		
<400> 56		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn		
20	25	30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu		
180	185	190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 57

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> Mab42 LC

<400> 57

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile His Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro

85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180

185

190

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

195

200

205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215