

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0104836
(43) 공개일자 2021년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 35/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7022524
(22) 출원일자(국제) 2019년12월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년07월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/067173
(87) 국제공개번호 WO 2020/132066
국제공개일자 2020년06월25일
(30) 우선권주장
62/781,689 2018년12월19일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
머피, 앤드루, 제이.
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
스코코스, 디미트리스
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 35 항

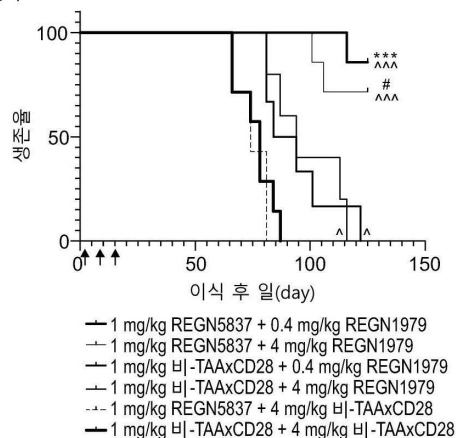
(54) 발명의 명칭 이중 특이적 항-CD28 X 항-CD22 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 인간 CD-22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 분자를 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD-22를 발현하는 종양의 성장, 예컨대 B-세포 림프종을 억제할 수 있다. 본 발명의 항체 및 이중 특이적 항원 결합 분자는 상향 조절되거나 유도된 표적 면역 반응이 요망되고/되거나 치료학적으로 유익한 질환 및 장애의 치료에 유용하다.

대표도

WSU-DLCL2 종양을 갖고 있는 NSG 마우스를 준 유효 용량의 REGN1979의 존재하에 REGN5387로 치료하는 것이 REGN1979 단일 요법보다 상당히 더 큰 생존과 관련된다



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

웨이트, 재널

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

울만, 에리카

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

헤르만, 아이누르

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

스미쓰, 에릭

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

울슨, 카라

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

웨이, 조이스

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

얀코폴로스, 조지, 디.

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드
777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 인간 CD28에 결합하는 제1 항원 결합 도메인(D1); 및
- b) 표적 종양 세포에서 인간 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인(D2).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인(D2)이 서열 번호 57, 서열 번호 58 및/또는 서열 번호 59의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 인간 CD22 상의 에피토프에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 25℃에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 약 15 nM 미만의 K_D 로 인간 CD22에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 25℃에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 약 60 μ M 미만의 K_D 로 필리핀 원숭이(*Macaca fascicularis*) CD22에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 25℃에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 약 45 μ M 미만의 K_D 로 인간 CD28에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관 내 FACS 결합 검정으로 측정했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 약 1×10^{-8} M 미만의 EC_{50} 으로 인간 CD28을 발현하는 세포의 표면에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관 내 FACS 결합 검정으로 측정했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 약 1×10^{-8} M 미만의 EC_{50} 으로 인간 CD22를 발현하는 세포의 표면에 결합하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20xD3 이중 특이적 항체와 함께 사용했을 때 상기 이중 특이적 항원 결합 분자가 공동 자극 효과를 나타내는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 공동 자극 효과가(인간 PBMC에서 T-세포 활성화, IL-2 방출 유도, CD25+ 상향 조절 유도; 및 CD22 발현 세포주에 대한 인간 T-세포 매개 세포 독성 증가 중 하나 이상인, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인(D1)이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 서열 번호 26의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및
- b) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3).

청구항 11

제10항에 있어서, a) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 12

제12항에 있어서, a) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 서열 번호 28, 30 및 32의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 세트, 및 서열 번호 12, 14 및 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3) 세트.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 도메인이 서열 번호 26/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 서열 번호 2 및 18로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCVR 내에 함유된 3개의 HCDR; 및
- b) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR 내에 함유된 3개의 LCDR.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 서열 번호 4 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1;
- b) 서열 번호 6 및 22로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2 및
- c) 서열 번호 8 및 24로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

- a) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제2 항원 결합 도메인이 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

a) 서열 번호 4, 6, 8; 및 20, 22, 24로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCVR CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 세트; 및 서열 번호 12, 14, 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3) 세트.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

a) 서열 번호 28, 30, 32의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR CDR, 및 서열 번호 12, 14, 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR CDR을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및

b) 서열 번호 4, 6, 8의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR CDR, 및 서열 번호 12, 14, 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR CDR을 포함하는 제2 항원 결합 도메인.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

a) 서열 번호 28, 30, 32의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR, 및 서열 번호 12, 14, 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및

b) 서열 번호 20, 22, 24의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR, 및 서열 번호 12, 14, 16의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR을 포함하는 제2 항원 결합 도메인.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자:

a) 서열 번호 26/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는 제1 항원 결합 도메인; 및

b) 서열 번호 2/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는 제2 항원 결합 도메인.

청구항 22

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 26/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함하고;

b) 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 18/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는, 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 23

CD22에 대한 결합에 대해 경쟁하거나, 기준 항체로서 CD22 상의 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자로서, 상기 기준 항체가 서열 번호 26/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 제1 항원 결합 도메인 및 서열 번호 2/10 또는 18/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 24

인간 CD28에 대한 결합에 대해 경쟁하거나, 기준 항체로서 인간 CD28 상의 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자로서, 기준 항체가 서열 번호 26/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 제1 항원 결합 도메인 및 서열 번호 2/10 또는 18/10의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 이중 특이적 항원 결합 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 이중 특이적 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 27

제26항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 28

제27항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 29

대상체에서 B-세포 증식성 장애를 억제하는 방법으로, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 단리된 이중 특이적 항체 또는 제25항의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여 상기 대상체에서 B-세포 림프종의 성장을 억제하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 제2 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 제2 치료제가 항종양제, 방사선 요법, 항체 약물 접합체, 항종양제에 접합된 이중 특이적 항체, 체크 포인트 억제제, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 32

B-세포 증식성 장애 또는 또 다른 CD22-발현 세포 악성 종양을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 단리된 이중 특이적 항체 또는 제25항의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여 B-세포 림프종 또는 다른 CD-22 발현 세포 악성 종양을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 제2 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 제2 치료제가 항종양제, 방사선 요법, 항체 약물 접합체, 항종양제와 접합된 이중 특이적 항체, 체크 포인트 억제제, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 35

제31항 또는 제34항에 있어서, 상기 제2 치료제가 동일한 종양 표적 항원에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 T 세포 상의 CD3에 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 상이한 이중 특이적 항체인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2018년 12월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 62/781,689에 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 여기에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전체가 여기에 참조로 포함된다. 2019년 12월 16일에 생성된 ASCII 사본의 이름은 118003_49220_SL.txt이며 크기는 104,353 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 CD28, 및 CD22와 같은 표적 분자에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자 및 그 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] CD28은 동종 이량체로 조립된 단일 세포 외 Ig-V-유사 도메인을 갖는 T 세포의 표면에서 발현되는 I형 막 횡단 단백질이다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2) 단백질의 수용체이며 항원 제시 세포(APC)에서 발현되는 CD80 또는 CD86에 의해 활성화된다. CD28의 CD80 또는 CD86에 대한 결합은 T 세포 활성화 및 생존에 중요한 공동 자극 신호를 제공한다. T-세포 수용체(TCR)에 추가하여 CD28을 통한 T 세포 자극은 다양한 인터루킨 생산을 위한 강력한 신호를 제공한다. CD28은 또한 TCR 활성화 후 NF κ B 전사 인자에 의해 제어되는 경로와 같은 세포 신호를 강화한다. CD28 공동 신호는 T 세포 분화, 증식, 사이토카인 방출 및 세포 사멸과 같은 효과적인 T-세포 활성화에 중요하다.

[0008] 항-CD28 항체는 T 세포의 활성화가 관여하는 치료 목적으로 제안되었다. 하나의 특정 항-CD28 항체인 TGN1412 (항-CD28 초 작용제)가 2006년 임상 시험에 사용되었다. 6명의 건강한 지원자에게 0.1 mg/kg의 용량으로 TGN1412(항-CD28 초 작용제)를 정맥 내 투여했다. 2시간 이내에 6명의 환자 모두 심각한 염증 반응(사이토카인 폭풍)을 보였으며 모든 환자는 16시간 이내에 다기관 부전 상태가 되었다. 피험자들은 코티코스테로이드로 치료를 받았으며 사이토카인 수치는 2 내지 3일 이내에 정상 수치로 돌아왔다. 1상 연구(CRS와 관련)에서 0.1 mg/kg의 개시 용량은 50 mg/kg의 사이노몰구스 "NOAEL"의 500배 배수를 기반으로 한다(Suntharalingam, 등, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, NEJM 355:1018-1028(2006)). 불행히도, TGN1412는 사이노몰구스 원숭이의 독성 연구 또는 생체 외 인간 PBMC 연구에서 예측되지 않은 사이토카인 폭풍을 유발했다.

[0009] Siglec 패밀리의 구성원인 CD22(Siglec-2라고도 함)는 α 2,6 시알산을 특이적으로 인식하고 B 림프구(B 세포)에서 우선적으로 발현되는 막 관통 단백질이다.

[0010] CD22는 예를 들어, B 세포 항상성, B 세포 생존 및 이동, TLR 및 CD40 신호 전달 완화, 세포질 영역에서 면역 수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)의 인산화뿐만 아니라 B 세포와 다른 세포 유형 간의 접착 촉진에 의한 SH2 도메인-함유 포스파타제 동원을 통한 B 세포 수용체(BCR) 신호 전달 억제를 포함하는 많은 관련 기능을 갖는다.

[0011] CD22는 발달 초기에 B 세포 표면에서 발견되지 않으며 줄기 세포에서 발현되지도 않는다. 그러나 모든 B 세포 림프종 및 백혈병의 60 내지 70%가 CD22를 발현한다.

[0012] B-세포 림프종 및 백혈병을 치료하기 위한 항-CD22 항체가 조사되었다. 그러나 단클론 항체인 에프라투주맵은 제한적인 성공을 거두었다.(Grant, 등(2013) *Cancer* 119(21): 10.1002/cncr.28299)

[0013] 따라서, 개선된 항-CD22-항체가 당 업계에 필요하다. 또한 약제학적 조성물에 사용하기에 안전한 항-CD28 항체가 필요하다. 더욱이, CD28과 표적 항원(예컨대, CD22) 모두에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자는 표적 항원을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포 매개 사멸이 요망되는 치료 환경에서 유용할 것이다.

발명의 내용

[0014] 제1 측면에서, 본 발명은 CD28 및 표적 항원에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공한다. 특정 예시적 실시 양태에 따르면, 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD28 및 CD22에 결합하고; 이러한 이중 특이적 항원 결합 분자는 본원에서 "항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자"라고도 한다. 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자의 항-CD22 부분은 CD22(예를 들어, 암성 B 세포)를 발현하는 암 세포를 표적화하는 데 유용하고, 이중 특이적 분자의 항-CD28 부분은 T-세포를 활성화하는 데 유용하다. 암 세포상의 CD22 및 T-세포상의 CD28의 동시 결합은, 예를 들어 T 세포의 TCR 활성화 후에 활성화된 T-세포에 의한 표적화된 암 세포의 지시적(directed) 사멸(세포 용해)을 촉진한다. 따라서 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자는 특히 CD22-발현 종양과 관련되거나 이에 의해 야기되는 질환 및 장애(예를 들어, B 세포 증식성 장애, 예를 들어, B 세포 림프종, 예를 들어, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 여포성 림프종(FL), 변연부 림프종)을 치료하는 데 유용하다.

[0015] 본 발명의 이 양태에 따른 이중 특이적 항원 결합 분자는 인간 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인, 및 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명은 각 항원 결합 도메인이 경쇄 가변 영역(LCVR)과 쌍을 이룬 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자(예를 들어,

이중 특이적 항체)를 포함한다. 본 발명의 특정 예시적인 실시 양태에서, 항-CD28 항원 결합 도메인 및 항-CD22 항원 결합 도메인은 각각 공통 LCVR과 쌍을 이루는 상이한 별개의 HCVR을 포함한다.

- [0016] 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 표 6에 제시된 HCVR 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함한다. CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 또한 표 6에 제시된 LCVR 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 특정 실시 양태에 따르면, CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 표 6에 제시된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 중 임의의 것을 포함한다. 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 표 6에 제시된 중쇄 CDR1-CDR2-CDR3 아미노산 서열 중 임의의 것 및/또는 표 6에 제시된 경쇄 CDR1-CDR2-CDR3 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함한다.
- [0017] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 28 및 26으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.
- [0019] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인이 서열 번호 28/10 및 26/10으로 구성된 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR(HCVR/LCVR) 아미노산 서열 쌍을 포함한다.
- [0020] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 32의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR3(HCDR3) 도메인; 및 서열 번호 16의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR3(LCDR3) 도메인을 포함한다.
- [0021] 특정 실시 양태에서, CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 32/16의 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함한다.
- [0022] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 28의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR1(HCDR1) 도메인; 서열 번호 30의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR2(HCDR2) 도메인; 서열 번호 12의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR1(LCDR1) 도메인; 및 서열 번호 14의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR2(LCDR2) 도메인을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 특징의 비제한적이고 예시적인 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 각각 서열 번호 28-30-32-12-14-16의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 도메인을 포함하는 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0024] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인이 서열 번호 2 및 18로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함한다.
- [0025] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 10의 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.
- [0026] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 2/10 및 18/10으로 구성된 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR(HCVR/LCVR) 아미노산 서열 쌍

을 포함한다.

- [0027] 본 발명은 또한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 분자를 제공하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 8 및 24로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR3(HCDR3) 도메인; 및 서열 16의 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR3(LCDR3) 도메인을 포함한다.
- [0028] 특정 실시 양태에서, CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 8/16 및 24/16으로 구성된 군으로부터 선택된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함한다.
- [0029] 본 발명은 또한 항 CD28/항 CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 4 및 20으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR1(HCDR1) 도메인; 서열 번호 6 및 22로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR2(HCDR2) 도메인; 서열 번호 12의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR1(LCDR1) 도메인; 및 서열 번호 14의 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR2(LCDR2) 도메인을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 특징의 비제한적이고 예시적인 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 각각 서열 번호 4-6-8-12-14-16 및 20-22-24-12-14-16으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 도메인을 포함하는, CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0031] 관련 실시 양태에서, 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하고, 여기서 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인은 서열 번호 2/10 및 18/10으로 구성된 군에서 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열 내에 함유된 중쇄 및 경쇄 CDR 도메인을 포함한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원의 표 7에 제시된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자, 및 표 7에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 중 2개 이상을 임의의 기능적 조합 또는 배열로 포함하는 핵산 분자를 포함하여, 본원에 개시된 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자의 HCVR, LCVR 또는 CDR 서열 중 임의의 것을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 핵산을 운반하는 재조합 발현 벡터 및 이러한 벡터가 도입된 숙주 세포도 본 발명에 포함되며, 항체 생산을 허용하는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하여 항체를 생산하고, 생산된 항체를 복구하는 방법도 마찬가지이다.
- [0033] 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하고, 여기서 CD28에 특이적으로 결합하는 전술한 항원 결합 도메인 중 임의의 것은 CD22에 특이적으로 결합하는 전술한 항원 결합 도메인 중 임의의 것과 조합, 연결 또는 달리 회합되어 CD28 및 CD22에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성한다.
- [0034] 본 발명은 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 일부 적용에서, 바람직하지 않은 글리코실화 부위를 제거하기 위한 변형이 유용할 수 있거나, 예를 들어 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 기능을 증가시키기 위해 올리고당 사슬에 존재하는 푸코스 모이어티가 없는 항체가 유용할 수 있다(Shield 등(2002) *JBC* 277:26733 참조). 다른 적용에서, 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 변형하기 위해 갈락토실화의 변형이 이루어질 수 있다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다. 관련 측면에서, 본 발명은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자 및 제2 치료제의 조합인 조성물을 특징으로 한다. 일 실시 양태에서, 제2 치료제는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자와 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자와 유리하게 조합될 수 있는 예시적인 제제는 본원의 다른 곳에서 상세히 논의된다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 CD22를 발현하는 암 세포를 표적화/사멸시키는 치료 방법을 제공하며, 여기서 치료 방법은 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하는 억제학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0037] 본 발명은 또한 CD22 발현과 관련되거나 이에 의해 야기되는 질환 또는 장애의 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자의 용도를 포함한다.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 CD22를 발현하는 암세포를 표적화/사멸시키는 치료 방법을 제공하며, 여기서 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD3에 결합하는 다른 항-종양 이중 특이적 항원 결합 분자와 조합된다(예를 들어, 항-CD3/항-CD20 항체와 조합된 항-CD28/항-CD22).
- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 CD22를 발현하는 암세포를 표적화/사멸시키는 치료 방법을 제공하며, 여기서 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4를 표적으로 하는 체크 포인트 억제제와 조합된다(예를 들어, 항-PD-1 항체와 조합된 항-CD28/항-CD22). 예를 들어, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 PD-1을 표적으로 하는 제제, 예컨대 켄트루아(Keytruda®), 니볼루마(Opdivo®) 또는 세미플리마(Libtayo®)와 조합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 PD-L1을 표적으로 하는 제제, 예컨대 아테졸리주맴(Tecentriq®), 아벨루마(Bavencio®), 또는 두르발루마(Imfinzi®)와 조합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 CTLA-4를 표적으로 하는 제제, 예컨대 이필리무맴(Yervoy®)과 조합될 수 있다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 CD22를 발현하는 암세포를 표적화/사멸시키는 치료 방법을 제공하며, 여기서 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD3에 결합하는 다른 항-종양 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 항-CD3/항-CD20 이중 특이적 항체, 예를 들어 REGN1979(US9,657,102 참조, 여기서 항-CD20 아암(arm)은 서열 번호 1242/1258의 HCVR/LCVR 아미노산 쌍을 포함하고 항-CD3 아암은 서열 번호 1250/1258의 아미노산 쌍을 포함함)와 조합된 항-CD28/항-CD22) 및/또는 PD-1, PD-L1 또는 CTLA-4를 표적화하는 체크 포인트 억제제(예를 들어, 항-PD-1 항체와 조합된 항-CD28/항-CD22)와 조합된다. 예를 들어, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 PD-1을 표적으로 하는 제제, 예컨대 켄트루아(Keytruda®), 니볼루마(Opdivo®), 또는 세미플리마(Libtayo®, 예를 들어, US9,987,500 참조, 여기서 세미플리마는 서열 번호 162/170의 HCVR/LCVR 아미노산 쌍을 포함함)와 조합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 PD-L1을 표적으로 하는 제제, 예컨대 아테졸리주맴(Tecentriq®), 아벨루마(Bavencio®), 또는 두르발루마(Imfinzi®)와 조합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 CTLA-4를 표적화하는 제제, 예컨대 이필리무맴(Yervoy®)과 조합될 수 있다.
- [0041] 다른 실시 양태는 이어지는 상세한 설명의 검토로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 CD28을 발현하는 인간 CD4⁺ T-세포 및 세포 표면에서 인간 CD22를 발현하는 표적 세포에 대한 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항체의 결합을 나타내는 그래프 세트이다.
- 도 2a 및 2b는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항체가 일차 T-세포 자극 및 CD22 표적 발현의 존재하에 루시퍼라제 생산의 증가를 나타낸다는 것을 도시하는 그래프 세트이다. 도 2a는 200pM 고정 REGN1945(음성 hIgG4 이소형 대조군)에 추가하여 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포와 공동-배양된 조작된 리포터 T-세포의 활성화를 루시퍼라제의 생산에 의해 평가하여 나타낸 그래프 세트이다. 도 2b는 200pM 고정 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)에 추가하여 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포와 공동-배양된 조작된 리포터 T-세포의 활성화를 루시퍼라제 생산에 의해 평가하여 나타낸 그래프 세트이다.
- 도 3a 및 3b는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항체가 일차 T-세포 자극 및 CD22 표적 발현의 존재하에 IL-2 생산을 증가시킨다는 것을 나타내는 그래프 세트이다. 보다 구체적으로, 도 3a는 2nM 고정 REGN1945(hIgG4 이소형 대조군)의 존재하에 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포와 공동-배양된 CD4⁺ T-세포의 활성화를 IL-2 생산에 의해 평가하여 나타낸 그래프 세트이다. 도 3b는 2nM 고정 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)의 존재하에 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포와 공동-배양된 CD4⁺ T-세포의 활성화를 IL-2 생산에 의해 평가하여 나타낸 그래프 세트이다.
- 도 4는 REGN5837과 세미플리마의 조합이 PD-L1을 발현하도록 조작된 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방

출을 향상시킨다는 것을 보여주는 그래프 세트이다.

도 5a는 REGN5837과 세미플리맵의 조합이 PD-L1을 발현하도록 조작된 NALM6 세포의 존재하에 IL-2 방출을 향상시킨다는 것을 보여주는 그래프 세트이다.

도 5b는 REGN5837과 세미플리맵의 조합이 PD-L1을 발현하도록 조작된 RAJI 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다는 것을 보여주는 그래프 세트이다.

도 6은 RNALM-6-Luc 종양을 갖는 NSG 마우스를 REGN1979(항-CD20 x 항-CD3)의 존재하에 REGN5837로 치료하는 것이 상당한 종양 억제와 관련된다는 것을 보여주는 그래프이다. 간단히 말해서, NSG 마우스(그룹당 n = 6 내지 9)를 인간 PBMC로 생착시킨 다음, 생착 12일 후(0일) NALM-6-luc B-세포 백혈병 세포를 이식하였다. 마우스에게 4 mg/kg REGN5837 + 0.04 mg/kg REGN1979(빛금친 원), 0.4 mg/kg REGN5837 + 0.04 mg/kg REGN1979(단힌 직립 삼각형), 0.04 mg/kg REGN5837 + 0.04 mg/kg REGN1979(다이아몬드), 4 mg/kg 비-TAAxCD28 + 0.04 mg/kg REGN1979(정사각형), 4 mg/kg REGN5837 + 0.4 mg/kg 비-TAAxCD3(열린 원), 또는 4 mg/kg 비-TAAxCD28 + 0.4 mg/kg 비-TAAxCD3(단힌 역 삼각형)을 이식 후 8, 15 및 22일(화살표)에 투여하였다. 종양 성장은 이식 후 6, 10, 14, 17, 20 및 23일에 종양 부피의 생물 발광 영상화에 의해 모니터링되었다. 합한 데이터를 그룹 평균 $\pm$ SEM으로 표현한다. Tukey 사후 테스트(Tukey's post hoc test)와 함께 양방향 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. 비-TAAxCD28 + 비-TAAxCD3 대조군에 대한 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 데 다음 기호를 사용했다: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

도 7a 내지 7c는 REGN1979가 용량 의존 방식으로 Nalm6 세포를 사멸시키도록 인간 T 세포를 활성화하고 지시했음을 보여주는 그래프이다. 보다 구체적으로, 도 7a는 표시된 항체의 존재하에 Nalm6 세포의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 7b는 표시된 항체의 존재하에 CD25(CD25+)를 발현하는 CD8+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 7c는 표시된 항체의 존재하에 CellTrace 바이올렛 회색에 의해 평가된 CD25+CD8+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다.

도 8a, 8b 및 8c는 REGN1979가 용량 의존 방식으로 WSU-DLCL2 세포를 사멸시키도록 인간 T 세포를 활성화하고 지시했음을 보여주는 그래프이다. 보다 구체적으로, 도 8a는 표시된 항체의 존재하에 WSU-DLCL2 세포의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 8b는 표시된 항체의 존재하에 CD25(CD25+)를 발현하는 CD8+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 8c는 표시된 항체의 존재하에 분할율 %로 표현된 CD8+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다.

도 9는 인간 PBMC 및 WSU-DLCL2 세포를 사용한 검정에서 REGN1979가 인간 사이토카인, IL-2, IL-4, IL-6 및 IL-10의 방출을 유도했음을 보여주는 그래프 세트이다. REGN1979로 관찰된 사이토카인 방출은 REGN1979 단독으로 유도된 사이토카인 방출과 비교하여 고정된 농도의 CD22 X CD28 존재 하에서 향상되었다.

도 10a 내지 10e는 REGN1979가 용량 의존 방식으로 NHL을 고갈시키도록 인간 T 세포를 활성화하고 지시했음을 보여주는 그래프이다. 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이성 항체를 REGN1979에 추가하면 REGN1979의 세포 독성 효능(EC50)이 1-아암 CD28 대조군 항체가 있거나 공동 자극 대조군이 없는 REGN1979와 비교할 때 2.3배 및 3.5배 향상되었다. REGN1979에 의해 매개된 관찰된 표적 세포 용해는 각각 CD8+ 및 CD4+ 세포에 대한 CD25 상향 조절 또는 CellTrace 바이올렛 회색에 의해 측정된 바와 같이 T 세포 활성화 및 증식과 관련이 있었다. 보다 구체적으로, 도 10a는 표시된 항체의 존재하에 환자 골수로부터 NHL 세포의 생존율을 나타내는 그래프이다. 도 10b는 표시된 항체의 존재하에 CD25(CD25+)를 발현하는 CD8+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 10c는 표시된 항체의 존재하에 CellTrace 바이올렛 회색에 의해 평가된 CD8+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다. 도 10d는 표시된 항체의 존재하에 CD25(CD25+)를 발현하는 CD4+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 10e는 표시된 항체의 존재하에 CellTrace 바이올렛 회색에 의해 평가된 CD4+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다.

도 11a 내지 11e는 REGN5837이 농도 의존적 방식으로 REGN1979 매개 세포 독성, CD25의 세포 표면 발현, 및 T-세포 증식의 효능을 향상시킨다는 것을 보여주는 그래프이다. 간단히 말해서, WSU-DLCL2 세포는 1:5의 표적 세포 대 PBMC 비율로 림프구가 풍부한 인간 PBMC와 함께, 또한 단일 제제(즉, REGN5837 없음)로서 또는 고정된 농도의 REGN5837(0.01 내지 15 μ g/mL 범위)의 존재하에(4.8fM 내지 10nM)의 농도 범위의 항-CD20xCD3(REGN1979)과 함께 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. REGN1979가 없는 상태는 표시된 농도에서 REGN5837만 함유하며 0.04 pM으로 표시된다. 생존 가능(Viable) 세포는 LIVE/DEAD 세포 염색(11a)을 사용하여 유세포 분석(flow cytometry)으로 검출되었다. Violet Cell Tracker 염료 및 CD2, CD4, CD8 및 CD25에 대한 형광단 표지 항체의 표현형 각테일을 사용하여 T-세포 활성화(CD25 발현으로 측정, 11b, 11d) 및 CD4⁺ 및 CD8⁺

T-세포 증식을 유세포 분석에 의해 검출했다(11c, 11e).

보다 구체적으로, 도 11a는 표시된 농도의 REGN5837을 사용한 죽은 세포의 %를 나타내는 그래프이다. 도 11b는 표시된 농도의 REGN5837을 사용한 CD25+ CD4+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 11c는 표시된 농도의 REGN5837을 사용한, CellTrace 바이올렛 희석에 의해 평가된 CD4+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다. 도 11d는 CD25+ CD8+ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다. 도 11e는 표시된 농도의 REGN5837을 사용한, CellTrace 바이올렛 희석에 의해 평가된 CD8+ 세포의 증식을 나타내는 그래프이다.

도 12a 내지 12g는 REGN5837이 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 세포의 존재하에 농도 의존적 방식으로 인간 T 세포로부터 REGN1979 매개 사이토카인 방출의 효능 및 최대 수준을 향상시킨다는 것을 보여주는 그래프이다. 간단히 말해서, WSU-DLCL2 세포는 1:5의 표적 세포 대 PBMC 비율에서 림프구가 풍부한 인간 PBMC와 함께, 또한 단일 제제(즉, REGN5837 없음)로 또는 고정 농도의 REGN5837(0.01 내지 15 µg/mL 범위)의 존재하에(4.8 fM 내지 10 nM)의 농도 범위의 항-CD20xCD3(REGN1979)과 함께 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. REGN1979가 없는 상태는 표시된 농도에서 REGN5837만 포함하며 0.04 pM으로 표시된다. 상청액은 BD Cytometric Bead Array 인간 Th1/Th2/Th17 사이토카인 키트를 사용하여(12a) IL-2, (12b) IL-4, (12c) IL-6, (12d) IL-10, (12e) TNF-α, (12f) IFN-γ, 및 (12g) IL-17 α의 사이토카인 방출에 대해 평가되었다.

보다 구체적으로, 도 12a는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IL-2의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12b는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IL-4의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12c는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IL-6의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12d는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IL-10의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12e는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 TNF-α의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12f는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IFN-γ의 수준을 나타내는 그래프이다. 도 12g는 표시된 농도의 REGN5837과 함께 WSU-DLCL2 세포 WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T 세포로부터 방출된 IL-17 α의 수준을 나타내는 그래프이다.

도 13a 및 13b는 WSU-DLCL2 종양을 갖는 NSG 마우스를 0.4 또는 4 mg/kg의 REGN1979의 존재하에 REGN5837로 치료하는 것이 상당한 종양 억제와 관련이 있다는 것을 보여주는 그래프이다. 간단히 말해서, 암컷 NSG 마우스(그룹당 n = 6 내지 7)에 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 세포와 인간 PBMC의 1:1 혼합물을 이식하였다(0일). 이식 후 1, 8 및 15일(화살표)에 1 mg/kg REGN5837 및 0.4 mg/kg(13a) 또는 4 mg/kg(13b) REGN1979(또는 비-가교 대조군)의 조합을 마우스에 투여했다. 종양 성장은 이식 후 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57 및 63일에 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 합한 데이터는 그룹 평균 ± SEM으로 표현된다. Tukey의 사후 테스트와 함께 양방향 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이를 나타내기 위해 다음 기호를 사용했다: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001. 별표는 REGN1979 단일 요법과 이소형 대조군 사이의 통계적 유의성을 나타내고, 해시 표시는 REGN5837과 REGN1979의 조합 및 이소형 대조군 사이의 유의성을 나타내고, 캐럿은 REGN1979 단일 요법과 REGN5837과 REGN1979의 조합 사이의 유의성을 나타낸다.

보다 구체적으로, 도 13a는 1 mg/kg REGN5837 및 0.4 mg/kg REGN1979(또는 비-가교 대조군, 비-TAAxCD3)가 투여된 마우스에서 종양 성장을 나타내는 그래프이다. 도 13b는 1 mg/kg REGN5837 및 4 mg/kg(또는 비-가교 대조군, 비-TAAxCD3)이 투여된 마우스에서 종양 성장을 나타내는 그래프이다.

도 14는 WSU-DLCL2 종양을 갖는 NSG 마우스를 준-유효 용량의 REGN1979의 존재하에 REGN5837로 치료하는 것이 REGN5837 또는 REGN1979 단일 요법보다 생존이 상당히 더 커지는 것과 관련됨을 보여주는 그래프이다. 간단히 말해서, 암컷 NSG 마우스(그룹당 n = 6 내지 7)에 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 세포와 인간 PBMC의 1:1 혼합물을 이식하였다(0일). 이식 후 1, 8 및 15일(화살표)에 REGN5837 및 REGN1979의 조합 또는 대조군을 마우스에 투여하였다. Mantel-Cox 테스트를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이를 나타내기 위해 다음 기호를 사용했다: *, p<0.05; ***, p<0.001. 캐럿은 이소형 대조군과 비교한 통계적 유의성을 나타내고, 별표는 0.4 mg/kg REGN1979 단일 요법과 비교한 유의성을 나타내고, 해시 표시는 4 mg/kg REGN1979 단일 요법과 비교한 유의성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명을 설명하기 전에, 본 발명은 설명된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 그러한 방법 및 조건은 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 발명의 범위는 첨부된 청구 범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시 양태를 설명하기 위한 것이며 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0044] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용된 용어 "약"은 특정 인용된 수치와 관련하여 사용될 때 그 값이 인용된 값으로부터 1% 이하만큼 변할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 표현 "약 100"은 99 및 101 및 그 사이의 모든 값(예: 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.
- [0045] 본 명세서에 설명된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 이제 설명된다. 본 명세서에 언급된 모든 특허, 출원 및 비-특허 출판물은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.
- [0046] 정의
- [0047] 본원에 사용된 표현 "CD28"은 공동 자극 수용체로서 T 세포상에서 발현되는 항원을 지칭한다. 인간 CD28은 서열 번호 74에 제시된 아미노산 서열을 포함하고/거나 NCBI 수탁 번호 NP_006130.1에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 본 명세서에서 단백질, 폴리펩티드 및 단백질 단편에 대한 모든 언급은 비인간 종에서 유래된 것으로 명시적으로 명시되지 않는 한, 각각의 단백질, 폴리펩티드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 표현 "CD28"은 예를 들어 "마우스 CD28", "원숭이 CD28" 등과 같이 비인간 종에서 유래된 것으로 명시되지 않는 한 인간 CD28을 의미한다.
- [0048] 본원에 사용된 "CD28에 결합하는 항체" 또는 "항-CD28 항체"는 단량체 CD28을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편뿐만 아니라 이량체 CD28을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 항체 및 항원 결합 단편은 가용성 CD28 및/또는 세포 표면 발현된 CD28에 결합할 수 있다. 가용성 CD28은 막 관통 도메인이 없거나 세포막과 관련이 없는 천연 CD28 단백질 및 재조합 CD28 단백질 변이체, 예를 들어 단량체 및 이량체 CD28 구축물을 포함한다.
- [0049] 본원에 사용된 표현 "세포 표면 발현된 CD28"은 시험관 내 또는 생체 내 세포 표면에서 발현되는 하나 이상의 CD28 단백질(들)을 의미하여, CD28 단백질의 적어도 부분은 세포막의 세포 외 측면에 노출되며 항체의 항원 결합 부분에 접근할 수 있다. "세포 표면 발현된 CD28"은 세포막의 기능적 T 세포 공동 자극 수용체의 맥락 내에 포함된 CD28 단백질을 포함한다. 표현 "세포 표면 발현된 CD28"은 세포 표면에서 동종이량체의 일부로서 발현된 CD28 단백질을 포함한다. "세포 표면 발현된 CD28"은 CD28 단백질을 정상적으로 발현하는 세포 표면에서 발현된 CD28 단백질을 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 대안적으로, "세포 표면 발현된 CD28"은 일반적으로 표면에서 인간 CD28을 발현하지 않지만 표면에서 CD28을 발현하도록 인공적으로 조작된 세포의 표면에서 발현된 CD28 단백질을 포함하거나 그로 구성될 수 있다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, "항-CD28 항체"라는 표현은 단일 특이성을 갖는 1가 항체뿐만 아니라 CD28에 결합하는 제1 아암 및 제2(표적) 항원에 결합하는 제2 아암을 포함하는 이중 특이적 항체를 둘다 포함하며, 여기서 항-CD28 아암은 본원의 표 1에 제시된 바와 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열 중 임의의 것을 포함한다. 항-CD28 이중 특이적 항체의 예는 본원의 다른 곳에서 설명된다. 용어 "항원 결합 분자"는 예를 들어 이중 특이적 항체를 포함하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0051] 본원에서 사용된 용어 "CD22"는 비인간 종에서 유래된 것(예를 들어, "마우스 CD22", "원숭이 CD22" 등)으로 명시되지 않는 한 인간 CD22 단백질을 지칭한다. 인간 CD22 단백질은 수탁 번호 CA442006에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. myc myc 헥사히스티딘 태그(서열 번호 60으로 개시된 "헥사히스티딘")를 갖는 재조합 인간 CD22 엑토(D20-R687)의 서열은 수탁 번호 NP_001762.2 및 또한 서열 번호 50으로 제시된다. hCD22 엑토도메인(D20-R687).hFc는 R&D Systems, 카탈로그# 1968-SL-050에서도 구입할 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 "CD22에 결합하는 항체" 또는 "항-CD22 항체"는 가용성 CD22 및/또는 표면 발현된 CD22에 결합할 수 있는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 가용성 CD22는 막 관통 도메인이 없거나 세포막과 관련이 없는 천연 CD22 단백질 및 재조합 CD22 단백질 변이체, 예를 들어 CD22 구축물을 포함한다.

- [0053] 본원에 사용된 표현 "항-CD22 항체"는 단일 특이성을 갖는 1가 항체뿐만 아니라 CD22에 결합하는 제1 아암 및 제2(표적) 항원에 결합하는 제2 아암을 포함하는 이중 특이적 항체를 둘다 포함하며, 여기서 항-CD22 아암은 본원의 표 1에 제시된 바와 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열 중 임의의 것을 포함한다. 항-CD22 이중 특이적 항체의 예는 본원의 다른 곳에서 설명된다. 용어 "항원 결합 분자"는 예를 들어 이중 특이적 항체를 포함하여 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0054] 용어 "항원 결합 분자"는 예를 들어 이중 특이적 항체를 포함하여 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0055] 본원에 사용된 용어 "항체"는 특정 항원(예를 들어, CD28)에 특이적으로 결합하거나 이와 상호 작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 임의의 항원 결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 이항화 결합에 의해 상호 연결된 4개의 폴리펩티드 사슬인 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)뿐만 아니라 이의 다량체(예를 들어, IgM)를 포함하는 면역 글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 C_H1, C_H2 및 C_H3의 3개의 도메인을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(C_L1)을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각 V_H 및 V_L은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 본 발명의 다른 실시 양태에서, 항-CD28 항체 및/또는 항-CD22 항체(또는 이의 항원 결합 부분)의 FR은 인간 생식선 서열과 동일할 수 있거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 컨센서스 서열은 둘 이상의 CDR의 병렬 분석을 기반으로 정의될 수 있다.
- [0056] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 또한 전체 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 본원에 사용된 용어 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는, 임의의 자연 발생, 효소적으로 수득 가능한, 합성 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당 단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어 항체 가변 도메인 및 임의로 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현이 관여하는 단백질 분해 소화 또는 재조합 유전 공학 기술과 같은 임의의 적합한 표준 기술을 사용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나 예를 들어 상업적 공급원, DNA 라이브러리(예를 들어, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 쉽게 입수 가능하거나 합성될 수 있다. DNA는 화학적으로 또는 분자 생물학 기술을 사용하여 서열화되고 조작하여, 예를 들어 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적절한 구성으로 배열하거나 코돈을 도입하고 시스테인 잔기를 생성하고 아미노산을 변형, 추가 또는 삭제 등을 할 수 있다.
- [0057] 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:(i) Fab 단편;(ii) F(ab')₂ 단편;(iii) Fd 단편;(iv) Fv 단편;(v) 단일 사슬 Fv(scFv) 분자;(vi) dAb 단편; 및(vii) 항체의 초가변 영역(예를 들어, CDR3 펩티드와 같은 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기, 또는 구속된 FR3-CDR3-FR4 펩티드로 구성된 최소 인식 단위. 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 삭제된 항체, 키메라 항체, CDR 이식 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예: 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈형 면역 억제(SMIP) 및 상어 가변 IgNAR 도메인은 또한 본원에서 사용되는 "항원 결합 단편"이라는 표현 내에 포함된다.
- [0058] 항체의 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있으며 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 프레임 내에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 관련된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서 V_H 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체일 수 있고 V_H-V_H, V_H-V_L 또는 V_L-V_L 이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체 V_H 또는 V_L 도메인을 포함할 수 있다.
- [0059] 특정 실시 양태에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유적으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적이고 예시적인 구성은 다음을 포함한다:(i) V_H-C_H1;(ii) V_H-C_H2;(iii) V_H-C_H3;(iv) V_H-C_H1-C_H2;(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi) V_H-C_H2-C_H3;(vii) V_H-C_L;(viii) V_L-C_H1;(ix) V_L-C_H2;(x) V_L-C_H3;(xi) V_L-C_H1-C_H2;(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및(xiv) V_L-C_L. 상기 나열된 예시적인 구성을 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의

의 구성에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접 연결될 수 있거나 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개(예: 5, 10, 15, 20, 40, 60 또는 그 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 이는 단일 폴리펩티드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 유연한 또는 반-유연한 연결을 생성한다. 더욱이, 항원 결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체 V_H 또는 V_L 도메인과의 비공유 결합(예를 들어, 이황화 결합(들)에 의해)으로, 상기 나열된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종이량체 또는 이종이량체(또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다.

[0060] 전체 항체 분자와 마찬가지로, 항원 결합 단편은 단일 특이적 또는 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적)일 수 있다. 항체의 다중 특이적 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별개의 항원 또는 동일한 항원상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 개시된 예시적인 이중 특이적 항체 형식을 포함하는 임의의 다중 특이적 항체 형식은 당 업계에서 이용 가능한 통상적인 기술을 사용하여 본 발명의 항체의 항원 결합 단편의 맥락에서 사용하기 위해 개조될 수 있다.

[0061] 본 발명의 항체는 보체 의존성 세포 독성(CDC) 또는 항체 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC)을 통해 기능할 수 있다. "보체 의존성 세포 독성"(CDC)은 보체의 존재하에 본 발명의 항체에 의한 항원 발현 세포의 용해를 지칭한다. "항체 의존성 세포 매개 세포 독성"(ADCC)은 Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적 세포 독성 세포(예: 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하여 표적 세포의 용해로 이어지는 세포 매개 반응을 말한다. CDC 및 ADCC는 당 업계에 잘 알려져 있고 이용 가능한 검정을 사용하여 측정될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 5,500,362 및 5,821,337, 및 Clynes 등(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 참조). 항체의 불변 영역은 보체를 고정하고 세포 의존적 세포 독성을 매개하는 항체의 능력에 중요하다. 따라서 항체의 이소형은 항체가 세포 독성을 매개하는 것이 바람직한 지 여부에 따라 선택될 수 있다.

[0062] 본 발명의 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD28 항체 및/또는 항-CD22 항체(단일 특이적 또는 이중 특이적)는 인간 항체이다. 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역 글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 예를 들어 CDR 및 특히 CDR3에서 인간 생식선 면역 글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 생식선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0063] 본 발명의 항체는 일부 실시 양태에서 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포로 형질 감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체(아래에 추가 설명됨), 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리에서 분리된 항체(아래에 추가 설명됨), 인간 면역 글로불린 유전자에 대해 형질 전환된 동물(예: 마우스)에서 분리된 항체(예: Taylor 등(1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 참조) 또는 인간 면역 글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것을 포함하는 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포 면역 글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시 양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 유발(또는 인간 Ig 서열에 대한 동물 형질 전환이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이 유발)을 하게 되고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 관련되지만, 생체 내에서 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0064] 인간 항체는 힌지 이질성과 관련된 두 가지 형태로 존재할 수 있다. 제1 형태에서, 면역 글로불린 분자는 약 150 내지 160 kDa의 안정한 4쇄 구조를 포함하며, 여기서 이량체는 사슬 간 중쇄 이황화 결합에 의해 함께 유지된다. 제2 형태에서, 이량체는 사슬 간 이황화 결합을 통해 연결되지 않고 약 75 내지 80 kDa의 분자가 공유 결합된 경쇄 및 중쇄(반-항체: half-antibody)로 구성된다. 이들 형태는 친화성 정제 후에도 분리하기가 매우 어려웠다.

[0065] 다양한 온전한 IgG 이소형에서 제2 형태의 출현 빈도는 항체의 힌지 영역 이소형과 관련된 구조적 차이에 기인하지만 이에 제한되지 않는다. 인간 IgG4 힌지의 힌지 영역에서 단일 아미노산 치환은 제2 형태(Angal 등(1993) *Molecular Immunology* 30:105)의 출현을 인간 IgG1 힌지를 사용하여 일반적으로 관찰되는 수준으로 상

당히 감소시킬 수 있다. 본 발명은 예를 들어, 원하는 항체 형태의 수율을 개선하기 위해 생산시 바람직할 수 있는, 힌지, CH2 또는 CH3 영역에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 항체를 포함한다.

[0066] 본 발명의 항체는 단리된 항체일 수 있다. 본원에 사용된 "단리된 항체"는 자연적인 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체를 의미한다. 예를 들어, 유기체의 하나 이상의 성분, 또는 항체가 자연적으로 존재하거나 자연적으로 생성되는 조직 또는 세포로부터 분리되거나 제거된 항체가 본 발명의 목적을 위한 "단리된 항체"이다. 단리된 항체는 또한 재조합 세포 내의 원위치 항체를 포함한다. 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 또는 단리 단계를 거친 항체이다. 특정 실시 양태에 따르면, 단리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0067] 본 발명은 또한 CD28 및/또는 CD22에 결합하는 하나의 아암 항체를 포함한다. 본원에서 사용되는 "하나의 아암 항체"는 단일 항체 중쇄 및 단일 항체 경쇄를 포함하는 항원 결합 분자를 의미한다. 본 발명의 하나의 아암 항체는 표 1에 제시된 바와 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0068] 본원의 항-CD28 항체 및/또는 항-CD22 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 항원 결합 단백질 또는 항원 결합 도메인이 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교하여, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본원에 개시된 아미노산 서열을 예를 들어 공개 항체 서열 데이터베이스로부터 입수 가능한 생식선 서열과 비교함으로써 용이하게 확인될 수 있다. 본 발명은 본원에 개시된 임의의 아미노산 서열로부터 유래된 항체 및 그의 항원 결합 도메인을 포함하며, 여기서 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 다른 인간 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 상응하는 생식선 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이된다(이러한 서열 변화는 본원에서 집합적으로 "생식선 돌연변이"로 언급됨). 당업자는 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로 시작하여 하나 이상의 개별 생식선 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 수많은 항체 및 항원 결합 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 특정 실시 양태에서, V_H 및/또는 V_L 도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 항체가 유래된 원래 생식선 서열에서 발견된 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 특정 잔기만, 예를 들어 FR1의 처음 8개 아미노산 내에서 또는 FR4의 마지막 8개 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만이 원래의 생식선 서열로 다시 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들)는 상이한 생식선 서열(즉, 항체가 원래 유래한 생식선 서열과 상이한 생식선 서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이된다. 더욱이, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내에 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 포함할 수 있으며, 예를 들어 특정 개별 잔기는 특정 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이되는 한편, 원래 생식선 서열과 다른 특정 다른 잔기는 유지되거나 다른 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단 획득되면, 하나 이상의 생식선 돌연변이를 함유하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화성, 개선되거나 강화된 길항적 또는 작용적 생물학적 특성(경우에 따라), 감소된 면역 원성 등과 같은 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 테스트될 수 있다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 본 발명에 포함된다.

[0069] 본 발명은 또한 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것의 변이체를 포함하는 항-CD28 항체 및/또는 항-CD22 항체 및 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명의 이러한 측면에 포함된 예시적인 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 본원의 표 6에 제시된 바와 같은 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것에 대해, 예를 들어 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-CD28 항체 및 항원 결합 분자를 포함한다.

[0070] 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특정 항원 결합 부위와 상호 작용하는 항원 결정자를 지칭한다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 다른 항체는 항원의 다른 영역에 결합할 수 있으며 다른 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 입체 형태적이거나 선형적일 수 있다. 입체 형태적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 서로 다른 세그먼트에서 공간적으로 나란히 배치된 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성되는 것이다. 특정 상황에서 에피토프는 항원상의 당류, 포스포릴기 또는 설포닐기의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0071] 핵산 또는 이의 단편을 언급할 때 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은 다른 핵산(또는 이의 상보적 가닥)과 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실과 최적으로 정렬될 때, 예를 들어 아래에 설명된 바와 같이 FASTA, BLAST 또는 Gap과 같이 임의의 공지된 서열 동일성 알고리즘으로 측정하여, 뉴클레오타이드 염기와 적어도

약 95%, 보다 바람직하게는 적어도 약 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다. 참조 핵산 분자와 실질적인 동일성을 갖는 핵산 분자는 특정 예에서 참조 핵산 분자에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다.

[0072] 폴리펩티드에 적용되는 용어 "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은 기본 갭 가중치를 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때 2개의 펩티드 서열이 적어도 95% 서열 동일성, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 다르다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R기)를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 다른 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사도를 상향 조정하여 치환의 보존적 특성을 수정할 수 있다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Pearson(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331 참조. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 기의 예는 다음을 포함한다:(1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신;(2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌;(3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민;(4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판;(5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘;(6) 산성 측쇄: 아스파르트레이트 및 글루타메이트, 및(7) 황 함유 측쇄는 시스테인과 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르트레이트, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안으로, 보존적 대체는 Gonnet 등(1992) *Science* 256: 1443-1445에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 모든 변경이다. "보통의 보존적인" 대체는 PAM250 로그 우도 행렬에서 음이 아닌 값을 갖는 모든 변경이다.

[0073] 서열 동일성이라고도 하는 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하여 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 할당된 유사성 측정을 사용하여 유사한 서열을 일치시킨다. 예를 들어, GCG 소프트웨어에는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램이 포함되어 있으며, 이 프로그램은 기본 매개 변수와 함께 사용되어 서로 다른 종의 유기체 또는 야생형 단백질과 그의 뮤테인 간의 상동성 폴리펩티드와 같은 밀접하게 관련된 폴리펩티드 간의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정한다. 예를 들어, GCG 버전 6.1 참조. 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 기본 또는 권장 매개 변수를 사용하는 FASTA를 사용하여 비교할 수도 있다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리와 검색 서열 사이에 가장 잘 겹치는 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(Pearson(2000) *supra*). 본 발명의 서열을 상이한 유기체로부터의 다수의 서열을 포함하는 데이터베이스와 비교할 때 또 다른 바람직한 알고리즘은 기본 매개 변수를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, Altschul 등(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 및 Altschul 등(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 참조.

[0074] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 어느 정도의 비정상 세포 증식과 관련된 장애를 지칭한다. 여기에는 포유류가 문제의 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태를 포함한 만성 및 급성 장애가 포함된다. 일 실시 양태에서, 세포 증식성 장애는 일반적으로 조절되지 않는 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유 동물의 생리학적 병태인 암이다.

[0075] 본원에 사용된 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물 세포 성장 및 증식, 그리고 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에서 언급되는 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0076] "B-세포 증식성 장애"는 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(NHL), 예컨대 공격성 NHL, 재발성 공격성 NHL, 저급/소포성 NHL, 소림프구성(SL) NHL, 중급/소포성 NHL, 중급 미만성 NHL, 고급 면역 모세포 NHL, 고급 림프 모세포 NHL, 고급 소형 비-절단 세포 NHL, 부피가 큰 질병 NHL, 재발성 무통성 NHL 및 림프시넵 불응성 무통성 NHL을 포함하는 무통성 NHL; 불응성 NHL, 불응성 무통성 NHL, 외부 세포 림프종, AIDS 관련 림프종 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's Macroglobulinemia), 림프구 우세 호지킨 병(LPHD), 소림프구성 림프종(SLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 털세포 백혈병, 만성 골수 모세포 백혈병을 포함한 백혈병; 및 기타 혈액 악성 종양을 포함한다.

[0077] 본원에서 사용된 용어 "비호지킨 림프종" 또는 "NHL"은 호지킨 림프종 이외의 림프계 암을 지칭한다. 호지킨 림프종은 일반적으로 호지킨 림프종에는 리드-스텐버그(Reed-Sternberg) 세포가 존재하고 비호지킨 림프종에는 상기 세포가 없다는 점에서 비호지킨 림프종과 구별될 수 있다. 본원에 사용된 용어에 포함되는 비호지킨 림프

종의 예는 Color Atlas of Clinical Hematology(3판), A. Victor Hoffbrand 및 John E. Pettit(eds.)(Harcourt Publishers Ltd., 2000)에 설명된 개정된 유럽-미국 림프종(Revised European-American Lymphoma: REAL) 체계와 같이 당 업계에 공지된 분류 체계에 따라 당업자(예를 들어, 종양 학자 또는 병리학자)에 의해 확인되는 임의의 것을 포함한다. 특히, 도 11.57, 11.58 및 11.59의 목록을 참조한다. 보다 구체적인 예는 재발성 또는 불응성 NHL, 최전선 저급 NHL, III/IV기 NHL, 화학 요법 내성 NHL, 전구체 B 림프구성 백혈병 및/또는 림프종, 소 림프구성 림프종, B 세포 만성 림프구성 백혈병 및/또는 전-림프구성 백혈병 및/또는 소 림프구성 림프종, B-세포 전-림프구성 림프종, 면역 세포종 및/또는 림프질구성 림프종, 림프질구성 림프종, 변연부 B 세포 림프종, 비장 변연부 림프종, 결절 외 변연부-MALT 림프종, 결절 변연부 림프종, 털세포 백혈병, 형질 세포종 및/또는 형질 세포 골수종, 저급/소포성 림프종, 중급/소포성 NHL, 외투 세포 림프종, 소포 중심 림프종(여포), 중급 미만성 NHL, 미만성 거대 B-세포 림프종, 공격성 NHL(공격성 최전선 NHL 및 공격성 재발 NHL 포함), 자가 줄기 세포 이식 후 재발 또는 불응성 NHL, 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종, 원발 삼출 림프종, 고급 면역 모세포 NHL, 고급 림프 모세포 NHL, 고급 소형 비-절단 세포 NHL, 부피가 큰 질병 NHL, 버킷 림프종, 전구체(말초) 거대 입상 림프구성 백혈병, 진균증 곰팡이 및/또는 세자리(Sézary) 증후군, 피부(skin)(피부의(cutaneous)) 림프종, 역형성 대 세포 림프종, 혈관 중심 림프종을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0078] 이중 특이적 항원 결합 분자

[0079] 본 발명의 항체는 단일 특이적, 이중 특이적 또는 다중 특이적일 수 있다. 다중 특이적 항체는 하나의 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나 하나 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원 결합 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어, Tutt 등, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer 등, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244 참조. 본 발명의 항-CD28 항체 및/또는 항-CD22 항체는 또 다른 기능성 분자, 예를 들어 또 다른 펩티드 또는 단백질에 연결되거나 공동-발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 하나 이상의 다른 분자 실체, 예컨대 다른 항체 또는 항체 단편에(예를 들어, 화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 회합 등에 의해) 기능적으로 연결되어 두 번째 결합 특이성을 갖는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체를 생성한다.

[0080] 본원에서 "항-CD28 항체" 및/또는 "항-CD-22 항체"라는 표현의 사용은 단일 특이적 항-CD28 항체 및/또는 단일 특이적 항-CD22 항체뿐만 아니라 CD28 결합 아암 또는 CD22 결합 아암 및 표적 항원에 결합하는 아암을 포함하는 이중 특이적 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명은 면역 글로불린의 하나의 아암이 인간 CD28 또는 CD22에 결합하고 면역 글로불린의 다른 아암이 표적 항원에 특이적인 이중 특이적 항체를 포함한다. CD28 또는 CD22 이중 특이적 항체의 다른 아암이 결합하는 표적 항원은 표적화된 면역 반응이 바람직한 세포, 조직, 기관, 미생물 또는 바이러스 상에 또는 그 부근에서 발현되는 임의의 항원일 수 있다. CD28-결합 아암은 본원의 표 1에 제시된 바와 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다. CD22-결합 아암은 본원의 표 1에 제시된 바와 같은 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 특정 실시 양태에서, CD28-결합 아암은 인간 CD28에 결합하고 인간 T 세포 증식을 유도한다.

[0081] 항체의 하나의 아암이 CD28에 결합하고 다른 아암이 표적 항원에 결합하는 본 발명의 이중 특이적 항체의 맥락에서, 표적 항원은 CD22와 같은 종양 관련 항원일 수 있다.

[0082] 특정 예시적인 실시 양태에 따르면, 본 발명은 CD28 및 CD22에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 이러한 분자는 본원에서 예를 들어 "항-CD28/항-CD22" 또는 "항-CD28xCD22" 또는 "CD28xCD22" 또는 "항-CD22/항-CD28" 또는 "항-CD22xCD28" 또는 "CD22xCD28" 이중 특이적 분자, 또는 "αCD28 x αCD28", 또는 "αCD28 x αCD22", 또는 기타 유사한 용어로 지칭될 수 있다.

[0083] 특정 예시적 실시 양태에 따르면, 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 이중 특이적 항체)는 이펙터 아암 및 표적화 아암을 가질 수 있다. 이펙터 아암은 이펙터 세포(예를 들어, T 세포) 상의 항원에 결합하는 제1 항원 결합 도메인(예를 들어, 항-CD28 항체)일 수 있다. 표적화 아암은 표적 세포(예를 들어, 종양 세포) 상의 항원에 결합하는 제2 항원 결합 도메인(예를 들어, 항-CD22 항체)일 수 있다. 특정 예시적 실시 양태에 따르면, 이펙터 아암은 CD28에 결합하고 표적화 아암은 CD22에 결합한다. 이중 특이적 항-CD28/CD22는 이펙터 세포(예를 들어, T 세포)에 공동 자극 신호를 제공할 수 있다. 이펙터 아암은 클러스터링없이는 T 세포를 자극하는 효과가 없다. 이펙터 아암만으로는 표적화 아암과 조합하지 않는 한 T 세포를 자극하는 효과가 거의 없다. 종양 표적화 아암은 불완전한 종양 특이성을 가질 수 있다. 표적화 아암(예를 들어, CD22)의 표적 항원은 종양 세포의 일부에서 발현될 수 있다. 종양 표적화 아암의 특이성은 항-CD3 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 항-CD3/CD20 이중 특이적 항체)와의 조합과 중첩함으로써 증가될 수 있다.

- [0084] 본원에 사용된 표현 "항원-결합 분자"는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 CDR 및/또는 프레임워크 영역(FR)과 조합하여 특정 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하거나 이로 구성된 단백질, 폴리펩티드 또는 분자 복합체를 의미한다. 특정 실시 양태에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 항체의 단편이며, 이러한 용어는 본원의 다른 곳에서 정의된다.
- [0085] 본원에 사용된 표현 "이중 특이적 항원 결합 분자"는 적어도 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질, 폴리펩티드 또는 분자 복합체를 의미한다. 이중 특이적 항원 결합 분자 내의 각각의 항원 결합 도메인은 단독으로 또는 하나 이상의 추가 CDR 및/또는 FR과 조합하여 특정 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 본 발명의 맥락에서, 제1 항원 결합 도메인은 제1 항원(예를 들어, CD28)에 특이적으로 결합하고, 제2 항원 결합 도메인은 제2의 별개 항원(예를 들어, CD22)에 특이적으로 결합한다.
- [0086] 본 발명의 특정 예시적인 실시 양태에서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 이중 특이적 항체이다. 이중 특이적 항체의 각 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 도메인(HCVR) 및 경쇄 가변 도메인(LCVR)을 포함한다. 제1 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 이중 특이적 항체)의 맥락에서, 제1 항원 결합 도메인의 CDR은 접두사 "D1"로 지정될 수 있고, 제2 항원 결합 도메인의 CDR은 접두사 "D2"로 지정될 수 있다. 따라서, 제1 항원-결합 도메인의 CDR은 본원에서 D1-HCDR1, D1-HCDR2 및 D1-HCDR3으로 지칭될 수 있으며; 제2 항원 결합 도메인의 CDR은 본원에서 D2-HCDR1, D2-HCDR2 및 D2-HCDR3으로 지칭될 수 있다.
- [0087] 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 직접적 또는 간접적으로 서로 연결되어 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성할 수 있다. 대안적으로, 제1 항원 결합 도메인 및 제2 항원 결합 도메인은 각각 별도의 다량체화 도메인에 연결될 수 있다. 하나의 다량체화 도메인과 다른 다량체화 도메인의 회합은 2개의 항원 결합 도메인 간의 회합을 용이하게 하여 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성한다. 본원에서 사용되는 "다량체화 도메인"은 동일하거나 유사한 구조 또는 구성의 제2 다량체화 도메인과 회합하는 능력을 갖는 임의의 거대 분자, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 아미노산이다. 예를 들어, 다량체화 도메인은 면역 글로불린 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 다량체화 성분의 비제한적인 예는 면역 글로불린의 Fc 부분(C_H2-C_H3 도메인 포함), 예를 들어 이소형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 각 이소형 군 내의 알로타입(allotype)으로부터 선택되는 IgG의 Fc 도메인이다.
- [0088] 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자는 전형적으로 2개의 다량체화 도메인, 예를 들어 각각 개별적으로 개별 항체 중쇄의 일부인 2개의 Fc 도메인을 포함할 것이다. 제1 및 제2 다량체화 도메인은 예를 들어, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4와 같은 동일한 IgG 이소형일 수 있다. 대안적으로, 제1 및 제2 다량체화 도메인은 예를 들어 IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 등과 같은 상이한 IgG 이소형일 수 있다.
- [0089] 특정 실시 양태에서, 다량체화 도메인은 적어도 하나의 시스테인 잔기를 함유하는 1개 내지 약 200개 아미노산 길이의 Fc 단편 또는 아미노산 서열이다. 다른 실시 양태에서, 다량체화 도메인은 시스테인 잔기, 또는 짧은 시스테인 함유 펩티드다. 다른 다량체화 도메인은 류신 지퍼, 나선-루프 모티프 또는 코일된 코일 모티프를 포함하거나 이로 구성된 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0090] 임의의 이중 특이적 항체 형식 또는 기술을 사용하여 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 제조할 수 있다. 예를 들어, 제1 항원 결합 특이성을 갖는 항체 또는 이의 단편은 하나 이상의 다른 분자 실체, 예를 들어 제2 항원 결합 특이성을 갖는 다른 항체 또는 항체 단편에(예를 들어, 화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합 등에 의해) 기능적으로 연결되어, 이중 특이적 항원 결합 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 특정 예시적인 이중 특이적 형식은 제한없이, 예를 들어, scFv 기반 또는 디아바디 이중 특이적 형식, IgG-scFv 융합, 이중 가변 도메인(OVO)-Ig, 퀴드로마, 노브-인투-홀(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예: 노브-인투-홀 있는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEEO)바디, 류신 지퍼, Quobody, IgG1/IgG2, 이중 작용 Fab(OAF)-IgG 및 Mab² 이중 특이적 형식을 포함한다(예를 들어, 앞서 언급한 형식의 검토를 위해서는, Klein 등 2012, *mAbs* 4:6, 1-11 및 여기에 인용된 참고 문헌 참조).
- [0091] 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자의 맥락에서, 다량체화 도메인, 예를 들어 Fc 도메인은 야생형의 자연 발생 버전의 Fc 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화(예: 삽입, 결실 또는 치환)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 Fc와 FcRn 사이에 변형된 결합 상호 작용(예를 들어, 증강 또는 감소)을 갖는 변형된 Fc 도메인을 초래하는 Fc 도메인에서 하나 이상의 변형을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 일 실시 양태에서, 이중 특이적 항원 결합 분자는 C_H2 또는 C_H3 영역에서 변형을 포함하고, 여기서 변형은 산성 환경(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 약 6.0 범위인 엔도솜(endosome))에서 FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시

킨다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는 예를 들어 위치 250(예: E 또는 Q); 250 및 428(예: L 또는 F); 252(예: LN/FIW 또는 T), 254(예: S 또는 T) 및 256(예: S/R/Q/EID 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예: UR/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예: H/F 또는 V)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서 변형; 또는 위치 307 또는 308(예를 들어, 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 일 실시 양태에서, 변형은 428L(예를 들어, M428L) 및 434S(예를 들어, N434S) 변형; 428L, 2591(예: V2591), 및 308F(예: V308F) 변형; 433K(예: H433K) 및 434(예: 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예: 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예: T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예: 308F 또는 308P)을 포함한다.

[0092] 본 발명은 또한 제1 C_H3 도메인 및 제2 Ig C_H3 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 Ig C_H3 도메인은 적어도 하나의 아미노산이 서로 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중 특이적 항체에 비해 단백질 A에 대한 이중 특이적 항체의 결합을 감소시킨다. 일 실시 양태에서, 제1 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고 제2 Ig C_H3 도메인은 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링으로; EU 넘버링으로 H435R)과 같은 단백질 A 결합을 감소 또는 폐지하는 돌연변이를 함유한다. 제2 C_H3은 Y96F 변형(IMGT에 의해; EU에 의해 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 제2 C_H3 내에서 발견될 수 있는 추가 변형은 다음을 포함한다: IgG1 항체의 경우 D16E, L 18M, N44S, K52N, V57M 및 V821(IMGT에 의해; EU에 의해 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V4221); IgG2 항체의 경우 N44S, K52N 및 V821(IMGT; EU에 의해 N384S, K392N 및 V4221); 및 IgG4 항체의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V821(IMGT에 의해; EU에 의해 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V4221).

[0093] 특정 실시 양태에서, Fc 도메인은 하나 이상의 면역 글로불린 이소형으로부터 유래된 키메라 조합형 Fc 서열일 수 있다. 예를 들어, 키메라 Fc 도메인은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 C_H2 영역으로부터 유래된 C_H2 서열의 일부 또는 전부, 및 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4로부터 유래된 C_H3 서열의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 키메라 Fc 도메인은 또한 키메라 힌지 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역에서 유래된 "하부 힌지" 서열과 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 "상부 힌지" 서열을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항원 결합 분자에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 특정 예는 N-에서 C-말단까지: [IgG4 C_H1]-[IgG4 상부 힌지]-[IgG2 하부 힌지]-[IgG4 CH2]-[IgG4 C_H3]를 포함한다. 본원에 기재된 임의의 항원 결합 분자에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 또 다른 예는 N-에서 C-말단까지: [IgG1 C_H1]-[IgG1 상부 힌지]-[IgG2 하부 힌지]-[IgG4 C_H2]-[IgG1 C_H3]를 포함한다. 본 발명의 임의의 항원 결합 분자에 포함될 수 있는 키메라 Fc 도메인의 이들 및 다른 예는 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함되는 WO2014/022540A1에 기재되어 있다. 이러한 일반적인 구조적 배열을 갖는 키메라 Fc 도메인 및 이의 변이체는 Fc 수용체 결합을 변경하여 Fc 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다.

[0094] 서열 변이체

[0095] 본 발명의 항체 및 이중 특이적 항원 결합 분자는 개별 항원 결합 도메인이 유래된 상응하는 생식선 서열과 비교하여 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 본원에 개시된 아미노산 서열을 예를 들어 공개 항체 서열 데이터베이스로부터 입수 가능한 생식선 서열과 비교함으로써 쉽게 확인할 수 있다. 본 발명의 항원 결합 분자는 본원에 개시된 임의의 예시적인 아미노산 서열로부터 유래된 항원 결합 단편을 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 다른 인간 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 상응하는 생식선 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이된다(이러한 서열 변화는 본원에서 집합적으로 "생식선 돌연변이"로 칭함). 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로 시작하여, 당업자는 하나 이상의 개별 생식선 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 수많은 항체 및 항원 결합 단편을 쉽게 생산할 수 있다. 특정 실시 양태에서, V_H 및/또는 V_L 도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 항원 결합 도메인이 원래 유래된 원래 생식선 서열에서 발견된 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 특정 잔기만, 예를 들어 FR1의 처음 8개 아미노산 내에서 또는 FR4의 마지막 8개 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만이 원래의 생식선 서열로 다시 돌연변이된다. 다른 실시 양태에서, 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들)는 상이한 생식선 서열(즉, 항원 결합 도메인이 원래 유래된 생식선 서열과 상이한 생식선

서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이된다. 더욱이, 항원 결합 도메인은 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내에서 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 함유할 수 있으며, 예를 들어 특정 개별 잔기는 특정 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이되는 반면, 원래의 생식선 서열과 상이한 다른 특정 잔기는 유지되거나 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단 획득되면, 하나 이상의 생식선 돌연변이를 포함하는 항원 결합 도메인은 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화성, 개선되거나 강화된 길항적 또는 효능적 생물학적 특성(경우에 따라), 감소된 면역 원성 등과 같이 하나 이상의 원하는 특성에 대해 쉽게 테스트될 수 있다. 이러한 일반적인 방식으로 수득된 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자가 본 발명에 포함된다.

[0096] 본 발명은 또한 하나 또는 둘 모두의 항원 결합 도메인이 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것의 변이체를 포함하는 항원 결합 분자를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것에 대한 예를 들어 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R기)를 갖는 다른 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는다. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 기의 예는 다음을 포함한다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; (2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파르트레이트 및 글루탐ате이트, 및 (7) 황 함유 측쇄는 시스테인과 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐ате이트-아스파르트레이트, 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안으로, 보존적 대체는 Gonnet 등(1992) *Science* 256:1443-1445에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 모든 변경이다. "보통의 보존적인" 대체는 PAM250 로그 우도 행렬에서 음이 아닌 값을 갖는 모든 변경이다.

[0097] 본 발명은 또한 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 임의의 것과 실질적으로 동일한 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 포함한다. 아미노산 서열을 언급할 때 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은 2개의 아미노산 서열이, 예컨대 기본 겹가중치를 사용하는 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때 적어도 95% 서열 동일성, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 다르다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 다른 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사도를 상향 조정하여 치환의 보존적 특성을 수정할 수 있다. 이러한 조정을 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Pearson(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331 참조.

[0098] 서열 동일성이라고도 하는 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하여 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 할당된 유사성 측정을 사용하여 유사한 서열을 일치시킨다. 예를 들어, GCG 소프트웨어에는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램이 포함되어 있으며, 이 프로그램은 기본 매개 변수와 함께 사용되어 서로 다른 종의 유기체 또는 야생형 단백질과 그의 뮤테인 간의 상동성 폴리펩티드와 같은 밀접하게 관련된 폴리펩티드 간의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정한다. 예를 들어, GCG 버전 6.1 참조. 폴리펩티드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 기본 또는 권장 매개 변수를 사용하는 FASTA를 사용하여 비교할 수도 있다. FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리와 검색 서열 사이에 가장 잘 겹치는 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(Pearson(2000) *supra*). 본 발명의 서열을 상이한 유기체로부터의 다수의 서열을 함유하는 데이터베이스와 비교할 때 또 다른 바람직한 알고리즘은 기본 매개 변수를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들어, Altschul 등(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 및 Altschul 등(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 참조.

[0099] pH 의존적 결합

[0100] 본 발명은 pH 의존적 결합 특성을 갖는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 항-CD28 항체는 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 CD28에 대한 감소된 결합을 나타낼 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 항-CD22 항체는 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 CD22에 대한 향상된 결합을 나타낼 수 있다. 표현 "산성 pH"는 약 6.2 미만, 예를 들어 약 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0 이하의 pH 값을 포함한다. 본원에서 사용되는 표현 "중성 pH"는 약 7.0 내지 약 7.4의 pH를 의미한다. 표현 "중성 pH"는 약 7.0, 7.05, 7.1, 7.15,

7.2, 7.25, 7.3, 7.35 및 7.4의 pH 값을 포함한다.

[0101] 특정 예에서, "중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 결합 감소"는 중성 pH에서 그의 항원에 결합하는 항체의 K_D 값에 대한 산성 pH에서 그의 항원에 결합하는 항체의 K_D 값(또는 그 반대)의 비율로 표현된다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 산성/중성 K_D 비가 약 3.0 이상을 나타내는 경우 본 발명의 목적상 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 "중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 CD28에 대한 결합 감소"를 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 특정 예시적 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 산성/중성 K_D 비는 약 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 이상일 수 있다.

[0102] pH 의존적 결합 특성을 갖는 항체는 예를 들어, 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 특정 항원에 대한 감소된(또는 강화된) 결합에 대해 항체 집단을 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 추가로, 아미노산 수준에서 항원 결합 도메인의 변형은 pH 의존적 특성을 가진 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 도메인(예를 들어, CDR 내)의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘 잔기로 치환함으로써, 중성 pH에 비해 산성 pH에서 항원 결합이 감소된 항체를 얻을 수 있다.

[0103] **Fc 변이체를 포함하는 항체**

[0104] 본 발명의 특정 실시 양태에 따르면, 예를 들어 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 향상시키거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자가 제공된다. 예를 들어, 본 발명은 Fc 도메인의 C_H2 또는 C_H3 영역에 돌연변이를 포함하는 항체 및 항원 결합 분자를 포함하며, 여기서 돌연변이(들)는 산성 환경(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 약 6.0 범위의 엔도솜)에서 FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 돌연변이는 동물에게 투여될 때 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는 예를 들어 위치 250(예, E 또는 Q); 250 및 428(예: L 또는 F); 252(예: L/Y/F/W 또는 T), 254(예: S 또는 T) 및 256(예: S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428 및/또는 433(예: H/L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434(예: H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 위치 250 및/또는 428에서 변형; 또는 위치 307 또는 308(예를 들어, 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 일 실시 양태에서, 변형은 428L(예: M428L) 및 434S(예: N434S) 변형; 428L, 259I(예: V259I) 및 308F(예: V308F) 변형; 433K(예: H433K) 및 434(예: 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예: 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예: T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예: 308F 또는 308P)을 포함한다.

[0105] 예를 들어, 본 발명은 250Q 및 248L(예: T250Q 및 M248L); 252Y, 254T 및 256E(예: M252Y, S254T 및 T256E); 428L 및 434S(예: M428L 및 N434S); 및 433K 및 434F(예: H433K 및 N434F)로 구성된 군에서 선택된 돌연변이의 하나 이상의 쌍 또는 군을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 전술한 Fc 도메인 돌연변이 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이의 모든 가능한 조합이 본 발명의 범위 내에서 고려된다.

[0106] **항체 및 항원 결합 분자의 생물학적 특성**

[0107] 본 발명은 인간 CD28 및/또는 CD22에 높은 친화도로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명은 또한 치료적 맥락 및 원하는 특정 표적화 특성에 따라 중간 또는 낮은 친화도로 인간 CD28 및/또는 CD22에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예를 들어, 하나의 아암이 CD28에 결합하고 다른 아암이 표적 항원(예를 들어, CD22)에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자의 맥락에서, 표적 항원 결합 아암이 표적 항원에 높은 친화도로 결합하고 항-CD28 아암은 중간 정도 또는 낮은 친화도로 CD28에 결합하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 방식으로, 표적 항원을 발현하는 세포에 대한 항원 결합 분자의 우선적 표적화는 일반/비표적 CD28 결합 및 그에 따른 부작용을 피하면서 달성될 수 있다.

[0108] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 예컨대, 본 명세서의 실시예 5에 정의된 검정 형식을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때 약 15 nM 미만의 K_D (예를 들어, 25°C에서) 인간 CD22에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 15 nM 미만, 약 14 nM 미만, 약 13 nM 미만, 약 12 nM 미만, 약 11 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 9 nM 미만, 약 8 nM 미만, 약 7 nM 미만, 약 6 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 또는 약 1

nM 미만의 K_D 로 인간 CD22에 결합한다.

[0109] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 60 μ M 미만의 K_D 로 원숭이 CD22(예를 들어, 25°C에서)에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 60 μ M 미만, 약 59 μ M 미만, 약 58 μ M 미만, 약 57 μ M 미만, 약 56 μ M 미만, 약 55 μ M 미만, 약 54 μ M 미만, 약 53 μ M 미만, 약 52 μ M 미만, 약 51 μ M 미만, 약 50 μ M 미만, 약 49 μ M 미만, 약 48 μ M 미만, 약 47 μ M 미만, 약 46 μ M 미만, 약 45 μ M 미만, 약 44 μ M 미만, 약 43 μ M 미만, 약 42 μ M 미만, 약 41 μ M 미만, 약 40 μ M 미만, 약 39 μ M 미만, 약 38 μ M 미만, 약 37 μ M 미만, 약 36 μ M 미만, 약 35 μ M 미만, 약 34 μ M 미만, 약 33 μ M 미만, 약 32 μ M 미만, 약 31 μ M 미만, 약 30 μ M 미만, 약 25 μ M 미만, 약 20 μ M 미만, 약 15 μ M 미만, 또는 약 10 μ M 미만의 K_D 로 원숭이 CD22에 결합한다.

[0110] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 45 μ M 미만의 K_D 로 인간 CD28(예를 들어, 25°C에서)에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 45 μ M 미만, 약 44 μ M 미만, 약 43 μ M 미만, 약 42 μ M 미만, 약 41 μ M 미만, 약 40 μ M 미만, 약 39 μ M 미만, 약 38 μ M 미만, 약 37 μ M 미만, 약 36 μ M 미만, 약 35 μ M 미만, 약 34 μ M 미만, 약 33 μ M 미만, 약 32 μ M 미만, 약 31 μ M 미만, 약 30 μ M 미만, 약 25 μ M 미만, 약 20 μ M 미만, 약 15 μ M 미만, 또는 약 10 μ M 미만의 K_D 로 인간 CD28에 결합한다.

[0111] 본 발명은 또한 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 25°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 7.5분 초과,의 해리 반감기($t_{1/2}$)로 인간 CD22에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 25°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 7분 초과, 약 10분 초과, 약 15분 초과, 약 20분 초과, 약 25분 초과, 약 30분 초과, 약 35분 초과, 약 40분 초과, 약 45분 초과, 약 50분 초과, 약 55분 초과, 약 60분 초과, 약 65분 초과, 약 70분 초과, 약 75분 초과, 또는 약 100분 초과,의 $t_{1/2}$ 로 인간 CD22에 결합한다.

[0112] 본 발명은 또한 예를 들어, 본원의 실시예에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 37°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 4.3분 초과,의 해리 반감기($t_{1/2}$)로 원숭이 CD22에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 25°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 4분 초과, 약 5분 초과, 약 6분 초과, 약 7분 초과, 약 8분 초과, 약 9분 초과, 약 10분 초과, 약 15분 초과, 약 20분 초과, 약 25분 초과, 약 30분 초과, 약 35분 초과, 약 40분 초과, 약 45분 초과, 또는 약 50분 초과,의 $t_{1/2}$ 로 CD28에 결합한다.

[0113] 본 발명은 또한 예를 들어, 본원의 실시예 5에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 25°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 2.3분 초과,의 해리 반감기($t_{1/2}$)로 인간 CD28에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예에 정의된 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 25°C 또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명으로 측정할 때, 약 2분 초과, 약 5분 초과, 약 10분 초과, 약 20분 초과, 약 30분 초과, 약 40분 초과, 약 50분 초과, 약 60분 초과, 약 70분 초과, 약 80분 초과, 약 90분 초과, 약 100분 초과, 약 200분 초과, 약 300분 초과, 약 400분 초과, 약 500분 초과, 약 600분 초과, 약 700분 초과, 약 800분 초과, 약 900분 초과, 약 1000분 초과, 또는 약 1200분 초과,의 $t_{1/2}$ 로 CD28에 결합한다.

[0114] 본 발명은 또한 인간 CD28 및 인간 및 원숭이 CD22에 결합할 수 있는 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 이중 특이적 항체)를 포함한다. 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD28 및/또는 CD22를 발현하는 세포와 특이적으로 상호 작용한다. 이중 특이적 항원 결합 분자가 CD28 및/또는 CD22를 발현하는 세포에 결합하는 정도는 본원의 실시예 6에 예시된 바와 같이 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 CD28을 발현하지만 CD22를 발현하지 않는 인간 세포주 또는 사이노몰구스 세포(예를 들어, T 세포), 및 CD22를 발현하지만 CD28을 발현하지 않는 인간 세포주 또는 사이노몰구스 세포(예

를 들어, B 세포 또는 Nalm6 세포)에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명은 실시예 6에 제시된 바와 같은 FACS 분석 또는 실질적으로 유사한 분석을 사용하여 결정된 바와 같이, 약 1.3×10^{-6} 내지 약 2.3×10^{-8} M 이하의 EC_{50} 값으로 상기 언급된 세포 및 세포주 중 임의의 것에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다.

[0115] 본 발명은 인간 CD28 및/또는 인간 CD22에 결합할 수 있는 이중 특이적 항원 결합 분자(예를 들어, 이중 특이적 항체)를 포함한다. 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD28 및/또는 CD22를 발현하는 세포와 특이적으로 상호 작용한다. 이중 특이적 항원 결합 분자가 CD28 및/또는 CD22를 발현하는 세포에 결합하는 정도는 본원의 실시예 7에 예시된 바와 같이 유세포 분석에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 CD28은 발현하지만 CD22는 발현하지 않는 인간 세포(예를 들어, T 세포), 및 CD22는 발현하지만 CD28은 발현하지 않는 인간 세포주(예를 들어, 인간 CD22, 및 CD80 및 CD86을 삭제하도록 유전자 변형된 Raji B 세포로 형질 도입된 HEK293 세포)와 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명은 실시예 7에 제시된 바와 같은 유세포 분석 또는 실질적으로 유사한 분석에 의해 결정된 바와 같이 약 1.14×10^{-8} 내지 약 9.76×10^{-9} M 이하의 EC_{50} 값으로 상기 언급된 세포 및 세포주 중 임의의 것에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다.

[0116] 본 발명은 또한 종양 세포의 CD20xCD3 T 세포 매개 사멸의 효능을 유도하거나 향상시키는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 예를 들어, 본원의 실시예 8에 정의된 분석 형식을 사용하는 시험관 내 T 세포 매개 종양 세포 사멸 분석(예를 들어, 항-CD20xCD3 및 항-CD28xCD22 항체의 존재하에 인간 PBMC에 의한 Raji 세포 사멸의 정도 평가), 또는 실질적으로 유사한 분석에서 측정할 때, 약 1.48×10^{-10} M 미만의 EC_{50} 으로 종양 세포의 CD20xCD3 T 세포 매개 사멸의 효능을 유도하거나 증가시키는 항-CD28xCD22 항체를 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어, 본원의 실시예 8에 정의된 검정 형식을 사용하는 시험관 내 T 세포 매개 종양 세포 사멸 분석 또는 실질적으로 유사한 검정에 의해 측정할 때, 약 150 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 75 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 25 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 5.0 pM 미만, 약 4.0 pM 미만, 약 3.0 pM 미만, 약 2.5 pM 미만, 약 2.0 pM 또는 약 1.5 pM 미만의 EC_{50} 값으로 T 세포 매개 종양 세포 사멸(예를 들어, Raji 세포의 PBMC 매개 사멸)을 유도한다.

[0117] 본 발명은 또한 인간 PBMC에서 T-세포 활성화, IL-2 방출 유도, CD25+ 상향 조절 유도; 및 CD22 발현 세포주상의 인간 T-세포 매개 세포 독성 증가(예를 들어, 본원의 실시예 9 참조)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특징을 나타내는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명은 또한 CD20 및 CD3에 결합하는 이중 특이적 항체, 예컨대, 이에 제한되지 않지만 REGN1979와 조합될 때, CD22를 발현하는 종양 세포의 사멸을 향상시키는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다. 본 발명은 또한 PD-1에 결합하는 항체, 예컨대, 이에 제한되지 않지만 세미플리맵과 조합될 때, CD22를 발현하는 종양 세포의 사멸을 향상시키는 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함한다(실시예 10 내지 15 참조).

[0118] 에피토프 매핑 및 관련 기술

[0119] 본 발명의 항원 결합 분자가 결합하는 CD28 또는 CD22상의 에피토프는 CD28 단백질 또는 CD22 단백질의 아미노산의 3개 이상(예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상)의 단일 연속 서열로 구성될 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 CD28 또는 CD22의 복수의 비연속 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 구성될 수 있다. 본 발명의 항체는 CD28 단량체 내에 함유된 아미노산과 상호 작용할 수 있거나, CD28 이량체의 두 개의 상이한 CD28 사슬상의 아미노산과 상호 작용할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특정 항원 결합 부위와 상호 작용하는 항원 결정자를 지칭한다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 다른 항체는 항원의 다른 영역에 결합할 수 있으며 다른 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 입체 형태적이거나 선형적일 수 있다. 입체 형태적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 서로 다른 세그먼트에서 공간적으로 나란히 배치된 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성되는 것이다. 특정 상황에서 에피토프는 항원상의 당류, 포스포릴기 또는 설포닐기의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0120] 당업자에게 알려진 다양한 기술을 사용하여 항체의 항원 결합 도메인이 폴리펩티드 또는 단백질 내에서 "하나 이상의 아미노산과 상호 작용"하는지 여부를 결정할 수 있다. 특정 항체 또는 항원 결합 도메인의 에피토프 또는 결합 도메인을 결정하기 위해 사용할 수 있는 예시적인 기술은 예를 들어 Antibodies, Harlow 및 Lane(Cold

Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)에 기재된 바와 같은 통상적인 교차 차단 검정(crossblocking assay), 점 돌연변이 유발(예: 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발, 아르기닌 스캐닝 돌연변이 유발 등), 펩티드 블롯 분석(Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), 프로테아제 보호, 및 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법을 사용할 수 있다(Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). 항체가 상호 작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 확인하는 데 사용할 수 있는 또 다른 방법은 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 교환이다. 일반적으로 수소/중수소 교환 방법은 관심있는 단백질에 중수소 표지한 다음 항체를 중수소 표지된 단백질에 결합하는 것을 포함한다. 다음으로, 단백질/항체 복합체는 물로 옮겨져(중수소로 표지된 채로 있는) 항체에 의해 보호되는 잔기를 제외한 모든 잔기에서 수소-중수소 교환이 일어나도록 한다. 항체의 해리 후, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분석을 거쳐 항체가 상호 작용하는 특정 아미노산에 해당하는 중수소 표지된 잔기를 밝힌다. 예를 들어, Ehring(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen 및 Smith(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A 참조. 또한 X-선 결정 구조 분석을 항체가 상호 작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 확인하는 데 사용할 수 있다.

- [0121] 본 발명은 본원에 기재된 특정 예시적인 항체(예를 들어, 본원의 표 6에 기재된 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하는 항체) 중 임의의 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항-CD28 및 항-CD22 항체를 추가로 포함한다.
- [0122] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 실시예 3 및 4에 기재된 질량 분석법에 의해 검출되는 수소/중수소 교환에 의해 결정된 바와 같이, 서열 번호 34, 서열 번호 35 및/또는 서열 번호 36의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 인간 CD22상의 에피토프에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0123] 마찬가지로, 본 발명은 또한 CD28 및/또는 CD22에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 특정 예시적인 항체(예를 들어, 본원 표 6에 기재된 바와 같은 아미노산 서열 중 임의의 것을 포함하는 항체)와 경쟁하는 항-CD28 및/또는 항-CD22 항체를 포함한다.
- [0124] 본 발명은 또한 인간 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 인간 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 특정 예시적인 CD28 특이적 항원 결합 도메인 중 임의의 것과 동일한 CD28 상의 에피토프에 결합하고/거나 제2 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 특정 예시적인 CD22 특이적 항원 결합 도메인 중 임의의 것과 동일한 CD22상의 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0125] 마찬가지로, 본 발명은 인간 CD28에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 인간 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 단편을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 본원에 기재된 특정 예시적인 CD28 특이적 항원 결합 도메인 중 임의의 것과 CD28에 대한 결합에 대해 경쟁하고/거나 제2 항원-결합 도메인은 본원에 기재된 특정 예시적인 CD22 특이적 항원 결합 도메인 중 임의의 것과 CD22에 대한 결합에 대해 경쟁한다.
- [0126] 특정 항원 결합 분자(예를 들어, 항체) 또는 이의 항원 결합 도메인이 본 발명의 기준 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 결합을 위해 경쟁하는지는 당 업계에 알려진 통상적인 방법을 이용하여 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본 발명의 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와 동일한 CD28(또는 CD22)상의 에피토프에 결합하는지 확인하기 위해, 기준 이중 특이적 분자를 먼저 CD28 단백질(또는 CD22 단백질)에 결합하도록 허용한다. 다음으로, CD28(또는 CD22) 분자에 결합하는 테스트 항체의 능력을 평가한다. 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와의 포화 결합 후에 시험 항체가 CD28(또는 CD22)에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체는 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와 다른 CD28(또는 CD22) 에피토프에 결합한다고 결론을 내릴 수 있다. 반면에, 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와의 포화 결합 후 시험 항체가 CD28(또는 CD22) 분자에 결합할 수 없는 경우, 시험 항체는 본 발명의 기준 이중 특이적 항원 결합 분자에 의해 결합된 에피토프와 동일한 CD28(또는 CD22)의 에피토프에 결합할 수 있다. 추가의 통상적인 실험(예: 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)을 수행하여 관찰된 시험 항체의 결합 결과가 실제로 기준 이중 특이적 항원 결합 분자와 동일한 에피토프에 대한 결합 때문인지 또는 입체 차단(또는 다른 현상)이 관찰된 결합의 결여에 대한 책임이 있는지 확인할 수 있다. 이러한 종류의 실험은 ELISA, RIA, Biacore, 유세포 분석 또는 당 업계에서 이용 가능한 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 분석을 사용하여 수행할 수 있다. 본 발명의 특정 실시 양태에 따르면, 예를 들어, 경쟁 결합 검정으로 측정했을 때 1배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 과량의 하나의 항원 결합 단백질이 적어도 50% 그러나 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%까지 다른 것의 결합을 억제할 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 동일한(또는 중첩되는) 에피토프에 결합한다(예를 들어, Junghans 등, *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502 참조). 대안적으로, 하나의 항원 결합 단백질의 결합을 감소 또는 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 본질적으로 다른 항원

결합 단백질의 결합을 감소 또는 제거하는 경우, 2개의 항원 결합 단백질이 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 하나의 항원 결합 단백질의 결합을 감소 또는 제거하는 아미노산 돌연변이의 하위 세트만이 다른 것의 결합을 감소 또는 제거하는 경우, 2개의 항원 결합 단백질은 "중복 에피토프"를 갖는 것으로 간주된다.

[0127] 항체 또는 이의 항원 결합 도메인이 기준 항원 결합 분자와 결합에서 경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, 전술한 결합 방법론은 두 가지 방향으로 수행된다: 제1 방향에서, 기준 항원 결합 분자는 포화 조건 하에서 CD28 단백질(또는 CD22 단백질)에 결합하도록 한 다음, 시험 항체가 CD28(또는 CD22) 분자에 결합하는 것을 평가한다. 제2 방향에서, 시험 항체는 포화 조건 하에서 CD28(또는 CD22) 분자에 결합하도록 한 다음, 기준 항원 결합 분자가 CD28(또는 CD22) 분자에 결합하는 것을 평가한다. 두 방향 모두에서 첫 번째(포화) 항원 결합 분자만이 CD28(또는 CD22) 분자에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체와 기준 항원 결합 분자가 CD28(또는 CD22)에 대한 결합을 위해 경쟁한다고 결론 지을 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 기준 항원 결합 분자와 결합에서 경쟁하는 항체는 반드시 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합할 필요는 없지만, 중첩되거나 인접한 에피토프를 결합함으로써 기준 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0128] **항원 결합 도메인의 제조 및 이중 특이적 분자의 구축**

[0129] 특정 항원에 특이적인 항원 결합 도메인은 당 업계에 공지된 임의의 항체 생성 기술에 의해 제조될 수 있다. 일단 획득되면, 2개의 상이한 항원(예를 들어, CD28 및 CD22)에 특이적인 2개의 상이한 항원 결합 도메인은 통상적인 방법을 사용하여 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 생성하기 위해 서로에 대해 적절하게 배열될 수 있다. (본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 구성하는 데 사용될 수 있는 예시적인 이중 특이적 항체 형식에 대한 논의는 본원의 다른 곳에서 제공된다). 특정 실시 양태에서, 본 발명의 다중 특이적 항원 결합 분자의 하나 이상의 개별 성분(예를 들어, 중쇄 및 경쇄)은 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체로부터 유래된다. 이러한 항체를 제조하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자의 중쇄 및/또는 경쇄 중 하나 이상은 VELOCIMMUNE™ 기술을 사용하여 제조될 수 있다. VELOCIMMUNE™ 기술(또는 임의의 다른 인간 항체 생성 기술)을 사용하여, 특정 항원(예를 들어, CD28 또는 CD22)에 대한 고친화성 키메라 항체가 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖고 초기에 단리된다. 항체는 친화성, 선택성, 에피토프 등을 포함한 바람직한 특성에 대해 특성화되고 선택된다. 마우스 불변 영역은 원하는 인간 불변 영역으로 대체되어 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자에 통합될 수 있는 완전한 인간 중쇄 및/또는 경쇄를 생성한다.

[0130] 유전자 조작된 동물을 사용하여 인간 이중 특이적 항원 결합 분자를 만들 수 있다. 예를 들어, 내인성 마우스 면역 글로불린 경쇄 가변 서열을 재배열하고 발현할 수 없는 유전적으로 변형된 마우스를 사용할 수 있으며, 여기서 마우스는 내인성 마우스 카파 유전자좌에서 마우스 카파 불변 유전자에 작동 가능하게 연결된 인간 면역 글로불린 서열에 의해 코딩된 하나 또는 두 개의 인간 경쇄 가변 도메인만을 발현한다. 이러한 유전적으로 변형된 마우스를 사용하여 2개의 상이한 인간 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트 중 하나로부터 유래된 가변 도메인을 포함하는 동일한 경쇄와 회합하는 2개의 상이한 중쇄를 포함하는 완전한 인간 이중 특이적 항원 결합 분자를 생산할 수 있다. (예를 들어, 이중 특이적 항원 결합 분자를 생산하기 위한 이러한 조작된 마우스 및 이의 용도에 대한 상세한 논의에 대해서는 전체 내용이 본원에 참고로 포함되는 US 2011/0195454 참조).

[0131] **생물학적 동등물**

[0132] 본 발명은 기재된 항체와는 다르지만 CD28 및/또는 CD22에 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 항원 결합 분자를 포함한다. 이러한 변이체 분자는 모 서열과 비교할 때 아미노산의 하나 이상의 추가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기재된 항원 결합 분자와 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 본 발명의 항원 결합 분자를 코딩하는 DNA 서열은 개시된 서열과 비교할 때 뉴클레오타이드의 하나 이상의 추가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 본 발명의 기재된 항원 결합 분자와 본질적으로 생물학적으로 동등한 항원 결합 분자를 코딩하는 서열을 포함한다. 이러한 변이 아미노산 및 DNA 서열의 예는 위에서 논의되었다.

[0133] 본 발명은 본원에 제시된 임의의 예시적인 항원 결합 분자와 생물학적으로 동등한 항원 결합 분자를 포함한다. 2개의 항원 결합 단백질 또는 항체는 예를 들어, 유사한 실험 조건에서 단일 또는 다중 투여량으로 동일한 물용량으로 투여했을 때 흡수 속도와 정도가 유의미한 차이를 나타내지 않는 약제학적 등가물 또는 약제학적 대안인 경우 생물학적 동등성으로 간주된다. 일부 항체는 흡수 정도는 동일하나 흡수 속도가 동일하지 않음에 생물학적 동등성으로 간주될 수 있는 경우, 등가물 또는 약제학적 대안으로 간주되는데, 이는 그 흡수 속도의 차이가 의도적이며 표지에 반영되고, 예를 들어, 만성적 사용에 대한 효과적인 신체 약물 농도를 달성하는 데 필수적이지 않으며 연구된 특정 의약품에 대해 의학적으로 중요하지 않은 것으로 간주되기 때문이다.

- [0134] 일 실시 양태에서, 2개의 항원 결합 단백질은 안전성, 순도 및 효능에 임상적으로 의미있는 차이가 없는 경우 생물학적으로 동등하다.
- [0135] 일 실시 양태에서, 환자가 기준 제품과 생물학적 제품 사이에서 1회 이상 전환했을 때, 그러한 전환이 없는 지속적인 치료에 비해, 면역원성에서 임상적으로 유의한 변화, 또는 감소된 효과를 포함한 부작용 위험의 증가가 예상되지 않을 수 있다면 2개의 항원 결합 단백질은 생물학적으로 동등하다.
- [0136] 일 실시 양태에서, 두 항원 결합 단백질이 둘 다 병태 또는 사용 조건에 대한 공통 메커니즘 또는 작용 메커니즘으로 작용하는 경우, 그러한 메커니즘이 알려진 범위까지, 생물학적으로 동등하다.
- [0137] 생체 내 및 시험관 내 방법에 의해 생물학적 동등성이 입증될 수 있다. 생물학적 동등성 측정은 예를 들어, (a) 항체 또는 그 대사 산물의 농도가 시간의 함수로서 혈액, 혈장, 혈청 또는 기타 생물학적 유체에서 측정되는 인간 또는 기타 포유 동물의 생체 내 시험; (b) 인간 생체 내 생체 이용률 데이터와 상관 관계가 있고 합리적으로 예측 가능한 시험관 내 시험; (c) 항체(또는 그 표적)의 적절한 급성 약리학적 효과가 시간의 함수로 측정되는 인간 또는 다른 포유 동물의 생체 내 시험; 및 (d) 항체의 안전성, 효능 또는 생체 이용률 또는 생물학적 동등성을 확립하는 잘 통제된 임상 시험을 포함한다.
- [0138] 본원에 제시된 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자의 생물학적 동등 변이체는 예를 들어 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 수행하거나 생물학적 활성에 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실시킴으로써 구축될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적이지 않은 시스테인 잔기는 재생성성 불필요하거나 부정확한 분자 내 이황화 브릿지의 형성을 방지하기 위해 결실시키거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 다른 맥락에서, 생물학적 동등성 항체는 항체의 글리코실화 특성을 변형시키는 아미노산 변화, 예를 들어 글리코실화를 없애거나(eliminate) 제거(remove)하는 돌연변이를 포함하는 본원에 제시된 예시적인 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함할 수 있다.
- [0139] **종 선택성 및 종 교차 반응성**
- [0140] 특정 실시 양태에 따르면, 본 발명은 인간 CD28에는 결합하지만 다른 종의 CD28에는 결합하지 않는 항원 결합 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 인간 CD22에는 결합하지만 다른 종의 CD22에는 결합하지 않는 항원 결합 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 인간 CD28 및 하나 이상의 비인간 종으로부터의 CD28에 결합하는 항원 결합 분자; 및/또는 인간 CD22 및 하나 이상의 비인간 종으로부터의 CD22에 결합하는 항원 결합 분자를 포함한다.
- [0141] 본 발명의 특정 예시적 실시 양태에 따르면, 인간 CD28 및/또는 인간 CD22에 결합하고 경우에 따라 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 게르빌루스 쥐, 돼지, 고양이, 개, 토끼, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 사이노몰로구스, 마모셋, 레소스 원숭이 또는 침팬지 CD28 및 또는 CD22 중 하나 이상에 결합하거나 결합하지 않을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 예시적인 실시 양태에서, 인간 CD28 및 사이노몰로구스 CD28에 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 인간 CD22에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항원 결합 분자가 제공된다.
- [0142] **면역 접합체**
- [0143] 본 발명은 세포 독소, 화학 요법 약물, 면역 억제제 또는 방사성 동위 원소와 같은 치료 모이어티("면역 접합체")에 접합된 항원 결합 분자를 포함한다. 세포 독성제는 세포에 유해한 모든 물질을 포함한다. 면역 접합체를 형성하기 위한 적합한 세포 독성제 및 화학 요법제의 예는 당 업계에 공지되어 있다(예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 WO 05/103081 참조).
- [0144] **치료적 제형 및 투여**
- [0145] 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 개선된 이동(transfer), 전달(delivery), 내성 등을 제공하는 적합한 담체, 부형제 및 기타 제제와 함께 제형화된다. 모든 제약 화학자에게 알려진 처방집인 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA에서 여러 가지 적절한 제형을 찾을 수 있다. 이러한 제형에는 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온 또는 음이온) 함유 소포(예: LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀전, 에멀전 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물이 포함된다. 또한 Powell 등 "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311 참조.

- [0146] 환자에게 투여되는 항원 결합 분자의 투여량은 환자의 연령 및 크기, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 바람직한 용량은 일반적으로 체중 또는 체 표면적에 따라 계산된다. 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자가 성인 환자의 치료 목적으로 사용되는 경우, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 일반적으로 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 더 바람직하게는 약 0.02 내지 약 7, 약 0.03 내지 약 5, 또는 약 0.05 내지 약 3 mg/kg 체중의 단일 투여량으로 정맥 내 투여하는 것이 유리할 수 있다. 병태의 중증도에 따라 치료 빈도와 기간을 조정할 수 있다. 이중 특이적 항원 결합 분자를 투여하기 위한 유효 용량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있다; 예를 들어, 환자의 진행 상황을 주기적인 평가를 통해 모니터링할 수 있으며 이에 따라 투여량을 조정할 수 있다. 더욱이, 용량의 중간 스케일링은 당 업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Mordenti 등, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).
- [0147] 리포솜, 마이크로 입자, 마이크로 캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 엔도사이토시스에의 캡슐화와 같은 다양한 전달 시스템이 공지되어 있으며, 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, Wu 등, 1987, *J. BioI. Chem.* 262:4429-4432 참조). 도입 방법은 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강 내, 경막 외 및 경구 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입 또는 볼 루스 주사, 상피 또는 점막 내벽(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신이거나 국소적일 수 있다.
- [0148] 본 발명의 약제학적 조성물은 표준 바늘 및 주사기를 사용하여 피하 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치는 본 발명의 약제학적 조성물 전달에 용이하게 적용된다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약제학적 조성물을 함유하는 교체 가능한 카트리지를 사용한다. 카트리지 내의 모든 약제학적 조성물이 투여되고 카트리지가 비었으면, 빈 카트리지는 쉽게 폐기되고 약제학적 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 교체될 수 있다. 그런 다음 펜 전달 장치를 다시 사용할 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에는 교체 가능한 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 저장소에 보유된 약제학적 조성물로 미리 채워진다. 저장소에 약제학적 조성물이 비워지면 전체 장치가 폐기된다.
- [0149] 다수의 재사용 가능한 펜 및 자동 주사기 전달 장치는 본 발명의 약제학적 조성물의 피하 전달에 적용된다. 예로는 AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ 펜(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, 스위스), HUMALOG MIX 75/25™ 펜, HUMALOG™ 펜, HUMALIN 70/30™ 펜(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II 및 III(Novo Nordisk, Copenhagen, 덴마크), NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, 덴마크), BD™ 펜(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ 및 OPTICLIK™(Sanofi-Aventis, Frankfurt, 독일)이 포함되나 이에 국한되지 않으며, 일부만 나열했다. 본 발명의 약제학적 조성물의 피하 전달에 적용되는 일회용 펜 전달 장치의 예에는 SOLOSTAR™ 펜(Sanofi-Aventis), FLEXPEN™(Novo Nordisk) 및 KWIPE™(Eli Lilly), SURECLICK™ 자동 주사기(Angen, Thousand Oaks, CA), PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, 독일), EPIPEN(Dey, LP) 및 HUMIRA™ 펜(Abbott Labs, Abbott Park IL)이 포함되나 이에 국한되지는 않으며, 일부만 나열했다.
- [0150] 특정 상황에서, 약제학적 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 일 실시 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다(Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 참조). 다른 실시 양태에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다; *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise(eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida 참조. 또 다른 실시 양태에서, 제어 방출 시스템은 조성물의 표적 근처에 배치될 수 있으며, 따라서 전신 투여량의 일부만을 필요로 한다(예를 들어, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 참조). 다른 제어 방출 시스템은 Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533의 검토에서 논의된다.
- [0151] 주사 가능한 제제는 정맥 내, 피하, 피내 및 근육 내 주사, 점적 주입 등을 위한 투여 형태를 포함할 수 있다. 이러한 주사 가능한 제제는 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사 가능한 제제는 예를 들어, 주사에 통상적으로 사용되는 멸균 수성 매질 또는 유성 매질에 상기 기재된 항체 또는 그의 염을 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 제조될 수 있다. 주사용 수성 매질로는, 예를 들어 생리 식염수, 포도당 및 기타 보조제를 포함하는 등장액 등이 있으며, 알코올(예: 에탄올), 폴리알코올(예: 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비

이온성 계면 활성제 [예: 폴리소르베이트 80, HCO-50(수소화 피마자 유의 폴리옥시에틸렌(50 몰) 부가물)] 등과 같은 적절한 가용화제와 조합하여 사용할 수 있다. 유성 매질로는 참기름, 대두유 등이 사용되며, 이는 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 조합하여 사용될 수 있다. 이렇게 제조된 주사제는 바람직하게는 적절한 앰플에 충전된다.

[0152] 유리하게는, 상기 기재된 경구 또는 비경구 사용을 위한 약제학적 조성물은 활성 성분의 용량에 맞는 단위 용량의 투여 형태로 제조된다. 단위 용량의 이러한 투여 형태는 예를 들어, 정제, 알약, 캡슐, 주사(앰플), 좌약 등을 포함한다. 상기 함유된 항체의 양은 일반적으로 단위 용량에서 투여 형태 당 약 5 내지 약 500 mg이고; 특히 주사 형태에서, 상기 항체는 약 5 내지 약 100 mg 및 다른 투여 형태의 경우 약 10 내지 약 250 mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

[0153] 항원 결합 분자의 치료적 용도

[0154] 본 발명은 항-CD28 항체, 또는 CD28 및 표적 항원(예를 들어, CD22)에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하는 치료 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 치료 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 임의의 항체 또는 이중 특이적 항원 결합 분자, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 표현 "이를 필요로 하는 대상체"는 암의 하나 이상의 증상 또는 징후를 나타내는 인간 또는 비인간 동물(예를 들어, 종양을 발현하거나 하기 본원에 언급된 암 중 임의의 것을 앓고 있는 대상체), 또는 그렇지 않으면 CD22 활성의 억제 또는 감소 또는 CD22+ 세포의 고갈로부터 이익을 얻을 수 있는 이를 의미한다.

[0155] 본 발명의 항체 및 이중 특이적 항원 결합 분자(및 이를 포함하는 치료 조성물)는 특히 면역 반응의 자극, 활성화 및/또는 표적화가 유익할 임의의 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다. 특히, 본 발명의 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자는 CD22 발현 또는 활성 또는 CD22+ 세포의 증식과 관련되거나 이에 의해 매개되는 임의의 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 개선에 사용될 수 있다. 본 발명의 치료 방법이 달성되는 작용 메커니즘은 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포의 존재하에 CD22를 발현하는 세포의 사멸을 포함한다. 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자를 사용하여 억제 또는 사멸될 수 있는 CD22를 발현하는 세포는 예를 들어 암성 B 세포를 포함한다.

[0156] 본 발명의 항원 결합 분자는 예를 들어 혈액, 골수, 림프절(예: 흉선, 비장), 결장, 간, 폐, 유방, 신장 암, 중추 신경계 및 방광암에서 발생하는 원발성 및/또는 전이성 종양의 치료에 사용될 수 있다. 특정 예시적 실시양태에 따르면, 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자는 B 세포 증식성 장애를 치료하는데 사용된다.

[0157] 본 발명은 또한 대상체에서 잔류 암을 치료하는 방법을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "잔류 암"은 항암 요법으로 치료한 후 대상체에서 하나 이상의 암 세포의 존재 또는 지속성을 의미한다.

[0158] 특정 측면에 따르면, 본 발명은 대상체가 다른 유형의 항암 요법에 반응하지 않는 것으로 나타난 후 본원의 다른 곳에서 기재된 하나 이상의 이중 특이적 항원 결합 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CD22 발현과 관련된 질환 또는 장애(예를 들어, B 세포 증식성 장애)를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 대상체가 암, 예컨대, B 세포 증식성 장애를 앓고 있는 환자에 대한 표준 치료를 받은 후, 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 환자에게 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주 또는 4주, 2개월, 4개월, 6개월, 8개월, 1년 또는 그 이상 투여하는 단계를 포함하는 B 세포 증식성 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 다른 측면에서, IgG4 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중 특이적 항원 결합 분자(항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자)는 처음에 하나 이상의 시점에 대상체에게 투여하고(예를 들어, 전립선 암 세포의 강력한 초기 고갈을 제공하기 위해), 이어서 IgG1 Fc 도메인과 같은 상이한 IgG 도메인을 포함하는 동등한 이중 특이적 항원 결합 분자를 후속 시점에 투여한다. 본 발명의 항-CD28/항-CD22 항체는 항-CD20/항-CD3 이중 특이적 항체와 같은 다른 이중 특이적 항원 결합 분자와 함께 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 본 발명의 이중 특이적 항체는 체크 포인트 억제제, 예를 들어 PD-1 및 CTLA-4를 표적으로 하는 것들 및 다른 표적과 함께 사용될 것이라고 생각된다. 동일한 종양 항원(예를 들어, CD22)을 표적으로 하지만, 이중 특이성 중 하나는 T 세포상의 CD3를 표적으로 하고 이중 특이성 중 다른 하나는 CD28과 같은 공동 자극자 분자를 표적으로 하는 두 개의 이중 특이적 항체를 조합하는 것이 유리할 수 있다. 이 조합은 종양 세포 사멸을 향상시키기 위해 단독으로 사용될 수 있거나 체크 포인트 억제제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0159] 병용 요법 및 제형

[0160] 본 발명은 하나 이상의 추가의 치료학적 활성 성분과 조합하여 본원에 기재된 임의의 예시적인 항체 및 이중 특

이적 항원 결합 분자를 포함하는 조성물 및 치료 제형, 및 이러한 조합을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 포함한다.

[0161] 본 발명의 항원 결합 분자와 조합되거나 조합되어 투여될 수 있는 예시적인 추가 치료제는 예를 들어 화학 요법, 방사선 요법, PD-1(예를 들어, 펌브롤리주맵, 니볼루맵 또는 세미플리맵과 같은 항-PD-1 항체, US9,987,500, 서열 번호 162/170의 HCVR/LCVR 참조), CTLA-4, LAG3, TIM3 및 기타를 표적으로 하는 체크 포인트 억제제, GITR, OX40, 4-1BB 및 기타와 같은 분자를 표적으로 하는 공동 자극 작용제 2가 항체, CD3x 이중 특이적 항체(예를 들어 US9,657,102(REGN1979), WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 및 WO2018/058001A1 참조), CD22 X CD3, CD22 X CD28를 표적으로 하거나, CD20 X CD3를 표적으로 하는 기타 항체, 및 기타 공동 자극 CD28x 이중 특이적 항체를 포함한다.

[0162] 본 발명의 항체와 조합하여 유익하게 투여될 수 있는 다른 제제는 예를 들어 타목시펜, 아로마타제 억제제, 및 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18과 같은 사이토카인, 또는 이들 각각의 수용체에 결합하는 소분자 사이토카인 억제제 및 항체를 포함하는 사이토카인 억제제를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물(예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 항-CD28/항-CD22 이중 특이적 항원 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물)은 또한 "ICE": 이포스포미드(예: Ifex®), 카보플라틴(예: Paraplatin®), 에토포사이드(예: Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": 덱사메타손(예: Decadron®), 시타라빈(예: Cytosar-U®, 시토신 아라비노사이드, ara-C), 시스플라틴(예: Platinol®-AQ); 및 "ESHAP": 에토포사이드(예: Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), 메틸프레드니솔론(예: Medrol®), 고용량 시타라빈, 시스플라틴(예: Platinol®-AQ)로부터 선택된 하나 이상의 치료학적 조합을 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0163] 본 발명은 또한 본원에 언급된 임의의 항원 결합 분자, 및 VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, 우로플라킨, 또는 전술한 사이토카인 중 임의의 것 중 하나 이상의 억제제를 포함하는 치료 조합을 포함하고, 여기서 억제제는 압타머, 안티센스 분자, 리보자임, siRNA, 펩티마디, 나노마디 또는 항체 단편(예: Fab 단편; F(ab')₂ 단편; Fd 단편; Fv 단편; scFv; dAb 단편; 또는 기타 조작된 분자, 예컨대 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디 및 최소 인식 단위)이다. 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 항 바이러스제, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드 및/또는 NSAID와 조합하여 투여 및/또는 공동 제형화될 수 있다. 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 방사선 치료 및/또는 통상적인 화학 요법, 또는 체크 포인트 억제제 또는 다른 이중 특이적 항체를 포함하는 생물학적 치료를 포함하는 치료 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0164] 본 발명은 하나 이상의 화학 요법제와 조합하여 본원에 기재된 임의의 항원 결합 분자를 포함하는 조성물 및 치료 제형을 포함한다. 화학 요법제의 예로는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이클로스포스파미드(CytosanTM); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피오설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸렌올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펌진, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로수레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리체아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항 대사 산물, 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항 부신제, 예컨대 아미노글루테타미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 배당체; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산 갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카

바진; PSKTM; 라족산; 시조피란; 스피로저마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁산, 예: 파클리탁셀(TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(TaxotereTM; Aventis Antony, 프랑스); 클로람부실; 젬시타빈; 6-티오구아닌; 머 캅토피린; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메 틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한 이 정의에는 타목시펜, 알록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드 록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)을 포함하는 항 에스트로 겐; 및 플루타마이드, 닐루타마이드, 비칼루타마이드, 류프롤리드 및 고세렐린과 같은 항 안드로겐과 같이, 종 양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항 호르몬제; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0165] 추가의 치료학적 활성 성분(들)은 본 발명의 항원 결합 분자의 투여 직전, 동시 또는 투여 직후에 투여될 수 있다; (본 개시 내용의 목적을 위해, 이러한 투여 요법은 추가의 치료학적 활성 성분과 "조합한" 항원 결합 분자의 투여로 간주된다).

[0166] 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자가 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 추가의 치료 활성 성분(들) 중 하나 이상과 공동-제형화된 약제학적 조성물을 포함한다.

[0167] 투여 요법

[0168] 본 발명의 특정 실시 양태에 따르면, 항원 결합 분자(예를 들어, 항-CD28 항체, 또는 CD22 및 CD28에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자)의 다중 투여량이 정의된 시간 코스에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 본 발명의 항원 결합 분자의 다중 투여량을 대상체에게 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 "순차 투여"는 항원 결합 분자의 각 투여량이 상이한 시점에, 예를 들어 미리 결정된 간격(예를 들어, 시간, 일, 주 또는 개월)으로 분리된 상이한 날에 대상체에게 투여되는 것을 의미한다. 본 발명은 환자에게 단일 초기 투여량의 항원 결합 분자, 이어서 하나 이상의 2차 투여량의 항원 결합 분자, 및 임의로 이어서 하나 이상의 3차 투여량의 항원 결합 분자를 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0169] 용어 "초기 투여량", "2차 투여량" 및 "3차 투여량"은 본 발명의 항원 결합 분자의 시간적 투여 순서를 지칭한다. 따라서, "초기 투여량"은 치료 요법의 초기에 투여되는 투여량("기준 투여량"이라고도 함)이고; "2차 투여량"은 초기 투여량 후에 투여되는 투여량이고; 그리고 "3차 투여량"은 2차 투여량 후에 투여되는 투여량이다. 초기, 2차 및 3차 투여량은 모두 동일한 양의 항원 결합 분자를 포함할 수 있지만, 일반적으로 투여 빈도 측면에서 서로 다를 수 있다. 그러나, 특정 실시 양태에서, 초기, 2차 및/또는 3차 투여량에 포함된 항원 결합 분자의 양은 치료 과정 동안 서로 다르다(예를 들어, 적절하게 상향 또는 하향로 조정됨). 특정 실시 양태에서, 2회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5회) 투여량이 "부하 투여량"으로 치료 요법의 초기에 투여되고 이어서 후속 투여량(예: "유지 투여량")이 덜 빈번하게 투여된다.

[0170] 본 발명의 하나의 예시적인 실시 양태에서, 각각의 2차 및/또는 3차 투여량은 직전 투여량 투여 후 1 내지 26 (예를 들어, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, 또는 그 이상) 주 후에 투여된다. 본원에 사용된 "직전 투여량"이라는 문구는 다중 투여 순서에서 중간 투여량 없이 바로 다음 투여량을 투여하기 전에 환자에게 투여되는 항원 결합 분자의 투여량을 의미한다.

[0171] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 항원 결합 분자(예를 들어, 항-CD28 항체, 또는 CD22 및 CD28에 특이적으로 결합하는 이중 특이적인 항원 결합 분자)의 임의의 회수의 2차 및/또는 3차 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시 양태에서, 단일 2차 투여량만이 환자에게 투여된다. 다른 실시 양태에서, 2회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 이상)의 2차 투여량이 환자에게 투여된다. 마찬가지로, 특정 실시 양태에서, 단일 3차 투여량만이 환자에게 투여된다. 다른 실시 양태에서, 2회 이상(예를 들어, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상)의 3차 투여량이 환자에게 투여된다.

[0172] 다중 2차 투여량이 관여하는 실시 양태에서, 각각의 2차 투여량은 다른 2차 투여량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 2차 투여량은 직전 투여량 투여 후 1 내지 2주 후에 환자에게 투여될 수 있다. 유사하게, 다중 3차 투여량을 포함하는 실시 양태에서, 각각의 3차 투여량은 다른 3차 투여량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 3차 투여량은 직전 투여량 투여 후 2 내지 4주 후에 환자에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 2차 및/또는 3차 투여량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 요법의 과정에 따라 달라질 수 있다. 투여 빈도는 임상 검사 후 개별 환자의 필요에 따라 의사가 치료 과정에서 조정할 수도 있다.

[0173] 일 실시 양태에서, 항원 결합 분자(예를 들어, CD22 및 CD28에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자)는 체중 기반 투여량으로 대상체에게 투여된다. "체중 기반 투여량"(예를 들어, mg/kg의 투여량)은 대상체의 체중에 따라 변하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이적 항원 결합 분자의 투여량이다.

[0174] 다른 실시 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이적 항원 결합 분자는 고정 투여량으로 대상체에게 투여된다. "고정 투여량"(예: mg 단위 투여량)은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이적 항원 결합 분자의 1회 투여량이 체중과 같은 특정 대상체 관련 인자에 관계없이 모든 대상체에 사용됨을 의미한다. 한 특정 실시 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이적 항원 결합 분자의 고정 투여량은 미리 결정된 체중 또는 연령을 기준으로 한다.

[0175] 일반적으로, 본 발명의 항원 결합 분자의 적절한 투여량은 수용자의 체중 킬로그램 당 약 0.001 내지 약 200.0 밀리그램, 일반적으로 체중 킬로그램 당 약 1 내지 50 mg 범위일 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중 특이적 항원 결합 분자는 단일 투여량 당 약 0.1 mg/kg, 약 0.2 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 50 mg/kg으로 투여될 수 있다. 언급된 값의 중간 값 및 범위 또한 본 발명의 일부로 의도된다.

[0176] 일부 실시 양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 약 25 mg 내지 약 2500 mg의 고정 투여량으로 투여된다. 일부 실시 양태에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 약 25 mg, 약 30 mg, 약 50 mg, 약 75 mg, 약 100 mg, 약 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 200 mg, 약 225 mg, 약 250 mg, 약 275 mg, 약 300 mg, 약 325 mg, 약 350 mg, 약 375 mg, 약 400 mg, 약 425 mg, 약 450 mg, 약 475 mg, 약 500 mg, 약 525 mg, 약 550 mg, 약 575 mg, 약 600 mg, 약 625 mg, 약 650 mg, 약 675 mg, 약 700 mg, 약 725 mg, 약 750 mg, 약 775 mg, 약 800 mg, 약 825 mg, 약 850 mg, 약 875 mg, 약 900 mg, 약 925 mg, 약 950 mg, 약 975 mg, 약 1000 mg, 약 1500 mg, 약 2000 mg 또는 약 2500 mg의 고정 용량으로 투여된다. 언급된 값의 중간 값 및 범위 또한 본 발명의 일부로 의도된다.

[0177] 항체의 진단적 용도

[0178] 본 발명의 이중 특이적 항체는 또한 예를 들어 진단 목적을 위해 샘플에서 CD28 또는 CD22, 또는 CD28-발현 또는 CD22-발현 세포를 검출 및/또는 측정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-항-CD28 x 항-CD22 항체 또는 이의 단편은 CD28 또는 CD22의 비정상적인 발현(예: 과다 발현, 과소 발현, 발현 부족 등)을 특징으로 하는 병태 또는 질환을 진단하는 데 사용될 수 있다. CD28 또는 CD22에 대한 예시적인 진단 검정은 예를 들어 환자로 부터 얻은 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시키는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지된다. 대안적으로, 표지되지 않은 항체는 그 자체로 검출 가능하게 표지된 2차 항체와 조합하여 진단 응용에 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S 또는 ^{125}I 와 같은 방사성 동위원소; 플루오레세인 이소티오시아네이트 또는 로다민과 같은 형광 또는 화학 발광 모이어티; 또는 알칼리성 포스파타제, 베타갈락토시다제, 호스라디시 퍼옥시다제, 또는 루시페라제와 같은 효소일 수 있다. 샘플에서 CD28 또는 CD22를 검출하거나 측정하는 데 사용할 수 있는 특정 예시적인 검정에는 효소 결합 면역 흡착 검정(ELISA), 방사 면역 검정(RIA) 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)가 포함된다. 본 발명에 따른 CD28 또는 CD22 진단 검정에 사용될 수 있는 샘플은 정상 또는 병리학적인 조건 하에서 검출 가능한 양의 CD28 또는 CD22 단백질을 포함하는 환자로부터 얻을 수 있는 임의의 조직 또는 유체 샘플을 포함한다. 일반적으로, 건강한 환자(예를 들어, 비정상적인 CD28 또는 CD22 수준 또는 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 앓지 않는 환자)로부터 얻은 특정 샘플에서 CD28 또는 CD22의 수준을 측정하여 CD28 또는 CD22의 초기 기준 또는 표준 수준을 설정한다. CD28 또는 CD22의 이러한 초기 기준 수준을 CD28 또는 CD22 관련 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되는 개인으로부터 얻은 샘플에서 측정된 CD28 또는 CD22 수준과 비교할 수 있다.

[0179] 실시예

- [0180] 다음 실시예는 당업자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되며, 발명가들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하려는 의도는 아니다. 사용된 숫자(예: 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만 일부 실험 오차 및 편차를 고려해야 한다. 달리 명시하지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨이고, 압력은 대기압 또는 그 부근이다.
- [0181] **실시예 1. 항-CD22xCD28 항체의 구축**
- [0182] **항-CD28 항체의 생성**
- [0183] 항-CD28 항체는 VELOCIMMUNE® 마우스(즉, 인간 면역 글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 조작된 마우스)를 마우스 IgG2a의 Fc 부분에 융합된 인간 CD28 단백질로, 또는 CD28을 발현하는 세포로, 또는 CD28을 코딩하는 DNA로 면역화함으로써 획득되었다. 항체 면역 반응은 CD28 특이적 면역 분석에 의해 모니터링되었다. 원하는 면역 반응이 달성되면 비장 세포를 수확하고 마우스 골수종 세포와 융합하여 생존력을 보존하고 하이브리도마 세포주를 형성했다. 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선별하여 CD28 특이적 항체를 생산하는 세포주를 확인했다. 이 기술을 사용하여 여러 항-CD28 키메라 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 보유하는 항체)를 얻었다. 또한, US 2007/0280945A1에 기술된 바와 같이, 골수종 세포에 대한 융합없이 항원 양성 B 세포로부터 여러 완전 인간 항-CD28 항체를 직접 단리했다.
- [0184] 본 실시예의 방법에 따라 생성된 예시적인 항-CD28 항체의 특정 생물학적 특성은 아래 제시된 실시예에서 상세히 설명된다.
- [0185] **항-CD22 항체의 생성**
- [0186] 항-CD22 항체는 유전적으로 변형된 마우스(VELOCIMMUNE® 마우스, 상기 참조)를 인간 CD22 항원(예를 들어, hCD22 ecto(D20-R687).hFc, R&D Systems, 카탈로그# 1968- SL-050; 수탁# CAA42006(또한 도 3 참조)으로 면역화함으로써, 또는 인간 면역 글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 조작된 마우스를 인간 CD22 항원으로 면역화함으로써 획득되었다.
- [0187] 면역화 후, 비장 세포를 각 마우스로부터 수확하고, (1) 마우스 골수종 세포와 융합하여 생존력을 보존하고 하이브리도마 세포를 형성하고 CD22 특이성에 대해 스크리닝하거나, (2) 반응성 항체(항원 양성 B 세포)에 결합하고 식별하는 분류 시약으로 인간 CD22 단편을 사용하여 B 세포 분류(US 2007/0280945A1에 기재됨)하였다.
- [0188] 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 CD22에 대한 키메라 항체가 처음에 단리되었다. 항체는 친화성, 선택성 등을 포함한 바람직한 특성을 위해 특성화되고 선택되었다. 필요한 경우, 마우스 불변 영역을 원하는 인간 불변 영역, 예를 들어 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4 불변 영역으로 대체하여 완전한 인간 항-CD22 항체를 생성했다. 선택된 불변 영역은 특정 용도에 따라 다를 수 있지만, 고친화성 항원 결합 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 존재한다.
- [0189] **CD28 및 CD22에 결합하는 이중 특이적 항체의 생성**
- [0190] 항-CD22 특이적 결합 도메인 및 항-CD28 특이적 결합 도메인을 포함하는 이중 특이적 항체는 표준 방법론을 사용하여 구축되었으며, 여기서 항-CD22 항원 결합 도메인 및 항-CD28 항원 결합 도메인은 각각 공통 LCVR과 쌍을 이룬 상이한 별개의 HCVR를 포함한다. 일부 경우에 이중 특이적 항체는 항-CD28 항체의 중쇄, 항-CD22 항체의 중쇄 및 공통 경쇄를 사용하여 구축되었다(표 1 참조).
- [0191] 본 실시예에 따라 생성된 이중 특이적 항체는 2개의 개별 항원 결합 도메인(즉, 결합 아암)을 포함한다. 제1 항원 결합 도메인은 항-CD28 항체("CD28-VH")로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하고, 제2 항원 결합 도메인은 항-CD22 항체("CD22-VH")로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함한다. 항-CD22와 항-CD28은 모두 공통 경쇄를 공유한다. CD28-VH/CD22-VH 쌍은 T 세포상의 CD28을, 종양 세포상의 CD22를 특이적으로 인식하는 항원 결합 도메인을 생성한다.
- [0192] **실시예 2. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 및 핵산 서열**
- [0193] 표 1은 본 발명의 선택된 항-CD22 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 아미노산 서열 식별자를 제시한다. 상응하는 핵산 서열 식별자는 표 2에 제시되어 있다.

표 1: CD22 항체의 아미노산 서열 식별자

항체 지정	서열 번호							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb33037P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb33041P2	18	20	22	24	10	12	14	16

[0194]

표 2: CD22 항체의 핵산 서열 식별자

항체 지정	서열 번호							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb33037P2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb33041P2	17	19	21	23	9	11	13	15

[0195]

[0196] 표 3은 본 발명의 선택된 항-CD28 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR 및 LCVR), CDR의 아미노산 서열 식별자를 제시한다. 상응하는 핵산 서열 식별자는 표 4에 제시되어 있다.

표 3: CD28 항체의 아미노산 서열 식별자

항체 지정	서열 번호							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	26	28	30	32	10	12	14	16

[0197]

표 4: CD28 항체의 핵산 서열 식별자

항체 지정	서열 번호							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226P2	25	27	29	31	9	11	13	15

[0198]

[0199] 구축된 다양한 항-CD22x항-CD28 이중 특이적 항체의 구성 부분의 요약이 표 5에 제시되어 있다. 표 6 및 7은 이중 특이적 항체의 HCVR, LCVR, CDR 및 중쇄 및 경쇄 서열 식별자를 나열한다.

표 5: 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 구성 부분 요약

이중 특이적 항체 식별자	항-CD22	항-CD28	공통 경쇄 가변 영역
	항체 결합 도메인	항체 결합 도메인	
	중쇄 가변 영역	중쇄 가변 영역	
REGN5837	mAb33037P2	mAb14226P2	ULC3-20
REGN5838	mAb33041P2	mAb14226P2	ULC3-20

[0200]

[0201] 표 6은 본원에 예시된 이중 특이적 항-CD22 x 항-CD28 항체에 대한 아미노산 서열 식별자를 보여준다. 상응하는 핵산 서열 식별자는 표 7에 제시되어 있다.

표 6: 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 아미노산 서열

이중 특이적 항체 식별자	항-CD28				항-CD22				공통 경쇄 가변 영역			
	제1 항체 결합 도메인 (D1)				제2 항체 결합 도메인 (D2)							
	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D1- HCDR3	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
REGN5837	26	28	30	32	2	4	6	8	10	12	14	16
REGN5838	26	28	30	32	18	20	22	24	10	12	14	16

표 7: 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 핵산 서열

이중 특이적 항체 식별자	항-CD28				항-CD22				공통 경쇄 가변 영역			
	제1 항체 결합 도메인 (D1)				제2 항체 결합 도메인 (D2)							
	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D1- HCDR3	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
REGN5837	25	27	29	31	1	3	5	7	9	11	13	15
REGN5838	25	27	29	31	17	19	21	23	9	11	13	15

실시예 3: 수소 중수소 교환에 의해 CD22에 결합하는 REGN5837의 에피토프 매핑

질량 분석법(HDX-MS)을 사용한 H/D 교환 에피토프 매핑을 수행하여 H4sH33037P2(표 1, 서열 번호 2/10의 HCVR/LCVR 쌍 참조)(항-hCD22 단클론 항체; REGN5837의 모 항-hCD22 항체)와 상호 작용하는 CD22(재조합 인간 CD22, 서열 번호 50)의 아미노산 잔기를 결정했다. H/D 교환 방법에 대한 일반적인 설명은 예를 들어 Ehring(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; 및 Engen and Smith(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A 에 제시되어 있다.

HDX-MS 실험은 중수소 표지 및 켄칭을 위한 Leaptac HDX PAL 시스템, 샘플 분해 및 로딩을 위한 Waters Acquity M-Class(보조 용매 관리자), 분석 구매를 위한 Waters Acquity M-Class(μ Binary 용매 관리자), 및 펩티드 질량 측정을 위한 Thermo Q Exactive HF 질량 분석기로 구성된 통합 HDX/MS 플랫폼에서 수행되었다.

표지 용액은 pD 7.0(10 mM 포스페이트 완충액, 140 mM NaCl 및 3 mM KCl, 25°C에서 pH 7.4에 해당)에서 D₂O에서 PBS 완충액으로 제조되었다. 중수소 표지를 위해, 11 μ L의 CD22.mmH(REGN5140(서열 번호 50), 56.7 μ M) 또

는 1:0.6 몰비로 H4sH33037P2(위 참조)와 미리 혼합된 CD22.mmH(Ag-Ab 복합체)를 20℃에서 44 μ L D₂O 표지 용액과 함께 다양한 시점 동안 중복으로 배양했다(예: 중수소화되지 않은 대조군 = 0초, 5분 및 10분 동안 중수소 표지됨). 중수소화 반응은 20℃에서 5분 동안 배양한 각 샘플에 55 μ L의 미리 냉각된 켄칭 완충액(0.5 M TCEP-HCl, 8 M 요소 및 1% 포름산)을 첨가하여 켄칭했다. 켄칭한 샘플은 온라인 펩신/프로테아제 XIII 분해를 위해 Waters HDX Manager에 주입되었다. 분해된 펩티드는 10% 내지 32% B(이동상 A: 물 중 0.5% 포름산, 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산)에서 13분 구배로 C8 컬럼(1.0 mm x 50 mm, NovaBioassays)으로 분리하였다. 용출된 펩티드는 LC-MS/MS 또는 LC-MS 모드에서 Q Exactive HF 질량 분석법으로 분석하였다.

[0207]

중수소화되지 않은 CD22 샘플의 LC-MS/MS 데이터는 Byonic 검색 엔진(Protein Metrics)을 사용하여 CD22 및 그의 무작위 서열을 포함하는 데이터베이스에 대해 검색되었다. 검색 매개 변수(ELN에서)는 공통 변수 변형으로 비특이적 효소 분해 및 인간 글리코실화를 사용하는 기본값으로 설정되었다. 확인된 펩티드 목록을 HDX Workbench 소프트웨어(버전 3.3)로 가져와 모든 중수소화된 샘플에서 LC-MS로 검출된 각 펩티드의 중수소 흡수를 계산했다. 주어진 펩티드에 대해 각 시점의 중심 질량(강도 가중 평균 질량)을 사용하여 중수소 흡수(D) 및 중수소 흡수율(%D)을 계산했다(아래 참조).

$$\begin{aligned} \text{중수소 흡수 (D-흡수)} &= \frac{\text{평균 질량 (중수소화됨)} - \text{평균 질량 (중수소화되지 않음)}}{\text{중수소화되지 않음}} \\ \text{중수소 흡수율 (\%D)} &= \frac{\text{각 시점에서 펩티드에 대한 D-흡수} \times 100\%}{\text{펩티드의 최대 D-흡수 (ELN에서 정의됨)}} \end{aligned}$$

[0208]

[0209]

hCD22.mmH(서열 번호 50)로부터 총 427개의 펩티드가 hCD22.mmH 단독 및 H4sH33037P2(서열 번호 2/10의 HCVR/LCVR 쌍) 샘플과의 복합체의 hCD22.mmH 둘 다로부터 확인되었으며, hCD22의 92.0% 서열 커버리지를 나타냈다. 차등 D-흡수율 값이 5%를 상회하는 모든 펩티드는 상당히 보호된 것으로 정의되었다. 표 8). hCD22.mmH의 경우, 아미노산 481 내지 505(NVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSGNS; 서열 번호 57) 및 523 내지 537(FWEKNGRLLGKESQLNF; 서열 번호 58)에 해당하는 펩티드는 H4sH33037P2에 의해 상당히 보호되었다.

표 8: H4sH33037P2에 결합시 상당한 보호를 갖는 선별된 CD22.mmH 펩티드

		5 분			10 분			
		REGN5140	REGN5140		REGN5140	REGN5140		
			+			+		
CD22			H4sH33037P2			H4sH33037P2		
잔기	전하 (+)	중심 MH ⁺	중심 MH ⁺	ΔD	중심 MH ⁺	중심 MH ⁺	ΔD	Δ%D
481-492	2	1477.27	1476.94	-0.33	1477.51	1477.01	-0.50	-5.7
481-497	4	2059.98	2059.38	-0.60	2060.24	2059.62	-0.62	-5.9
481-499	4	2277.09	2276.48	-0.61	2277.33	2276.65	-0.68	-5.4
482-490	3	1108.33	1108.02	-0.32	1108.46	1108.20	-0.26	-5.99
484-492	3	1136.43	1136.22	-0.22	1136.56	1136.29	-0.27	-5.08
484-499	4	1935.26	1934.65	-0.61	1935.40	1934.69	-0.70	-6.82
488-505	3	2043.24	2042.65	-0.60	2043.42	2042.69	-0.73	-5.52
489-497	3	1113.62	1113.13	-0.49	1113.71	1113.17	-0.53	-10.63
489-499	3	1330.85	1330.31	-0.54	1330.93	1330.32	-0.61	-8.96
489-505	2	1927.04	1926.45	-0.59	1927.17	1926.46	-0.70	-5.76
489-505	3	1928.14	1927.55	-0.59	1928.26	1927.61	-0.65	-5.56
491-499	2	1074.18	1073.78	-0.41	1074.19	1073.74	-0.45	-8.94
491-499	3	1075.28	1074.83	-0.45	1075.31	1074.80	-0.51	-9.97
491-505	2	1671.53	1671.05	-0.48	1671.59	1671.11	-0.48	-5.02
491-505	3	1672.53	1672.04	-0.48	1672.59	1672.10	-0.49	-5.09
491-505	4	1673.57	1673.08	-0.50	1673.64	1673.14	-0.50	-5.19
493-505	2	1415.81	1415.33	-0.48	1415.87	1415.40	-0.47	-5.91
523-531	2	1167.25	1166.91	-0.34	1167.40	1166.97	-0.43	-6.87
523-531	3	1168.23	1167.88	-0.36	1168.41	1167.93	-0.48	-7.48
523-534	4	1484.62	1484.25	-0.37	1484.68	1484.12	-0.56	-5.80
523-536	3	1699.57	1699.11	-0.46	1699.77	1699.24	-0.53	-5.16
524-534	3	1336.24	1335.83	-0.41	1336.31	1335.93	-0.38	-5.50
526-537	2	1348.48	1348.17	-0.32	1348.76	1348.27	-0.49	-5.03
527-537	2	1220.04	1219.62	-0.42	1220.31	1219.81	-0.50	-6.44
528-534	2	776.80	776.55	-0.26	776.92	776.60	-0.32	-7.19
528-536	2	992.76	992.44	-0.32	992.95	992.57	-0.38	-6.30
528-537	2	1105.90	1105.60	-0.30	1106.06	1105.71	-0.35	-5.11
528-537	3	1106.65	1106.35	-0.30	1106.83	1106.47	-0.37	-5.20

[0210]

[0211]

실시예 4: 수소 중수소 교환에 의해 CD22에 결합하는 H4sH33041P2의 에피토프 매핑

[0212]

질량 분석법(HDX-MS)을 사용한 H/D 교환 에피토프 매핑을 수행하여 H4sH33041P2(서열 번호 18/10의 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 항-hCD22 단클론 항체), REGN5838의 모 항-hCD22)와 상호 작용하는 CD22(재조합 인간 CD22, 서열 번호 50)의 아미노산 잔기를 결정했다. H/D 교환 방법에 대한 일반적인 설명은 예를 들어 Ehring(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; 및 Engen 및 Smith(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A에 제시되어 있다.

[0213]

HDX-MS 실험은 중수소 표지 및 켄칭을 위한 Leaptac HDX PAL 시스템, 샘플 분해 및 로딩을 위한 Waters Acquity M-Class(보조 용매 관리자), 분석 구배를 위한 Waters Acquity M-Class(μBinary 용매 관리자), 및 펩티드 질량 측정을 위한 Thermo Q Exactive HF 질량 분석기로 구성된 통합 HDX/MS 플랫폼에서 수행되었다.

[0214]

표지 용액은 pD 7.0(10 mM 포스페이트 완충액, 140 mM NaCl 및 3 mM KCl, 25°C에서 pH 7.4에 해당)에서 D₂O에서 PBS 완충액으로 제조되었다. 중수소 표지를 위해, 11 μL의 CD22.mmH(REGN5140(서열 번호 50), 56.7 μM) 또는 1:0.6 몰비로 H4sH33041P2와 미리 혼합된 CD22.mmH(Ag-Ab 복합체)를 20°C에서 44 μL D₂O 표지 용액과 함께 다양한 시점 동안 중폭으로 배양했다(예: 중수소화되지 않은 대조군 = 0초, 5분 및 10분 동안 중수소 표지됨). 중수소화 반응은 20°C에서 5분 동안 배양한 각 샘플에 55 μL의 미리 냉각된 켄칭 완충액(0.5 M TCEP-HCl, 8 M 요소 및 1% 포름산)을 첨가하여 켄칭했다. 켄칭한 샘플은 온라인 펩신/프로테아제 XIII 분해를 위해 Waters HDX Manager에 주입되었다. 분해된 펩티드는 10% 내지 32% B(이동상 A: 물 중 0.5% 포름산, 이동상 B: 아세트 니트릴 중 0.1% 포름산)에서 13분 구배로 C8 컬럼(1.0 mm x 50 mm, NovaBioassays)으로 분리하였다. 용출된 펩티드는 LC-MS/MS 또는 LC-MS 모드에서 Q Exactive HF 질량 분석법으로 분석하였다.

[0215] 중수소화되지 않은 CD22 샘플의 LC-MS/MS 데이터는 Byonic 검색 엔진(Protein Metrics)을 사용하여 CD22 및 그의 무작위 서열을 포함하는 데이터베이스에 대해 검색되었다. 검색 매개 변수(ELN에서)는 공통 변수 변형으로 비특이적 효소 분해 및 인간 글리코실화를 사용하는 기본값으로 설정되었다. 확인된 펩티드 목록을 HDX Workbench 소프트웨어(버전 3.3)로 가져와 모든 중수소화된 샘플에서 LC-MS로 검출된 각 펩티드의 중수소 흡수를 계산했다. 주어진 펩티드에 대해 각 시점의 중심 질량(강도 가중 평균 질량)을 사용하여 중수소 흡수(D) 및 중수소 흡수율(%D)을 아래와 같이 계산했다.

$$\begin{aligned} \text{중수소 흡수 (D-흡수)} &= \frac{\text{평균 질량 (중수소화됨)} - \text{평균 질량 (중수소화되지 않음)}}{\text{중수소화되지 않음}} \\ \text{중수소 흡수율 (\%D)} &= \frac{\text{각 시점에서 펩티드에 대한 D-흡수} \times 100\%}{\text{펩티드의 최대 D-흡수 (ELN에서 정의됨)}} \end{aligned}$$

[0216]

[0217] hCD22.mmH(서열 번호 50)로부터의 총 454개의 펩티드가 hCD22.mmH 단독 및 H4sH33041P2 샘플과의 복합체의 hCD22.mmH 둘 다로부터 확인되었으며, hCD22의 90.5% 서열 커버리지를 나타냈다. 차등 D-흡수율 값이 5%를 상회하는 모든 펩티드는 상당히 보호된 것으로 정의되었다. hCD22.mmH의 경우, 아미노산 246 내지 277(CEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNL; 서열 번호 59)에 해당하는 펩티드는 H4sH33041P2에 의해 상당히 보호되었다. 표 9는 H4sH33041P2에 대한 결합시 상당한 보호를 갖는 선별된 펩티드의 결과를 제공한다.

표 9: H4sH33041P2에 결합시 상당한 보호를 갖는 선별된 CD22.mmH 펩티드

		5 분			10 분			
		REGN5140	REGN5140		REGN5140	REGN5140		
			+			+		
CD22			H4sH33041P2			H4sH33041P2		
장기	전하 (+)	중심 MH*	중심 MH*	ΔD	중심 MH*	중심 MH*	ΔD	Δ%D
246-260	2	1695.69	1693.75	-1.94	1695.81	1693.88	-1.94	-20.2
247-255	1	1014.95	1013.86	-1.09	1015.09	1013.90	-1.19	-23.7
248-255	1	885.67	884.67	-1.00	885.72	884.68	-1.03	-25.4
248-257	1	1088.87	1087.06	-1.81	1088.95	1087.08	-1.86	-32.8
248-258	1	1188.86	1186.62	-2.24	1188.80	1186.76	-2.03	-33.4
248-260	1	1462.34	1460.14	-2.20	1462.56	1460.37	-2.19	-27.5
248-260	2	1462.38	1460.87	-1.51	1462.50	1461.05	-1.45	-18.5
248-267	2	2179.41	2177.73	-1.68	2179.48	2177.78	-1.70	-12.4
250-255	1	698.73	698.06	-0.68	698.74	698.07	-0.67	-28.2
256-260	1	595.67	595.38	-0.29	595.77	595.43	-0.34	-13.2
256-277	3	2506.39	2505.08	-1.31	2506.57	2505.28	-1.28	-8.1
258-277	3	2303.55	2302.37	-1.18	2303.70	2302.61	-1.09	-7.9
258-277	4	2304.39	2303.05	-1.34	2304.54	2303.17	-1.37	-9.4
259-274	3	1863.23	1862.24	-1.00	1863.34	1862.39	-0.95	-8.7
259-276	3	2090.99	2089.88	-1.11	2091.03	2090.10	-0.93	-8.0
259-277	2	2202.69	2201.88	-0.82	2202.82	2201.99	-0.83	-6.1
259-277	3	2204.00	2202.93	-1.07	2204.07	2203.10	-0.97	-7.5
260-267	2	923.71	923.41	-0.30	923.83	923.53	-0.30	-6.2
261-267	1	736.43	736.18	-0.25	736.55	736.26	-0.29	-6.7
261-267	2	737.43	737.18	-0.26	737.55	737.28	-0.28	-6.7
261-272	2	1339.48	1338.86	-0.62	1339.58	1338.99	-0.59	-7.5
261-272	3	1340.56	1339.91	-0.65	1340.66	1340.07	-0.59	-7.8
261-273	2	1487.02	1486.00	-1.02	1487.11	1486.15	-0.96	-11.2
261-273	3	1488.10	1487.01	-1.09	1488.13	1487.19	-0.94	-11.5
261-274	2	1588.74	1587.70	-1.04	1588.85	1587.90	-0.94	-10.3
261-276	2	1816.39	1815.41	-0.98	1816.48	1815.57	-0.92	-8.5
261-277	2	1929.27	1929.31	-1.04	1928.23	1928.38	-0.93	-8.2
261-277	3	1930.39	1929.37	-1.01	1930.45	1929.55	-0.89	-7.9
261-277	4	1931.34	1930.30	-1.05	1931.40	1930.46	-0.94	-8.3
262-267	1	622.98	622.71	-0.27	623.08	622.80	-0.27	-8.4
262-274	3	1475.17	1474.20	-0.97	1475.28	1473.08	-2.20	-18.0

[0218]

262-275	4	1590.80	1589.66	-1.13	1590.89	1589.77	-1.12	-11.7
262-276	3	1704.03	1701.62	-2.41	1704.09	1701.66	-2.43	-23.3
262-277	2	1816.39	1815.41	-0.98	1816.48	1815.57	-0.92	-8.5
262-277	3	1817.40	1816.38	-1.02	1817.50	1816.57	-0.93	-8.7
264-273	2	1129.77	1128.49	-1.28	1129.74	1128.78	-0.96	-17.5
264-274	2	1231.69	1231.40	-0.29	1231.77	1231.25	-0.52	-5.6
267-276	2	1212.11	1211.38	-0.73	1212.10	1211.47	-0.63	-10.6
267-277	2	1325.86	1325.12	-0.74	1325.83	1325.22	-0.61	-9.4
268-273	2	769.65	768.82	-0.83	769.64	768.88	-0.76	-24.9
268-274	1	870.35	869.46	-0.89	870.28	869.56	-0.73	-20.2
268-274	2	871.36	870.53	-0.83	871.34	870.61	-0.73	-19.4
268-276	2	1099.07	1098.29	-0.79	1099.07	1098.36	-0.70	-13.3
268-277	1	1211.10	1210.45	-0.66	1211.10	1210.45	-0.65	-10.2
268-277	2	1212.11	1211.38	-0.73	1212.10	1211.47	-0.63	-10.6
268-277	3	1212.84	1212.11	-0.73	1212.81	1212.16	-0.64	-10.7

[0219]

[0220]

[0221]

실시예 5: CD22 xCD28 이중 특이적 항체의 표면 플라즈몬 공명 유도된 결합 친화도 및 운동 상수

hCD22.mmH(서열 번호 50), 및 정제된 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 또는 항-CD22 2가 모 mAb(표 1 참조, mAb33037P2; HCVR/LCVR: 서열 번호 2/10) 및 mAb33041P2; HCVR/LCVR: 서열 번호 18/10)에 결합하는 mfCD22.mmH(서열 번호 51)에 대한 평형 해리 상수(K_D 값)는 Biacore T-200 또는 Biacore 4000 기기를 사용하여 실시간 표면 플라즈몬 공명 바이오 센서를 사용하여 결정되었다. CM5 Biacore 센서 표면은 정제된 항-CD22xCD28 이중 특이적 또는 항-CD22 모 mAb(mAb33037P2 및 mAb33041P2의 경우 표 1 및 2 참조)를 포획하기 위해 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(REGN2567; HCVR/LCVR: 서열 번호 33/34)와의 아민 커플링에 의해 유도체화되었다. 이 Biacore 결합 연구는 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면 활성제 P20(HBS-EP 실행 완충액)으로 구성된 완충액에서 수행되었다. HBS-EP 실행 완충액(90 nM 내지 3.33 또는 0.37nM 범위, 3배 희석) 중에서 제조된 다양한 농도의 hCD22(서열 번호 50) 및 C-말단 myc.myc 헥사히스티딘 태그(서열 번호 60으로 공개된 "헥사히스티딘")를 갖는 mfCD22(서열 번호 51)를 30 μ L/분의 유속으로 mAb 포획된 표면 위에 주입했다. 포획된 단클론 항체에 대한 CD22.mmH(서열 번호 50)의 회합을 5분 동안 모니터링하고 HBS-EP 실행 완충액에서 CD22.mmH의 해리를 10분 동안 모니터링했다. 모든 결합 동역학 실험은 25°C에서 수행되었다. 운동 연관성(k_a) 및 해리(k_d) 속도 상수는 Scrubber 2.0c 곡선 피팅 소프트웨어를 사용하여 실시간 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여 결정되었다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기($t_{1/2}$)는 다음과 같이 운동 속도 상수로부터 계산되었다:

[0222]

$$K_D(M) = k_d/k_a, \quad \text{및} \quad t_{1/2}(\text{분}) = 0.693/k_d/60$$

[0223]

25°C에서 정제된 mAb에 결합하는 인간 및 cyno CD22에 대한 결합 동역학 매개 변수는 하기 표 10 내지 12에 제시되어 있다.

[0224]

hCD28.mmH(서열 번호 54) 정제된 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 또는 항-CD28 2가 모 mAb(mAb14226P2의 경우 표 3 및 4 참조)에 대한 평형 해리 상수(K_D 값)는 Biacore T-200 기기를 사용하는 실시간 표면 플라즈몬 공명 바이오 센서를 사용하여 결정되었다. CM4 Biacore 센서 표면은 정제된 항-CD22xCD28 이중 특이적 또는 항-CD28 모 mAb(위 참조)를 포획하기 위해 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(REGN2567; HCVR/LCVR 서열 번호 33/34)와의 아민 커플링에 의해 유도체화되었다. 이 Biacore 결합 연구는 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면 활성제 P20(HBS-EP 실행 완충액)으로 구성된 완충액에서 수행되었다. HBS-EP 실행 완충액(600 nM 내지 2.47 nM 범위, 3배 희석)에서 제조된 C-말단 myc.myc 헥사히스티딘 태그(서열 번호 60으로 개시된 "헥사히스티딘")를 갖는 상이한 농도의 hCD28을 50 μ L/분의 유속으로 mAb 포획된 표면 위에 주입하였다. 포획된 단클론 항체에 대한 CD28.mmH(서열 번호 54)의 회합을 5분 동안 모니터링하고 HBS-EP 실행 완충액에서 CD28.mmH의 해리를 10분 동안 모니터링하였다. 모든 결합 동역학 실험은 25°C에서 수행되었다. 역학 연관성(k_a) 및 해리(k_d) 속도 상수는 Scrubber 2.0c 곡선 피팅 소프트웨어를 사용하여 실시간 센서그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여 결정되었다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기($t_{1/2}$)는 다음과 같이 운동 속도 상수로부터 계산되었다:

[0225]

$$K_D(M) = k_d/k_a, \quad \text{및} \quad t_{1/2}(\text{분}) = 0.693/k_d/60$$

[0226] 25℃에서 정제된 mAb에 결합하는 인간 CD28에 대한 결합 동역학 매개 변수는 하기 표 13에 제시되어 있다.

표 10: 25℃에서 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 에 대한 인간 CD22.mmH 결합 역학

REGN#/Ab PID #	Lot #	일반명	mAb 포획 (RU)	90nM hCD22.mm H 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (분)
REGN5837	REGN5837-L3	CD22xCD28 mAb	379.1 ± 2.4	100.5	1.70E+05	1.49E-03	8.75E-09	7.8
H4sH33037 P2	H4sH33037P2- L2	CD22 mAb	358.3 ± 2.0	192.6	1.95E+05	1.48E-03	7.60E-09	7.8
REGN5838	REGN5838-L4	CD22xCD28 mAb	475.3 ± 5.3	26.7	2.11E+04	3.02E-04	1.43E-08	38.2
H4sH33041 P2	H4sH33041P2- L2	CD22 mAb	581.7 ± 1.9	61.5	2.05E+04	1.93E-04	9.43E-09	59.8

[0227]

표 11: 25℃에서 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 에 대한 원숭이 CD22.mmH (XP_005588899.1) 결합 역학

REGN#/Ab PID #	Lot #	일반명	mAb 포획 (RU)	90nM REGN5280 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (분)
H4sH33037P2	H4sH33037P2-L2	CD22 mAb	423.8 ± 3.6	112.8	6.55E+04	2.66E-03	4.06E-08	4.3
H4sH33041P2	H4sH33041P2-L2	CD22 mAb	500.9 ± 0.9	13.2	6.83E+03	2.91E-04	4.26E-08	39.8

[0228]

표 12: 25℃에서 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 에 대한 원숭이 CD22.mmH (EHH59463.1) 결합 역학

REGN#/Ab PID #	Lot #	일반명	mAb 포획 (RU)	84nM REGN5281 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (분)
H4sH33037P2	H4sH33037P2-L2	CD22 mAb	426.4 ± 1.6	127.5	8.07E+04	2.87E-03	3.56E-08	4.0
H4sH33041P2	H4sH33041P2-L2	CD22 mAb	499.7 ± 3.5	10.9	6.59E+03	3.90E-04	5.92E-08	29.6

[0229]

표 13: 25℃에서 항-CD22xCD28 이중 특이적 mAb 에 대한 인간 CD28.mmH 결합 역학

REGN#/Ab PID #	Lot #	일반명	mAb 포획 (RU)	600nM hCD28.mmH 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (분)
REGN5837	REGN5837- L3	CD22xCD28 mAb	1060.7 ± 7.0	72.9	1.39E+04	4.73E-03	3.41E-07	2.4
REGN5838	REGN5838- L4	CD22xCD28 mAb	1289.2 ± 10.5	77.0	1.23E+04	4.96E-03	4.04E-07	2.3
REGN5705	REGN5705- L2	CD28 mAb	564.5 ± 5.2	88.4	1.31E+04	4.80E-03	3.65E-07	2.4

[0230]

[0231] 실시예 6. 유세포 분석을 사용하여 표적 세포주(Nalm6), 이펙터 세포주(Jurkat) 및 사이노물구스 원숭이 T 및 B 세포에 대한 항-CD28 및 항-CD22xCD28 이중 특이적 항체의 결합 특이성

[0232] 유세포 분석을 이용하여 Nalm6 세포를 발현하는 인간 CD22 및 Jurkat 세포를 발현하는 인간 CD28, 및 사이노물구스 원숭이 T(CD28+) 및 B(CD22+) 세포에 대한 CD22xCD28 이중 특이적 항체의 결합을 결정했다. 간단히 말해서, 1×10^5 세포/웰을 CD22xCD28 이중 특이적 항체 또는 H4sH15260P(인간 또는 사이노물구스 CD28 또는 CD22에 대한 교차 반응성 없이 인간 항원에 결합하는 이소형 대조군 인간 IgG4 항체)의 연속 희석액과 함께, Jurkat 및 Nalm6 세포의 경우 133 nM 내지 61 pM 범위로 4℃에서 30분 동안 배양했다. 사이노물구스 원숭이 PBMC를 단일 67 nM 농도의 항체와 함께 배양하였다. 배양 후, 세포를 1% 여과된 FBS를 함유하는 차가운 PBS로 2회 세척하고 PE-접합된 항-인간 2차 항체를 세포에 첨가하고 추가 30분 동안 배양하였다. 추가 표현형 항체 각테일(항-CD2, 항-CD20, 항-CD16, 항-CD14)을 사이노물구스 원숭이 PBMC에 있는 웰에 첨가했다. 항체가 없거나 2차만 포함된 웰을 대조군으로 사용했다.

[0233] 2차 항체와 함께 배양한 후, 세포를 세척하고, 1% 여과된 FBS를 함유하는 200 μ L 차가운 PBS에 재현탁하고 BD LSR_Fortessa에서 유세포 분석으로 분석하였다. 사이노물구스 원숭이 T 세포는 CD2+/CD16-로, B 세포는 CD20+로 확인되었다. FACS 결합에 대한 EC₅₀ 값은 Prism 소프트웨어에서 4-매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다.

[0234] 표 14는 유세포 분석에 의해 결정된 CD22를 발현하는 세포주의 표면에 대한 CD22xCD28 이중 특이적 항체의 결합 데이터를 제공한다. 표 14는 또한 유세포 분석에 의해 결정된 인간 CD28을 발현하는 세포주의 표면에 대한 CD22xCD28 이중 특이적 항체의 결합 데이터를 제공한다.

[0235] REGN5837은 1.3E-08M의 Nalm6 세포 EC₅₀ 값으로 결합되었다. REGN5838은 1.8E-08M의 Nalm6 세포 EC₅₀ 값으로

결합되었다. 이소형 대조군 항체는 CD22를 발현하는 세포주에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

[0236] REGN5837은 $2.1E-08M$ 의 Jurkat 세포 EC_{50} 값으로 결합되었다. REGN5838은 $2.3E-08M$ 의 Jurkat 세포 EC_{50} 값으로 결합되었다. 이소형 대조군 항체는 CD28을 발현하는 세포주에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

[0237] 표 15는 유세포 분석에 의해 결정된 바와 같이 사이노몰구스 원숭이(캄보디아 산) T 및 B 세포의 표면에 대한 CD22xCD28 이중 특이적 항체의 데이터의 결합을 제공한다.

[0238] 12개 중 12개의 B 세포 및 12개의 사이노몰구스 원숭이 중 11개의 T 세포에 결합된 REGN5837을 시험하였다. CD20+ B 세포에 대한 결합은 2차에 비해 12.6 내지 30.3배 범위였으며 중앙값은 15.7배였다. CD2+/CD16- T 세포에 대한 결합은 2차에 비해 1.2 내지 5.2배 범위였으며 중앙값은 3.5배였다. 양성 결합은 2차에 비해 1.2배 초과로 정의되었다. 12개 중 12개의 B 세포 및 12개의 사이노몰구스 원숭이 중 11개의 T 세포에 결합된 REGN5838을 시험하였다. CD20+ B 세포에 대한 결합은 2차에 비해 6.5 내지 13.5배 범위였으며 중앙값은 9.3배였다. CD2+/CD16- T 세포에 대한 결합은 2차에 비해 1.2 내지 4.7배 범위였으며 중앙값은 3.8배였다. 양성 결합은 2차에 비해 1.2배 초과로 정의되었다. 이소형 대조군 항체는 사이노몰구스 T 또는 B 세포에 대한 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

표 14: 조작된 표적 및 이펙터 세포에 대한 유세포 분석 실험에 대한 결합 및 배수 결합 결과.

항체 PiD	Jurkat FACS [M]	Jurkat FACS 배수	Nalm6 FACS [M]	Nalm6 FACS 배수
REGN5837	$2.1E-08$	198	$1.3E-08$	12.2
REGN5838	$2.3E-08$	203	$1.8E-08$	11.7
이소형 대조군	결합 없음	1	결합 없음	1

[0239]

표 15: 사이노몰구스(캄보디아 산) T 및 B 세포에 대한 유세포 분석 실험에 대한 배수 결합 결과.

	B 세포 결합 (2 차 대비 배수)			T 세포 결합 (2 차 대비 배수)		
	REGN5837	REGN5838	이소 대조군	REGN5837	REGN5838	이소 대조군
Cyno 1	22.4	12.2	1.3	4.3	4.3	1.2
Cyno 2	28	13.4	1.1	5.2	3.9	1.2
Cyno 3	22.5	13.5	1	5.2	4.7	1
Cyno 4	15.4	7.9	1	1.5	1.4	0.9
Cyno 5	13.2	7.4	1	2.9	2.8	1.1
Cyno 6	30.3	17	1	3.5	3.7	1.2
Cyno 7	19.8	11.9	1	4.1	4	1
Cyno 8	10.6	6.5	1.2	3.5	4	1.2
Cyno 9	12.8	7.2	1.1	2.6	3	1.1
Cyno 10	16	10.2	1.4	3.5	3.8	1.1
Cyno 11	14.5	8.4	1.2	1.5	1.4	1
Cyno 12	12.6	7.5	1	1.2	1.2	0.8
중앙	15.7	9.3	1.05	3.5	3.75	1.1

[0240]

[0241] 실시예 7. 유세포 분석을 사용한 인간 CD4⁺ T-세포 및 조작된 표적 세포에 대한 항-CD28 및 항-CD22xCD28 이중 특이적 항체의 결합 특이성

[0242] 유세포 분석을 사용하여 인간 CD28을 발현하는 이펙터 세포(인간 CD4⁺ T-세포) 및 인간 CD22를 발현하는 표적 세포(HEK293/hCD20/hCD22 및 Raji/CD80 및 CD86 음성 B-세포)에 대한 CD22 x CD28 이중 특이적(REGN5837; REGN5838) 및 대조군 항체의 결합을 조사했다. HEK293/hCD20 세포는 CD28 및 CD22에 대한 음성 세포주로 포함되었다.

[0243] 인간 CD4⁺ T-세포는 건강한 기증자 백혈구 팩으로부터 얻은 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리되었다. PBMC 단리는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 50 mL SepMateTM 튜브를 사용하여 밀도 구배 원심 분리로 수행되

었다. 간단히 말해서, 15 mL의 Ficoll-Paque PLUS를 50 mL SepMate 튜브에 적층한 다음 D-PBS+ 2% FBS로 1:2로 희석된 30 mL의 백혈구를 첨가했다. SepMate 제조업체의 프로토콜에 따라 후속 단계를 따랐다. CD4⁺ T-세포는 제조업체의 지침에 따라 Miltenyi Biotec의 인간 CD4 Microbead 키트를 사용하여 PBMC에서 후속적으로 분리되었다. 분리된 CD4⁺ T-세포를 바이알 당 5×10^6 세포의 농도로 10% DMSO를 함유하는 FBS에서 동결시켰다.

[0244] HEK293 세포주 및 인간 Raji B-세포를 포함하는 표적 세포를 다음과 같이 제조하였다.

[0245] 인간 CD20(수탁 번호 NP_068769.2의 아미노산 M1 내지 P297)을 발현하는 안정한 HEK293 세포주(ATCC, # CRL-1573)를 인간 CD22(수탁 번호 NP_001762.2의 아미노산 M1 내지 A847)로 형질 도입시켰다. 인간 CD22 양성 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 분리되고 단일 클로닝되었다. 생성된 클론 세포주(HEK293/hCD20/hCD22 클론 E4)는 500 g/mL G418이 보충된 DMEM + 10% + P/S/G + NEAA에서 유지되었다.

[0246] CD20, CD22, Fc 감마 수용체(FcγR), CD80 및 CD86을 세포 표면에 내인성으로 발현하는 인간 Raji B-세포(ATCC # CCL-86)는 CRISPR 기술을 사용하여 CD80 및 CD86을 제거함으로써 유전적으로 변형되었다. CD80 및 CD86은 CD28에 대한 알려진 리간드이다. 조작된 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포는 HEPES 및 나트륨 피루베이트가 보충된 RPMI + 10% FBS + 페니실린 + 스트렙토마이신 + 글루타민에서 유지되었다.

[0247] 세포는 다음과 같이 염색되었다.

[0248] 간략하게, 인간 CD4⁺ T-세포, HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 및 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포를 D-PBS+ 2% FBS를 함유하는 염색 완충액에 재현탁시켰다. Raji 세포를 마우스 IgG(최종 농도 625mg/mL)와 함께 배양하여 내인성 Fc 감마 수용체를 차단했다. 간단히 말해서, 96웰 플레이트에서 2×10^5 세포/웰을 항체를 연속 희석하여, 6.1pM 내지 100nM 범위에서, 4℃에서 30 내지 60분 동안 배양했다. 항체를 포함하지 않는 음성 대조군 샘플이 포함되었다. 세포를 차가운 염색 완충액으로 1회 세척하고 알로피코시아닌(APC) 표지된 항-인간 2차 항체와 함께 30 내지 45분 동안 배양했다. 배양 후, 세포를 FBS 없이 차가운 D-PBS 완충액으로 1회 세척하고, 제조업체의 지침에 따라 LIVE/DEAD Flexible Green Dead Cell Stain(Invitrogen)과 함께 배양하여 살아 있는 세포와 죽은 세포를 구별하였다. 그런 다음 세포를 제조업체의 지침에 따라 BD Cytotfix 완충액에 고정하고 세척하고 염색 완충액에 재현탁하고 iQue Screener 유세포 분석기에서 유세포 분석법으로 분석했다. EC₅₀ 측정을 위해 GraphPad Prism을 사용하여 9-포인트 응답 곡선에 대해 4 매개 변수 로지스틱 방정식을 사용하여 기하학적 평균 형광 강도(MFI) 값을 분석했다. 배수 결합은 다음 방정식을 사용하여 계산되었다.

$$\text{배수 결합} = \frac{\text{테스트한 용량 범위 내의 최대 기하 MFI 값}}{\text{배경 [0nM]의 MFI 값}}$$

[0249]

[0250] 인간 CD22 및 CD28에 결합하는 CD22 x CD28 이중 특이적 항체의 능력은 CD22(HEK293/hCD20/hCD22)를 과발현하거나 내인성으로(Raji/CD80 및 CD86 음성) 하는 1차 인간 CD4⁺ T-세포 및 조작된 세포에서 유세포 분석에 의해 평가되었다. 음성 세포주가 대조군으로 포함되었다(HEK293/hCD20).

[0251] EC₅₀/배수 결합 값은 도 1 및 표 16에 요약되어 있다.

표 16: 인간 CD4⁺ T-세포 및 조작된 표적 세포에 대한 유세포 분석 실험에 대한 EC₅₀ 및 배수 결합 결과:

항체	HEK293/hCD20		HEK293/hCD20/hCD22		Raji/CD80 및 CD86 음성		인간 CD4 ⁺ T-세포	
	EC ₅₀ [M]	배수 결합	EC ₅₀ [M]	배수 결합	EC ₅₀ [M]	배수 결합	EC ₅₀ [M]	배수 결합
REGN5837	ND	1.07	NC	16.44	9.76E-09	38.35	NC	9.25
REGN5838	ND	1.11	1.14E-08	34.90	1.49E-08	81.74	NC	10.63
REGN5705	ND	1.11	ND	1.00	ND	1.04	4.13E-09	37.48
한 팔 CD28 대조군	ND	1.05	ND	1.11	ND	1.07	n/c	10.97
이소형 대조군	NC	1.82	ND	1.15	ND	1.08	ND	1.11

약어: NC = 계산할 수 없음 (반응이 포화에 도달하지 않은 곡선에 대해 표시됨); ND = 결정되지 않음.

표 16. 인간 CD4⁺ T-세포 및 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 B-세포와 같은 조작된 세포주에 대한 항체의 표로 나타낸 EC₅₀ 및 배수 결합 값.

[0252]

[0253] 예상대로 CD28 항체, 모체(REGN5705; HCVR/LCVR 서열 번호 35/36) 또는 이의 이중 특이적 형식(REGN5837, REGN5838 및 하나의 아암 CD28 대조군(서열 번호 48)) 중 어느 것도 음성 HEK293/hCD20 세포에 결합하지 않았다. 비특이적 결합으로 인해 이소형 대조군 항체에서 약 1.8배의 약한 결합이 가장 높은 농도에서 검출되었다(도 1 및 표 16).

[0254]

항-CD22 x 항-CD28 항체의 결합이 HEK293/hCD20/hCD22(REGN5837의 경우 16.44x 및 약 11.4nM의 EC₅₀을 갖는 REGN5838의 경우 34.9x)에서, 그리고 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포(약 9.76nM의 EC₅₀을 갖는 REGN5837의 경우 38.35x 및 약 14.9nM의 EC₅₀을 갖는 REGN5838의 경우 81.74x)에서 관찰되었다. 하나의 아암 CD28 및 이소형 대조군에서는 유의한 결합이 검출되지 않았다(도 1 및 표 16).

[0255]

인간 CD28을 표적으로 하는 항체의 결합이 1차 인간 CD4⁺ T-세포에서 검출되었다. 모 CD28 항체, REGN5705는 배정보다 약 4.13nM의 EC₅₀으로 37.48x 결합된 반면, 이중 특이적 항체, REGN5837, REGN5838 및 하나의 아암 대조군은 각각 9.25x, 10.63x 및 10.97x의 결합을 나타냈다. 예상대로 이소형 대조군은 세포에 결합하지 않았다(도 1 및 표 16).

[0256]

실시예 8. 항-CD22xCD28 이중 특이적 항체 공동-자극은 항-CD20xCD3 이중 특이적 항체에 의한 표적 세포 독성, T 세포 활성화 및 사이토카인 방출을 향상시킨다

[0257]

CD20xCD3 표적 사멸의 CD22xCD28 향상은 CD80 및 CD86(Raji-80/86DKO)의 발현이 결여되도록 조작된 Raji 세포를 표적으로 하는 96시간 세포 독성 검정에서 평가되었다. 간단히 말해서, 인간 PBMC를 1x10⁶ 세포/mL로 보충된 RPMI 배지에 플레이트링하고 부착성 대식세포, 수지상 세포 및 일부 단핵구를 고갈시켜 림프구를 풍부하게 하기 위해 37°C에서 밤새 배양했다. 다음날, Raji-80/86DKO 세포는 1uM의 형광 추적 염료 CFDA-SE로 표지되었고 부착 세포가 고갈된 나이브 PBMC는 1uM의 형광 추적 염료 CellTrace Violet으로 표지되었다. 표지된 표적 세포 및 PBMC(이펙터/표적 세포 10:1 비율)를 하나는 서열 번호 42로 구성된 중쇄 아암, 다른 하나는 서열 번호 43으로 구성된 중쇄 아암 및 서열 번호 44의 경쇄)를 갖는 CD20xCD3 이중 특이적 항체인 REGN1979의 연속 희석액(농도 범위: 5 nM 내지 0.64pM), 및 고정 농도의 CD22xCD28 공동 자극 분자 REGN5837 또는 REGN5838, 1-아암 대조군 CD28 이중 특이적(REGN5678) 또는 IgG4s 이소형 대조군(H4sH10154P3, 서열 번호 37/38의 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 이소형 대조군)에서 2.5ug/ml(16.7nM)에서 37°C에서 96시간 동안 공동-배양하였다. 세포를 플레이트로부터 수확하고 FACS BD LSRFortessa-X20상에서 FACS에 의해 분석하였다. FACS 분석을 위해, 세포를 Fixable Live/Dead Far Red 반응성(Invitrogen) 염료로 염색했다. FACS 분석 직전에 20,000개의 계수한 비드를 각 웰에 추가하고 각 샘플에 대해 10,000개의 비드를 수집했다. 사멸 특이성 평가를 위해, 세포는 살아 있는 CFDA-SE 표지된 집단으로 게이팅하였다. 살아 있는 집단의 백분율을 기록하고 생존 계산에 사용했다.

[0258]

T 세포 활성화는 CD2, CD4, CD8 및 CD25에 직접 접합된 항체와 함께 세포를 배양하여 평가했다. CD25를 발현하는 CD8⁺ 세포의 백분율은 T 세포 활성화의 척도로 보고되었다. 또한 T 세포가 증식함에 따라 CellTraceViolet

이 희석되어 FACS로 측정했을 때 MFI가 낮아졌다. 따라서 T 세포 증식은 CD8+ T 세포에서 CellTraceViolet의 MFI 감소로 보고되었다. CD80 및 CD86 발현 및 결합이 없는 표적 Raji 세포에 대한 EC₅₀ 값은 Prism 소프트웨어에서 4-매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다.

[0259] 이 검정으로부터의 상청액은 사이토카인 수준의 분석을 위해 수집되었다. IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 및 IL-2의 농도는 제조업체의 지침에 따라 Cytometric Bead Array(CBA) 키트를 사용하여 분석되었다. 사이토카인 수준은 키트 표준에 의해 생성된 곡선에서 보간되었으며 pg/mL로 보고되었다. 최대 사이토카인 수준은 Prism 소프트웨어에서 4-매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다.

[0260] 공동 자극 CD22xCD28 항체 또는 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체와 조합하여, 항-CD20xCD3 이중 특이적 항체 REGN1979(상기 참조)가 자극되지 않은 인간 T 세포를 유도하여 인간 CD20 및 CD22를 발현하는 표적 세포를 사멸시키는 능력을 검정의 결과로 평가하였다.

[0261] REGN1979는 CD80 및 CD86 발현이 결여된 Raji 세포를 용량 의존적 방식으로 고갈시키도록 인간 T 세포를 활성화하고 지시했다. 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이적 항체를 REGN1979에 추가하면 REGN1979의 세포 독성 효능(EC₅₀)이 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체를 사용한 REGN1979와 비교할 때 3.5 내지 6.4배 향상되었다(표 17).

[0262] REGN1979에 의해 매개된 관찰된 표적 세포 용해는 각각 CD8+ 세포에 대한 CD25 상향 조절 또는 CellTrace 바이올렛 희석에 의해 측정된 바와 같이, T 세포 활성화 및 증식과 관련이 있었다. 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이적 항체를 REGN1979에 추가하면 REGN1979 유도된 T 세포 활성화 및 증식의 효능이 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체를 사용하는 REGN1979와 비교할 때 각각 2.1 내지 2.6배 및 7.4 내지 8.4배 향상되었다(표 17).

[0263] REGN1979는 인간 사이토카인의 방출을 유도했다. CD22xCD28 이중 특이적 항체와 조합하여 REGN1979로 관찰된 방출된 사이토카인은 고정된 농도의 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체를 갖는 고정된 농도의 CD22xCD28 공동 자극 분자의 존재하에 향상되었다(표 18).

[0264] 요약하면, 공동 자극은 대조군 항체와 조합된 CD20xCD3에서 관찰된 것과 비교할 때 표적화된 세포 독성, T 세포 활성화 및 사이토카인 방출의 효능을 증가시켰다.

표 17: 세포 독성 및 T 세포 활성화에 대한 EC₅₀ 값 (3 회 실험의 평균)

항체	세포 사멸		T 세포 활성화 (CD8+/CD25+)		T 세포 분할 (CD8+ 세포의 CellTrace MFI)	
	EC ₅₀ [M]	IgG4 와 비교한 배수 EC ₅₀	EC ₅₀ [M]	IgG4 와 비교한 배수 EC ₅₀	EC ₅₀ [M]	IgG4 와 비교한 배수 EC ₅₀
REGN5837	1.48E-10	3.5	1.58E-11	2.1	4.81E-12	7.4
REGN5838	8.12E-11	6.4	1.28E-11	2.6	4.23E-12	8.4
1-팔 CD28	6.37E-10	0.8	3.46E-11	1.0	3.03E-11	1.2
IgG4 이소	5.22E-10	1.0	3.32E-11	1.0	3.55E-11	1.0

[0265]

표 18: 사이토카인 방출 (pg/ml)

	REGN5837	REGN5838	1-팔 CD28	IgG4 이소
IL-4	46	50	33	29
IL-6	907	810	248	283
IL-2	531	270	36	39
IL-10	1917	2555	739	375
TNF α	277	339	100	66
IFN γ	1847	1956	267	160
IL-17A	154	172	41	35

[0266]

실시예 9: CD22 이중 특이적 항체에 대한 생물학적 검정

[0267]

[0268] T-세포 활성화는 항원 제시 세포(APC)에서 주요 조직적합성 복합체 클래스 I 또는 II(MHCI 또는 MHCII) 단백질에 의해 제시된 특정 펩티드를 인식하는 T-세포 수용체(TCR)를 자극함으로써 달성된다(Goldrath 등 1999). 활성화된 TCR은 차례로 활성화된 단백질 1(AP-1), 활성화된 T 세포의 핵 인자(NFAT) 또는 활성화된 B 세포의 카파-경쇄-인헨서의 핵 인자(NF κ B)와 같은 다양한 전사 인자에 의해 유도되는 리포터 유전자에 의해 모니터링될 수

있는 일련의 신호 이벤트를 시작한다. T-세포 반응은 CD28, CTLA-4(세포 독성 T-림프구-연관 단백질 4), PD-1(프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1), LAG-3(림프구-활성화 유전자 3) 또는 기타 분자와 같은 T-세포에서 구성적으로 또는 유도적으로 발현되는 공동 수용체의 참여를 통해 더욱 정제된다(Sharpe 등 2002). 공동 자극 분자인 CD28은 APC에서 발현되는 내인성 리간드인 CD80 또는 CD86에 의해 활성화된다. CD28은 TCR 활성화 후 NF κ B 전사 인자에 의해 제어되는 경로와 같은 세포 신호를 강화한다. CD28 공동 신호는 T 세포 분화, 증식, 사이토카인 방출 및 세포 사멸과 같은 효과적인 T 세포 활성화에 중요하다(Smeets 등 2012).

[0269] 항-CD22xCD28 이중 특이적 항체는 1차 인간 CD4⁺ T-세포를 사용하는 루시페라제 기반 리포터 생물학적 검정 및 IL-2 기능적 검정에서 특성화되었다.

[0270] 루시페라제 기반 리포터 검정:

[0271] 항-CD28 x 항-CD22 이중 특이적 항체와의 결합시 NF κ B 활성화에 대한 CD28 활성화의 효과를 평가하기 위해 T-세포/APC(항원 제시 세포) 루시페라제 기반 리포터 검정이 개발되었다.

[0272] 리포터 T 세포의 조작:

[0273] 클론 리포터 T 세포주는 제조업체의 규정에 따라 NF κ B- 루시페라제(NF κ B-Luc) 렌티바이러스 리포터(Qiagen에서 제조)로 불멸의 인간 Jurkat T-세포(ATCC # TIB-152)를 형질 도입함으로써 조작되었다. 클론 리포터 주(Jurkat/NF κ B-Luc 클론 1C11)은 1 μ g/mL 퓨로마이신이 보충된 RPMI + 10% FBS + 페니실린 + 스트렙토마이신 + 글루타민에서 유지되었다.

[0274] APC의 조작:

[0275] 인간 CD20(수탁 번호 NP_068769.2의 아미노산 M1 내지 P297)을 발현하는 안정한 HEK293 세포주(ATCC, # CRL-1573)를 인간 CD22(수탁 번호 NP_001762.2의 아미노산 M1 내지 A847)로 형질 도입시켰다. 인간 CD22 양성 세포는 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 단리되고 단일 클로닝되었다. 생성된 클론 세포주(HEK293/hCD20/hCD22 클론 E4)는 500 μ g/mL G418이 보충된 DMEM + 10% + P/S/G + NEAA에서 유지되었다.

[0276] 내인성으로 CD20, CD22, Fc 감마 수용체(Fc γ R), CD80 및 CD86을 세포 표면에 발현하는 인간 Raji B 세포(ATCC # CCL-86)를 CRISPR 기술을 사용하여 CD80 및 CD86을 제거함으로써 유전자 변형시켰다. CD80 및 CD86은 CD28에 대한 알려진 리간드이다. 조작된 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포는 HEPES 및 나트륨 피루베이트가 보충된 RPMI + 10% FBS + 페니실린 + 스트렙토마이신 + 글루타민에서 유지되었다.

[0277] T 세포/APC 자극:

[0278] 이 실험에서, 조작된 리포터 T-세포는 2개의 이중 특이적 항체를 통해 자극되었다. 첫 번째 자극은 하나의 중쇄 아암은 서열 번호 39로 구성되고 하나의 중쇄 아암은 서열 번호 40으로 구성되고 서열 번호 41)의 경쇄 아암을 갖고, 조작된 리포터 T-세포상의 CD3 분자 및 HEK293상의 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 B 세포상의 CD20을 표적화하는 T-세포 활성화 이중 특이성 항체 REGN2281, 항-CD20 x 항-CD3 항체에 의해 전달된다. 첫 번째 자극은 MHC 분자에 표시되는 특정 펩티드인 천연 리간드에 의한 TCR 활성화의 필요성을 우회한다. 두 번째 자극은 CD28 이중 특이적 항체(즉, 항-CD28 x 항-CD22 이중 특이적 항체)에 의해 유도된다. 이 항체는 APC에서 발현되는 리간드 CD80/CD86에 의해 T-세포에서 CD28 활성화를 모방한다. 이는 T-세포상의 CD28 및 HEK293 세포상의 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 B 세포상의 CD22와 상호 작용하고 조작된 리포터 T-세포에서 CD28의 활성화를 유도한다. TCR 및 CD28의 동시 활성화는 NF κ B의 전사 활성을 향상시켜 리포터 유전자인 루시페라제의 생성을 증가시킨다.

[0279] 루시페라제 검정 설정:

[0280] 10% FBS 및 P/S/G로 보충된 RPMI1640을 검정 배지로 사용하여 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 스크리닝을 위한 세포 현탁액 및 항체 희석액을 제조하였다.

[0281] 스크리닝 하루 전, 조작된 리포터 T-세포를 세포 배양 배지에서 0.5 x 10⁶ 세포/mL로 배양했다. 1:3 연속 희석된 항-CD28 x 항-CD22 이중 특이적 항체 및 대조군은 200pM 고정된 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3, 상기 참조) 또는 REGN1945(서열 번호 45/46의 HCVR/LCVR 쌍을 갖는 hIgG4 이소형 대조군)의 존재하에 테스트되었다. 10-점 희석은 CD28 항체를 함유하지 않는 최종 희석으로 15 pM 내지 100 nM 사이였다.

[0282] 시약을 다음 순서로 첨가했다: 1) 고정 농도의 최종 200pM REGN2281(항-CD20 x 항-CD3, 상기 참조) 또는

REGN1945(hIgG4 이소형 대조군, 상기 참조)를 96 웰 백색 평평한 바닥 플레이트의 각 웰에 첨가했다; 2) 4×10^5 세포/mL(최종 세포 농도 1×10^4 세포/웰)로 재현탁된 HEK293 세포 또는 2×10^6 세포/mL(최종 세포 농도 5×10^4 세포/웰)로 재현탁된 Raji/CD80 및 CD86 음성 B 세포를 해당 플레이트에 첨가하였다; 3) 연속 희석된 항체를 해당 웰에 첨가했다; 4) 밤새 배양된 리포터 T-세포를 2×10^6 /mL로 재현탁하고 최종 농도 5×10^4 세포/웰이 되도록 플레이트에 첨가했다. 플레이트를 37°C/5% CO₂에서 4 내지 6시간 동안 배양한 후, 100 µL ONE-Glo™(Promega) 시약을 첨가하여 세포를 용해하고 루시페라제 활성을 검출했다. 방출된 빛은 다중 라벨 플레이트 판독기인 Envision(PerkinElmer)에서 상대 발광 단위(RLU: Relative Light Unit)로 포획되었다. 모든 연속 희석은 중복 테스트되었다.

[0283] 항체의 EC₅₀ 값은 GraphPad Prism™ 소프트웨어를 사용하여 10-점 용량-반응 곡선 상에서 데이터를 4-매개 변수 로지스틱 방정식에 피팅함으로써 결정되었다. 배수 유도는 다음 방정식을 사용하여 계산되었다.

$$\text{배수 유도} = \frac{\text{테스트한 용량 범위 내의 최대 평균 RLU 값}}{\text{배경 [0nM]의 평균 RLU 값}}$$

[0284]

[0285] 1차 인간 CD4⁺ T 세포를 사용한 IL-2 기능 검정:

[0286] 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체와의 결합시 IL-2 생산에 대한 CD28 활성화의 효과를 평가하기 위해 1차 CD4⁺ T-세포/APC 기능 검정이 개발되었다.

[0287] 인간 1차 CD4⁺ T-세포 분리:

[0288] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 건강한 기증자 백혈구 펌프로부터 분리되었다. PBMC 분리는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 50 mL SepMate™ 튜브를 사용하여 밀도 구배 원심 분리로 수행되었다. 간단히 말해서, 15 mL의 FicollPaque PLUS를 50 mL SepMate 튜브에 적충한 다음 D-PBS+2% FBS로 1:2로 희석된 30 mL의 백혈구를 첨가했다. SepMate 제조업체의 프로토콜에 따라 후속 단계를 따랐다. 제조업체의 지침에 따라 Miltenyi Biotec의 인간 CD4 Microbead 키트를 사용하여 이어서 CD4⁺ T-세포를 PBMC에서 분리하였다. 분리된 CD4⁺ T-세포를 바이알 당 5×10^6 세포의 농도로 10% DMSO를 함유하는 FBS에서 동결시켰다.

[0289] CD28 항체로 처리된 1차 CD4⁺ T-세포로부터의 IL-2 방출:

[0290] 이 검정에서, 1차 CD4⁺ T-세포는 인간 CD20을 발현하도록 조작된 HEK293 세포 또는 내인성 CD20 발현 Raji 세포와 조합하여 항-CD20 x 항-CD3 이중 특이적 항체(REGN2281, 상기 참조)를 사용하여 표면상의 CD3의 가교를 통해 활성화되고, 여기서 CD80 및 CD86은 CRISPR 기술(Raji/CD80 및 CD86 음성 세포)을 사용하여 침묵 처리되었다. REGN2281의 CD20 아암이 CD20 발현 세포에 결합하면 CD3 수용체의 클러스터링을 유도하여 T-세포 자극에 필요한 첫 번째 신호를 제공한다. 중요한 것은, 일부 경우에 유전적으로 구별되는 세포와 1차 백혈구를 공동 배양하면 동종 결정 인자의 비호환성을 유발하고 T-세포 활성화를 초래한다. 이는 항-CD20 x 항-CD3 이중 특이적 항체의 외인성 첨가가 없는 경우 충분한 1차 자극을 제공할 수 있다. 1차 자극에 관계없이 정량화 가능한 IL-2 방출을 검출하기 위해서는 CD28 분자를 가교하여 제공할 수 있는 공동 자극이 필요하다. 여기서, 이중 특이적 CD28 항체(즉, 항-CD28 x 항-CD22 이중 특이적 항체)는 CD4⁺ T-세포상의 CD28 및 HEK293/hCD20 또는 RAJI/CD80 및 CD86 음성 세포상의 CD22와 상호 작용하여 CD28의 클러스터링 활성화를 유도한다. 결합된 TCR 및 CD28 결합은 세포 배양 배지로 방출되는 IL-2 생산을 향상시킨다. IL-2는 PerkinElmer의 균질한 무세척 AlphaLisa 키트를 사용하여 세포 상청액에서 검출 및 정량화된다.

[0291] 이전에 분리되고 동결된 인간 CD4⁺ T-세포를 자극 배지(10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA 및 50 U/ml 벤조나제 뉴클레아제를 함유하는 0.01 mM BME로 보충된 X-VIVO 15 세포 배양 배지)에서 검정 당일 해동시켰다. 세포를 1200 rpm에서 10분 동안 원심 분리하고, 자극 배지에 재현탁하고 1×10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 플레이팅했다. 인간 CD20을 단독으로 또는 인간 CD22와 조합하여 발현하도록 조작된 HEK293 세포를 10 x

10^6 세포/mL 농도의 1차 자극 배지에서 15 μ g/mL의 미토마이신 C로 처리했다. Raji/CD80 및 CD86 음성 세포는 10×10^6 세포/mL 농도의 1차 자극 배지에서 20 μ g/mL의 미토마이신 C로 처리되었다. 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, 5% CO₂, HEK293 및 Raji 세포를 2% FBS를 함유하는 D-PBS로 3회 세척하고 CD4⁺ T-세포를 함유하는 웰에 웰당 1×10^4 세포의 HEK293 세포 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포의 경우 웰당 5×10^4 세포의 최종 농도로 첨가했다. 이어서, 15pM 내지 100nM 범위의 1:3 연속 희석된 항-CD28 x 항-CD22 이중 특이적 또는 대조군 항체를 2nM REGN2281(항-CD20 x 항-CD3) 또는 REGN1945(음성 hIgG4 이소형 대조군, 상기 참조)의 존재하에 웰에 첨가하였다. 10-점 희석의 최종 점에는 CD28 항체가 포함되지 않았다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 배양한 후 원심 분리하여 세포를 펠렛화하고 40 μ L의 배지 상청액을 수집했다. 이로부터, 5 μ L를 제조자의 프로토콜에 따라 인간 IL-2 AlphaLISA 검정으로 테스트했다. 측정은 다중 라벨 플레이트 판독기인 Envision에서 획득하고 원시 RFU(Relative Fluorescence Units) 값을 플로팅하였다. 모든 연속 희석액은 중복 테스트되었다.

[0292] 항체의 EC₅₀ 값은 GraphPad PrismTM 소프트웨어를 사용하여 10-점 용량-반응 곡선 상에서 4-매개 변수 로지스틱 방정식에 데이터를 피팅함으로써 결정되었다. 배수 유도는 다음 방정식을 사용하여 계산되었다.

$$\text{배수 유도} = \frac{\text{테스트한 용량 범위 내의 최대 평균 RFU 값}}{\text{배경 [0nM]의 평균 RFU 값}}$$

[0293]

[0294] **결과 요약 및 결론:**

[0295] 루시페라제 기반 리포터 검정:

[0296] CD22 표적 발현의 부재 또는 존재하에 T-세포상의 CD28을 통해 공동-자극을 제공하는 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 능력은 판독으로서 루시페라제 활성을 사용하는 리포터 세포 기반 생물학적 검정에서 평가되었다.

[0297] 활성화 곡선은 도 2(a 및 b)에 나타나 있으며, 200pM 고정된 REGN1945(hIgG4 이소형 제어) 또는 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)에 추가로 HEK293/hCD20 또는 HEK293/hCD20/hCD22 세포와 함께 공동 배양된 조작된 리포터 T 세포에 대한 EC₅₀ 및 배수 유도 값은 표 19 및 20에 요약되어 있다.

[0298] 리포터 T-세포 및 HEK293 유래 APC를 200pM REGN1945로 처리했을 때, CD28 이중 특이적 항체 중 어느 것도 검정에 사용된 HEK293 주에 관계없이 TCR 자극없이 루시페라제 활성의 증가를 나타내지 않았다. 루시페라제 활성화의 증가는 HEK293/hCD20 세포(2.18x) 및 HEK293/hCD20/hCD22 세포(2.05x)를 갖는 모 CD28 항체(REGN5705)에 대해서만 관찰되었다. 하나의 아암 CD28 및 이소형 대조군 항체는 이 설정에서 루시페라제 반응을 일으키지 않았다(표 19 및 도 2).

[0299] 리포터 T-세포 및 HEK293 유래 APC를 200pM REGN2281로 처리했을 때, 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체(REGN5837 및 REGN5838)는 모두 CD22 발현 HEK293 세포와 함께 강력한 루시페라제 활성을 유도하여 EC₅₀ 및 배수 유도 값을 증가시키는 것으로 나타났다. 하나의 아암 CD28 대조군 항체 및 모 CD28 항체(REGN5705; HCVR/LCVR 서열 번호 35/36 참조)는 두 HEK293 주에서 유사한 활성을 나타냈다. 이소형 대조군 항체는 이 설정에서 루시페라제 반응을 일으키지 않았다(표 20 및 도 2).

[0300] 리포터 T-세포 및 Raji/CD80 및 CD86 음성을 200pM REGN1945로 처리했을 때, 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체(REGN5837 및 REGN5838) 및 모 CD28 항체 모두 루시페라제 활성을 유도한 반면, 하나의 아암 CD28 대조군 항체 및 이소형 대조군은 활성을 나타내지 않았다(표 19 및도 2).

[0301] 리포터 T-세포 및 Raji/CD80 및 CD86 음성을 200pM REGN2281로 처리했을 때, 모 CD28 항체를 포함, 모든 CD28 이중 특이적 항체(REGN5837 및 REGN5838) 및 하나의 아암 CD28 대조군 항체가 루시페라제 활성을 유도하였다. EC₅₀ 값은 항-CD22 x 항-CD28 및 모 CD28 항체에 대해서만 결정될 수 있었고, 하나의 아암 CD28 대조군에 대해서는 포화 수준에 도달하지 못하기 때문에 결정되지 않았다. 이소형 대조군에서는 활성화가 감지되지 않았다(표 20 및 도 2).

- [0302] 1차 인간 CD4⁺ T 세포를 사용한 IL-2 기능 검정:
- [0303] CD22 표적 발현의 부재 또는 존재하에 T-세포상의 CD28을 통해 공동-자극을 제공하는 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 능력은 IL-2 사이토카인 생산을 측정하는 기능적 1차 CD4⁺ T-세포 분석에서 평가되었다.
- [0304] 활성화 곡선은 도 3(a 및 b)에 나타나 있으며, 2nM 고정 REGN1945(hIgG4 이소형 대조군) 또는 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)의 존재하에 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포와 함께 공동 배양된 CD4⁺ T-세포에 대한 EC₅₀ 및 배수 유도 값은 표 21에 요약되어 있다.
- [0305] 충분한 동종 1차 T-세포 자극의 부재로 인해, 일정한 양의 REGN1945가 있는 HEK293/hCD20 또는 HEK293/hCD20/CD22 세포를 함유하는 웰에서 측정 가능한 IL-2 방출이 관찰되지 않았다(도 3). 그러나 IL-2 방출은 항체 매개 CD3 클러스터링이 없는 경우에도 충분한 1차 자극을 제공하는 상당한 동종 반응으로 인해, 일정한 양의 REGN1945가 있는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포를 함유하는 웰에서 검출되었다(도 3 및 표 21).
- [0306] 2nM 고정 농도의 REGN2281 및 모 CD28 mAb(REGN5705, 상기 참조)를 첨가했을 때 HEK293/hCD20 또는 HEK293/hCD20/CD22 세포를 함유하는 샘플에서 측정 가능한 IL-2 수준이 검출되었다. 2가 CD28 mAb와 대조적으로, 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 mAb가 HEK293/hCD20 세포 및 REGN2281을 함유하는 웰에 첨가될 때 IL2 방출이 극적으로 향상되지 않았다. HEK293/hCD20/CD22 세포 및 REGN2281의 존재하에서만 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 mAb가 IL-2 방출을 상당히 향상시켰다(도 3 및 표 22).
- [0307] 표 19 내지 22가 아래에 제시되어 있다.
- [0308] 표 19는 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 또는 RAJI/CD80 및 CD86 음성 세포 및 200pM 고정의 REGN1945(이소형 대조군)와 함께 공동-배양된 조작된 T-세포에서 루시퍼라제 활성의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값을 표로 작성하여 제공한다.
- [0309] 표 20은 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포 및 200pM 고정의 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)과 함께 공동-배양된 조작된 T-세포에서 루시퍼라제 활성의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값을 표로 작성하여 제공한다.
- [0310] 표 21은 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 RAJI/CD80 및 CD86 음성 세포 및 2nM 고정의 REGN1945(이소형 대조군)와 함께 공동-배양된 CD4⁺ T-세포로부터 IL-2 방출의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값을 표로 작성하여 제공한다.
- [0311] 표 22는 HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, 또는 Raji/CD80 및 CD86 음성 세포 및 2nM 고정의 REGN2281(항-CD20 x 항-CD3)과 함께 공동-배양된 CD4⁺ T-세포로부터의 IL-2 방출의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값을 표로 작성하여 제공한다.

표 19: 200 pM REGN1945 (이소형 대조군)를 사용한 TCR 자극 부재하에 조작된 리포터 T-세포에서 루시퍼라제 활성의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값:

항체	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 및 CD86 음성		
	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU
REGN5837	ND	1.01	11860	ND	1.11	13280	1.66E-09	1.29	16020
REGN5838	ND	1.04	11980	ND	1.05	12480	2.55E-09	2.06	26500
REGN5705	6.23E-09	2.18	24980	8.45E-09	2.05	25060	7.88E-09	2.57	33180
한 팔 CD28	ND	1.00	11700	ND	1.05	12880	ND	1.05	13720
이소형 대조군	ND	1.04	11180	ND	1.04	12160	ND	1.04	12540

약어: ND = 결정되지 않음

표 20: 200pM REGN2281 (αCD20 x αCD3)을 사용한 TCR 자극의 존재하에 조작된 리포터 T 세포에서 루시퍼라제 활성의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값:

항체	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 및 CD86 음성		
	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RLU
REGN5837	NC	1.40	250140	6.44E-10	8.46	799220	1.43E-09	4.46	754820
REGN5838	NC	1.65	256380	1.89E-09	4.53	398720	1.33E-09	11.02	1725640
REGN5705	2.63E-10	3.55	408880	7.7E-11	2.06	171300	4.33E-10	4.15	568740
한 팔 CD28	NC	3.56	454560	1.29E-08	2.82	228840	NC	4.46	642220
이소형 대조군	ND	1.09	212580	ND	1.08	103940	ND	1.05	175540

약어: NC = 계산할 수 없음 (반응이 포화에 도달하지 않은 곡선에 대해 표시됨); ND = 결정되지 않음.

표 21: 2nM REGN1945 (이소형 대조군)의 존재하에 1 차 인간 CD4⁺로부터 IL-2 방출의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값

항체	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 및 CD86 음성		
	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU
REGN5837	ND	1.07	2.01E+03	ND	1.00	1.74E+03	6.31E-11	5.07	6.18E+04
REGN5838	ND	1.24	2.22E+03	ND	1.00	1.89E+03	4.23E-10	3.05	5.38E+04
REGN5705	ND	1.11	2.29E+03	ND	1.71	2.95E+03	1.11E-10	3.56	4.95E+04
한 팔 CD28	ND	1.32	1.76E+03	ND	1.91	2.27E+03	NC	2.43	4.35E+04
이소형 대조군	ND	1.19	2.29E+03	ND	1.47	1.87E+03	ND	1.00	1.51E+04

약어: NC = 계산할 수 없음 (반응이 포화에 도달하지 않은 곡선에 대해 표시됨); ND = 결정되지 않음.

표 22: 2nM REGN2281 (αCD20 x αCD3)의 존재하에 1 차 인간 CD4⁺ T-세포로부터 IL-2 방출의 EC₅₀, 최대 및 배수 유도 값.

항체	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Raji/CD80 및 CD86 음성		
	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU	EC ₅₀ [M]	배수 유도	최대 RFU
REGN5837	NC	4.68	1.21E+04	2.35E-10	55.61	1.01E+05	4.66E-11	5.11	2.40E+05
REGN5838	NC	6.82	1.31E+04	6.85E-10	53.73	9.63E+04	8.93E-11	6.32	2.54E+05
REGN5705	2.23E-09	30.80	6.89E+04	4.07E-09	32.24	5.74E+04	4.51E-11	6.15	2.49E+05
한 팔 CD28	NC	19.45	3.99E+04	NC	6.85	1.89E+04	NC	4.45	1.79E+05
이소형 대조군	ND	1.22	2.22E+03	ND	1.00	3.20E+03	ND	1.00	4.54E+04

약어: NC = 계산할 수 없음 (반응이 포화에 도달하지 않은 곡선에 대해 표시됨); ND = 결정되지 않음.

실시에 10: PD-L1을 발현하도록 조작된 세포로부터의 IL-2 방출에 대한 항-CD22 X 항-CD28 항체와 세미플리맵의 조합의 효과

재료 및 방법

APC의 조작:

RAJI 세포

RAJI는(ATCC® CCL-86™)에서 11세 남성으로부터 단리된 B-림프구 세포주이다. RAJI는 RPMI + 10% FBS + P/S/G + NaPyr + HEPES에서 유지된다.

RAJI CD80 및 CD86 음성

RAJI 세포에서 CD80 및 CD86의 발현은 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 제거되었다.

- [0321] **NALM6 클론 G5**
- [0322] NALM6 클론은 [NALM6 클론 G5(ATCC, # CRL-3273)]에서 19세 남성으로부터 분리된 급성 림프 모구성 백혈병(ALL) 세포주이다. NALM6 세포는 RPMI + 10% FBS + P/S/G에서 유지된다.
- [0323] **WSU-DLCL2**
- [0324] WSU-DLCL2는 41세 백인 남성(Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575)의 흉막 삼출액으로부터 분리된 인간 DLBCL 세포주이다.
- [0325] **PD-L1 조작된 세포주**
- [0326] NALM-6, RAJI CD80 및 CD86 음성(RAJI/CD80-CD86-) 및 WSU-DLCL2 세포주는 인간 PD-L1(수탁 번호 NP_054862.1의 아미노산 M1-T290)을 안정적으로 발현하도록 유전적으로 조작되었다. 생성된 세포주 NALM6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1 및 WSU-DLCL2/PD-L1은 RAJI/CD80-CD86-에 대해서는 0.5 µg/mL 퓨로마이신이 보충되고, NALM-6/PD-L1 및 WSU-DLCL2/PD-L1 세포에 대해서는 1 µg/mL 퓨로마이신이 보충된 각각의 배지에서 유지되었다.
- [0327] **T-세포 증식 및 IL-2 방출을 위한 T-세포 활성화 검정**
- [0328] IL-2 방출에 대한 REGN5837의 효과는 고정된 농도의 세미플리맵의 존재 하에 인간 1차 T 세포 및 동종 인간 B-세포 림프종 세포주 [NALM-6, NALM-6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1, WSU-DLCL2, WSU-DLCL2/PD-L1]를 사용하여 평가되었다. 일차 백혈구를 유전적으로 구별되는 세포와 함께 공동-배양하면 동종 결정 인자가 호환되지 않고 T-세포가 활성화될 수 있다. NALM-6 및 RAJI/CD80-CD86-(+/- PD-L1) 세포를 사용하는 검정의 경우, T-세포 활성화 검정은 3명의 기증자로부터의 농축된 인간 1차 T 세포로 수행되었으며, WSU-DLCL2(+/- PD-L1) 세포를 사용한 검정은 1명의 기증자로부터의 T-세포를 사용했다.
- [0329] **REGN5837 + REGN2810 병용 치료를 테스트하기 위한 T-세포 활성화 검정에 사용된 T-세포의 분리.**
- [0330] NALM-6 및 RAJI/CD80-CD86- 세포를 사용하는 실험을 위해 CD3+ T-세포를 3명의 기증자 PBMC(555109, 555130 및 555131)로부터 분리하는 한편, 한 기증자의 PBMC(555175)를 WSU-DLCL2 세포를 사용한 검정에 사용했다. 기증자 555109의 경우 PBMC는 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 말초 혈액에서 분리되었다. 간단히 말하면, 50 ml 원뿔형 튜브에 15ml의 Ficoll-Paque PLUS를 첨가하고, 이어서 2% FBS가 함유된 PBS로 1:1로 희석된 30ml의 혈액을 그 위에 적층하였다. 400 x g에서 30분 원심 분리한 후 브레이크를 끈 상태에서 단핵 세포층을 새로운 튜브로 옮기고 2% FBS를 함유하는 PBS로 5x 희석하고 300 x g에서 8분 동안 원심 분리한다. 기증자 555130, 555131 및 555175의 경우, Stem Cell Technologies의 EasySep 직접적인 인간 PBMC 분리 키트를 사용하고 제조업체 프로토콜에 따라 건강한 기증자의 말초 혈액에서 PBMC를 분리했다. 분리된 PBMC는 10% DMSO를 포함하는 FBS에서 동결되었다. CD3+ T-세포 분리를 위해, PBMC의 냉동 바이알을 37°C 수조에서 해동하고 50 U/ml 벤조나제 뉴클레아제를 함유하는 자극 배지(10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA 및 0.01 mM BME가 보충된 X-VIVO 15 세포 배양 배지)에서 희석했다. 세포를 1200 rpm에서 10분 동안 원심 분리하고 EasySep 완충액에 재현탁하고 제조업체 프로토콜에 따라 StemCell Technologies EasySep T-세포 분리 키트를 사용하여 분리했다.
- [0331] CD28 항체로 처리된 1차 CD3⁺ T 세포에서의 IL-2 방출:
- [0332] **인간 OVCAR-3, PEO1, NALM-6, RAJI/CD80-CD86- 및 WSU-DLCL2 세포(+/- PD-L1)를 사용한 T-세포 활성화 분석**
- [0333] 자극 배지(10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA 및 0.01mM BME가 보충된 X-VIVO 15 세포 배양 배지)에 재현탁된 CD3+ T 세포를 1x10⁵ 세포/웰의 농도로 96웰 둥근 바닥 플레이트에 플레이팅했다. PD-L1(+/- PD-L1)이 있거나 없는 NALM-6, RAJI/CD80-CD86-, WSU-DLCL2 세포를 20 µg/mL(RAJI) 또는 15 µg/mL(NALM-6 및 WSU-DLCL2), 미토마이신 C로 처리하여 증식을 억제한다. 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 배양한 후, 미토마이신 C 처리된 세포를 2% FBS를 함유하는 D-PBS로 3회 세척한 후 자극 배지에 재현탁시켰다. NALM-6, RAJI/CD80-CD86- 및 WSU-DLCL2 세포(+/- PD-L1) 세포를 RAJI 및 WSU-DLCL2 세포에 대해 2.5x10⁴ 세포/웰의 최종 농도로, NALM-6 세포의 경우 5x10⁴의 최종 농도로 CD3+ T 세포를 함유하는 웰에 첨가했다. 고정된 농도의 세미플리맵 또는 비결합 IgG4^P 대조군(20nM)을 웰에 첨가하였다. WSU-DLCL2(+/- PD-L1) 세포를 사용한 검정에서 고정된 농도의 벨라타셉트(hCTLA4.hIgG1) 또는 비결합 IgG1 대조군(50nM)을 웰에 첨가했다. 이어서, REGN5837 또는 비-TAAxCD28 대조군 항체를 NALM-6(+/- PD-L1) 세포에 대한 1:4 희석 시리즈에서 3.1pM 내지 200nM으로, WSU-DLCL2 및 RAJI/CD80-CD86-(+/- PD-L1) 세포의 경우 1:6 희석 시리즈에서 0.6pM 내지 1000nM으로 적정하고 웰에 첨가하였다. 10-

점 농도 곡선의 최종점에는 REGN5837 또는 비-TAAxCD28 대조군 항체가 포함되지 않았다. 37°C, 5% CO₂에서 72 시간(WSU-DLCL2(+/- PD-L1)) 또는 96시간(NALM-6 및 RAJI/CD80-CD86(+/- PD-L1)) 동안 플레이트를 배양한 후 50 µL의 배지 상청액을 수집하여 IL-2 방출을 측정하였다.

[0334] IL-2 방출에 대해, 제조자의 프로토콜에 따라 인간 IL-2 AlphaLISA 키트를 사용하여 5 µL의 상청액을 테스트하였다. IL-2 측정은 Perkin Elmer의 다중 라벨 플레이트 판독기인 Envision에서 획득되었다. IL-2 농도를 알고 있는 표준 곡선이 포함되었으며 pg/ml 값을 도출하는 데 사용되었다.

[0335] IL-2 방출에 대해 모든 연속 희석물을 3회 시험하였다. 항체에 대한 EC₅₀ 값은 GraphPad PrismTM 소프트웨어를 사용하여 10-점 용량 반응 곡선 상에서 4-매개 변수 로지스틱 방정식에서 결정되었다. IL-2 방출의 최대 수준은 시험된 용량 범위 내에서 검출된 평균 최대 반응으로 제공된다. 추가로, WSU-DLCL2 세포를 사용한 검정에 대해 보고된 데이터에는 비-TAAxCD28 항체의 농도가 증가함에 따라 관찰된 IL-2의 감소를 포착하기 위해 1000nM 적정 항체의 부재 또는 존재에서 생성된 IL-2 값이 포함된다.

[0336] **결과 요약 및 결론:**

[0337] 1차 인간 CD3+ T 세포를 사용한 IL-2 기능 검정:

[0338] 내인성으로 CD22를 발현하는 B-세포 림프구 세포주의 존재하에 T-세포상의 CD28을 통해 공동-자극을 제공하는 항-CD22 x 항-CD28 이중 특이적 항체의 능력을 IL-2 사이토카인 생산을 측정하는 기능성 1차 CD3+ T-세포 검정에서 평가하였다.

[0339] NALM-6(+/- PD-L1)(도 5a) 또는 RAJI/CD80-CD86(+/- PD-L1)(도 5b)과 함께 배양된 T-세포에 대한 활성화 곡선을 도 5a 및 5b에 나타낸다. EC₅₀ 및 최대 IL-2 값은 NALM-6(+/- PD-L1) 세포와 함께 배양된 CD3+ T-세포에 대해서는 표 23A에, 20nM 고정된 hIgG4^P 이소형 대조군 또는 세미플리맵의 존재하에 RAJI/CD80-CD86(+/-PD-L1)와 함께 배양된 CD3+ T-세포에 대해서는 표 23B에 요약되어 있다. WSU-DLCL2(+/- PD-L1) 세포와 함께 배양된 CD3+ T-세포의 경우 활성화 곡선이 도 4에 나와 있다. EC₅₀ 및 IL-2 값(0nM 또는 1000nM REGN5837 또는 비-TAAxCD28에 대해 보고됨)이 20nM 고정된 hIgG4^P 이소형 대조군 또는 세미플리맵의 존재, 및 50nM 고정된 hIgG1 이소형 대조군 또는 CTLA-4 수용체인 벨라타셉트의 존재하에 WSU-DLCL2(+/- PD-L1) 세포와 함께 배양된 T-세포의 경우 표 24에 요약되어 있다.

[0340] 인간 1차 T 세포 및 동종 B-세포 림프구 세포주 RAJI/CD80-CD86- 및 NALM-6의 존재하에, REGN5837은 IL-2 방출의 농도 의존적 증가를 매개하였다. 비-TAAxCD28 대조군 항체는 높은 항체 농도에서 IL-2를 약간 증가시킨다. RAJI/CD80-CD86- 또는 NALM-6 세포 상에 PD-L1이 없는 경우, 20nM 세미플리맵의 추가는 IL-2 방출에 영향을 미치지 않는다. PD-L1을 발현하는 RAJI/CD80-CD86- 또는 NALM-6 세포의 존재하에, 비-PD-L1 발현 세포와 함께 배양된 T-세포에 비해 REGN5837 단독 처리에 대한 반응으로 방출되는 최대 IL-2는 감소한다. 세미플리맵의 첨가는 NALM-6/PD-L1 세포를 갖는 조건에서 REGN5837 매개 IL-2 방출을 최소한으로 향상시키는 반면, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1 세포의 존재 하에서의 IL-2 방출은 PD-L1이 없이 RAJI/CD80-CD86- 세포를 갖는 조건에서 관찰된 수준으로 크게 향상시킨다.

[0341] 인간 1차 T-세포 및 동종 B-세포 림프구 세포주 WSU-DLCL2의 존재하에, IL-2 방출의 농도 의존적 증가는 관찰되지 않았다. 반대로 비-TAAxCD28 대조군 항체는 농도 의존적 방식으로 IL-2 방출을 감소시키는 것으로 관찰되었다. CD28 리간드를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 NALM-6 및 RAJI/CD80-CD86- 세포와 달리, WSU-DLCL2 세포주는 CD28 리간드를 발현하는 것으로 알려져 있다. REGN5837의 CD28 결합 아암, 따라서 비-TAAxCD28 항체의 CD28 아암이 CD28에 대한 결합을 위해 CD28 리간드와 경쟁하는 것으로 알려져 있으므로, 비-TAAxCD28 대조군 항체는 WSU-DLCL2 세포에서 발현된 CD28 리간드에 의한 CD28 활성화를 차단하여 IL-2 방출을 감소시킨다. 비-TAAxCD28 대조군과 달리 IL-2는 CD28 리간드와 유사하게 행동하여 본질적으로 대체할 수 있는, CD22 결합 아암을 통해 WSU-DLCL2 세포에 고정하는 능력으로 인해 REGN5837에 의해 감소되지 않는다. WSU-DLCL2/PD-L1 세포의 존재하에 PD-L1을 발현하지 않는 WSU-DLCL2 세포에 비해 기초 IL-2 방출이 감소한다. 세미플리맵이 없는 상태에서 REGN5837만 추가하면 IL-2 방출이 약간 향상된다. 20nM 세미플리맵을 추가하면 기초 활성이 향상되고 REGN5837의 용량적경으로 약간 더 향상될 수 있으므로 단독으로 두 처리를 하는 것에 비해 REGN5837과 세미플리맵의 조합에서 최대 IL-2 방출이 더 높아진다. WSU-DLCL2 세포에서 관찰된 바와 같이, 비-TAAxCD28의 존재하에 WSU-DLCL2/PD-L1 세포를 배양하면 세미플리맵 또는 hIgG4^P 이소형 대조군이 존재하는 지에 관계없이 IL-2 수준을 감소시킨다. CD28 리간드 발현이 REGN5837의 영향을 차폐하는 데 미치는 영향을 추가로 조사하기 위해 가용

성 CTLA-4 수용체 벨라타셉트 또는 hIgG1 일치 이소형 대조군을 50nM로 추가했다. 벨라타셉트는 CD28 리간드, CD80 및 CD86에 대한 높은 친화도로 결합하고 이들의 상호 작용을 차단하여 CD28의 활성화를 차단한다. 50nM 벨라타셉트의 존재하에서, CD28 리간드가 CD28에 결합하고 공동 자극 신호를 제공할 수 없기 때문에 기초 IL-2 방출이 극적으로 감소한다. 이러한 조건 하에서 REGN5837은 여전히 CD28에 관여할 수 있고 IL-2 방출의 용량 의존적 향상에 의해 언급된 공동 자극을 제공할 수 있다. 20nM 세미플리맵의 첨가는 그 자체로 벨라타셉트의 존재 하에서 IL-2 방출을 향상시키지는 않지만, REGN5837의 용량을 증가시켜 세미플리맵과 조합하면 PD-L1를 과 발현하도록 조작된 세포의 존재 하에 REGN5837 단독에 비해 최대 IL-2 방출을 증가시킨다.

표 23A: REGN5837과 세미플리맵의 조합은 PD-L1을 발현하도록 조작된 NALM-6 세포에서 REGN5837단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다

1차 T-세포 + NALM-6 (+/- PD-L1)				최대 [pg/ml]	EC ₅₀ [M]
기증자 555109 T-세포	NALM-6	REGN5837	세미플리맵	199.50	8.22E-10
			hlgG4 ^P	217.80	7.54E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	21.71	ND
			hlgG4 ^P	24.74	ND
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	세미플리맵	68.34	7.42E-10
			hlgG4 ^P	40.26	6.70E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	10.07	ND
			hlgG4 ^P	11.80	ND
기증자 555130 T-세포	NALM-6	REGN5837	세미플리맵	281.00	8.31E-10
			hlgG4 ^P	261.30	7.18E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	27.51	ND
			hlgG4 ^P	25.18	ND
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	세미플리맵	123.20	7.50E-10
			hlgG4 ^P	75.29	8.72E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	10.29	ND
			hlgG4 ^P	3.31	ND
기증자 555131 T-세포	NALM-6	REGN5837	세미플리맵	294.20	9.96E-10
			hlgG4 ^P	264.90	1.05E-09
		비-TAA x CD28	세미플리맵	21.13	ND
			hlgG4 ^P	25.45	ND
	NALM-6/ hPD-L1	REGN5837	세미플리맵	90.17	8.57E-10
			hlgG4 ^P	50.99	8.95E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	11.35	ND
			hlgG4 ^P	6.57	ND

ND: 농도 의존적 반응이 관찰되지 않았기 때문에 결정되지 않음.

[0342]

표 23B: REGN5837과 세미플리맵의 조합은 PD-L1을 발현하도록 조작된 RAJI/CD80⁺CD86⁺ 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다

1차 T-세포 + RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ (+/- PD-L1)				최대 [pg/ml]	EC ₅₀ [M]
기증자 555109 T-세포	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	세미플리맵	1258.00	1.41E-10
			hlgG4 ^P	1149.00	1.28E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	503.70	NC
			hlgG4 ^P	454.90	9.49E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	세미플리맵	910.70	1.97E-10
			hlgG4 ^P	230.60	3.86E-11
		비-TAA x CD28	세미플리맵	518.80	NC
			hlgG4 ^P	84.41	8.20E-08
기증자 555130 T-세포	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	세미플리맵	791.90	9.31E-11
			hlgG4 ^P	711.60	5.04E-11
		비-TAA x CD28	세미플리맵	489.70	NC
			hlgG4 ^P	370.00	NC
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	세미플리맵	664.30	6.15E-11
			hlgG4 ^P	182.10	5.24E-11
		비-TAA x CD28	세미플리맵	426.80	NC
			hlgG4 ^P	85.29	7.24E-08
기증자 555131 T-세포	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	세미플리맵	437.40	1.28E-10
			hlgG4 ^P	426.10	9.31E-11
		비-TAA x CD28	세미플리맵	162.20	5.97E-08
			hlgG4 ^P	156.60	7.92E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	세미플리맵	406.00	3.16E-10
			hlgG4 ^P	132.40	2.58E-10
		비-TAA x CD28	세미플리맵	94.94	NC
			hlgG4 ^P	37.24	NC

NC: 데이터가 4-매개 변수 로지스틱 방정식에 맞지 않기 때문에 계산되지 않음.

[0343]

표 24: REGN5837과 세미플리맵의 조합은 PD-L1을 발현하는 WSU-DLCL2 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다

1차 T-세포 + WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)				100nM에서 IL-2 [pg/ml]	0nM에서 IL-2 [pg/ml]	EC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
기증자 555175 T- 세포	WSU-DLCL2	REGN5837	세미플리맵	2276.35	3217.69		ND
			hlgG4 ^P	2284.28	2482.54		ND
		비-TAA x CD28	세미플리맵	609.01	3299.38		4.81E-09
			hlgG4 ^P	616.95	3552.86		8.54E-09
	WSU-DLCL2/PD-L1	REGN5837	세미플리맵	723.06	642.64	NC	
			hlgG4 ^P	209.84	124.81	1.39E-12	
		비-TAA x CD28	세미플리맵	66.17	444.51		2.87E-09
			hlgG4 ^P	15.47	82.91		NC
기증자 555175 T- 세포 + 50nM 벨라타셀트	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	세미플리맵	2061.29	112.64	6.95E-13	
			hlgG4 ^P	1809.89	71.65	1.45E-12	
		비-TAA x CD28	세미플리맵	502.33	164.55	NC	
			hlgG4 ^P	402.66	109.02	NC	
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	세미플리맵	792.06	22.40	1.59E-12	
			hlgG4 ^P	238.23	5.19	3.39E-12	
		비-TAA x CD28	세미플리맵	128.69	24.44	NC	
			hlgG4 ^P	14.49	1.72	NC	

ND: 농도 의존적 반응이 관찰되지 않았기 때문에 결정되지 않음.

NC: 데이터가 4-매개 변수 로지스틱 방정식에 맞지 않기 때문에 계산되지 않음.

[0344]

[0345]

[0346]

[0347]

실시예 11. REGN1979의 존재 및 부재하에 REGN5837 투여의 항종양 효능

도입

REGN5837은 CD22⁺ B 세포를 CD28⁺ T 세포와 가교시킴으로써 B 세포 NHL(예를 들어, DLBCL)을 표적화하도록 설계된 인간 IgG4 기반 이중 특이적 항체(bsAb)이다. CD20xCD3 이중 특이적 항체(bsAb) REGN1979와 같이, "신호

1"을 제공하는 다른 제제(예: TCR 또는 CD3 클러스터링을 통해 1차 T-세포 자극을 통해 신호 전달)와 조합하여 REGN5837에 의해 제공되는 "신호 2"는 증폭된 T 세포 활성화 및 B 세포 NHL의 T 세포 매개 사멸을 제공하여 CD20xCD3에 대한 반응을 심화시킬 수 있다. 더욱이, REGN5837은 CD20xCD3 단일 요법에 반응하지 않는 환자에서 증가된 효능을 제공할 수 있다.

[0348] 아래에 기술된 연구는 준-유효 용량의 CD20xCD3 bsAb(REGN1979)의 존재 또는 부재하에 8일 동안 B-세포 백혈병 종양이 확립된 면역 결핍 NSG 마우스에 투여된 CD22xCD28 bsAb REGN5837의 항 종양 효능을 평가했다.

[0349] 간단히, 마우스(그룹당 n = 6 내지 9)를 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로 복강 내(IP) 생착하고 12일 후 루시페라제를 발현하도록 조작되어 생물 발광 영상화를 가능하게 한(NALM-6-luc), 인간 NALM-6 B-세포 백혈병 세포를 정맥 내(IV) 이식하였다. REGN1979의 고정된 0.04 mg/kg 용량과 조합된 0.04, 0.4 및 4 mg/kg의 REGN5837의 항종양 효능을 REGN5837 및 REGN1979 단일 요법 및 비가교 IgG4^{P-PVA} 대조군 bsAbs와 비교했다. 마우스는 NALM-6-luc 세포 이식 후 8, 15 및 22일에 복강 내(IP) 주사로 항체 투여량을 받았다. 종양 부담은 실험 기간 동안 일주일에 두 번 평가되었다.

[0350] **재료 및 방법**

[0351] **인간 유래 세포주**

[0352] NALM-6-luc: NALM-6 세포주는 19세 남성 환자로부터 단리된 급성 림프 모구성 백혈병 세포주(DSMZ, cat # ACC 128)이며; 이 주는 EF1a-루시페라제-2A-GFP-퓨로 렌티바이러스(GenTarget)로 변형되어 생체 내 종양 세포 성장의 영상화를 용이하게 했다.

[0353] PBMC: 인간 PBMC는 ReachBio, Cat. # 0500-401, 기증자 # 0180905(종양 성장 실험) 및 0180621(혈청 항체 실험)으로부터 얻었다.

[0354] **실험 설계**

[0355] **테스트 시스템**

[0356] 암컷 NSG 마우스(8 내지 9주령)를 모든 실험에 사용했다. 모든 마우스는 인간 PBMC로 IP 생착된 후, 생착 12일 후 NALM-6-luc B-세포 백혈병 세포를 IV 이식하였다. 실험 설계는 표 25에 자세히 설명되어 있다. 종양 성장은 연구 기간 동안 일주일에 두 번 생물 발광 영상화에 의해 모니터링되었다. 모든 실험에서 마우스는 표준 조건 하에서 Regeneron 동물 시설에 보관되었다. 모든 실험은 Regeneron의 Institutional Animal Care and Use Committee의 지침에 따라 수행되었다.

[0357] **NSG 마우스의 생착**

[0358] 암컷 면역 결핍 NSG 마우스는 4×10^7 인간 PBMC로 IP 생착되었다. T 세포 수준은 생착 11일 후에 역 안와 혈액 수집 및 유세포 분석에 의해 전혈의 모든 살아있는 세포에서 인간 CD45⁺ 세포의 백분율 평가에 의해 확인되었다; 생착 수준은 0.16 내지 16% hCD45⁺ 세포 범위였다. 이어서, PBMC가 생착된 NSG 마우스에 NALM-6-luc 세포를 이식했다.

[0359] **NALM-6-Luc 배양 조건 및 종양 이식**

[0360] NALM-6 세포주는 EF1a-루시페라제-2A-GFP-퓨로 렌티바이러스(GenTarget)로 변형되어 생체 내 종양 세포 성장의 영상화를 용이하게 했다. 세포주는 PSG(페니실린, 스트렙토마이신 및 글루타민)가 보충된 10% FBS를 갖는 RPMI에서 퓨로마이신 선택하에 유지되었다.

[0361] NALM-6-luc 세포를 원심 분리에 의해 수집하고 2.5×10^7 세포/mL에서 PBS에 재현탁시켰다. NSG 마우스에 PBMC를 생착한 후 12일째에 NALM-6-luc 세포 $200 \mu\text{l}$ (5×10^6 세포)를 IV 주사하였다.

[0362] **종양 측정을 위한 항체 투여**

[0363] 시험 물품 또는 대조군으로 투여하기 전에, 마우스를 종양 부담 및 T-세포 생착 수준에 따라 계층화된 그룹으로 할당하였다. 항체(REGN5837, REGN1979, REGN5671 [Non-TAAxCD28 비-가교 대조군 bsAb] 또는 H4sH17664D [비-TAAxCD3 비-가교 대조군 bsAb])를(생체 내 효능을 위해) 이식 후 8, 15 및 22일에 단일 요법으로 또는 조합하여 표 25에 명시된 투여량으로 IP 주사 투여했다.

표 25: 종양 성장 평가를 위한 실험 설계

그룹	그룹당 N	REGN5837 또는 비- TAAxCD28 의 투여량	REGN1979 또는 비- TAAxCD3 의 투여량	Ab 투여 일정 (IP 주사)	종량 부피 측정일
REGN5837 + REGN1979	8	4 mg/kg	0.04 mg/kg	NALM-6-luc 세포의 이식 후 8, 15, 및 22 일	이식 후 6, 10, 14, 17, 20, 및 23 일
REGN5837 + REGN1979	8 ^a	0.4 mg/kg			
REGN5837 + REGN1979	9	0.04 mg/kg			
REGN5837 + Non-TAAxCD3	8 ^a	4 mg/kg			
Non-TAAxCD28 + REGN1979	8	4 mg/kg			
Non-TAAxCD28 + Non-TAAxCD3	9 ^a	4 mg/kg			

^a 이 그룹에서 마우스 한 마리는 실험 중에 초기에 사망하여 제외되었다. 이러한 사망은 종양 부담으로 인한 것이 아니며 대조군에서 한 마리의 마우스가 죽었기 때문에 시험 물질 투여와 관련이 없을 가능성이 높았다.

[0364]

[0365]

종양 측정 및 지정 종점

[0366]

NALM-6-luc 종양이 이식된 마우스를 IVIS Spectrum 기기를 사용하여 일주일에 두 번 영상화하고 데이터를 Living Image 소프트웨어를 사용하여 분석했다. 영상화 전에 마우스에 루시페린 기질을 IP 주사했다. 10분 후, 마우스를 이소플루란으로 마취하고 생물 발광(총 플럭스, 초당 광자 [p/s]로 표현)을 정량화했다. 실험은 마우스가 IACUC 표준에 따라 이식편 대 숙주 질환(GVHD)(≥20% 체중 감소로 평가됨)의 징후를 보이기 시작했을 때 종료되었다.

[0367]

종양 성장의 통계 분석

[0368]

시간에 따른 종양 부피의 결과는 다중 비교를 위한 Tukey 사후 테스트에 이어 분산의 양방향 분석(ANOVA)을 사용하여 분석되었다. 차이는 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. GraphPad Prism 소프트웨어 (버전 8)를 사용하여 통계 분석을 수행했다.

[0369]

결과

[0370]

REGN1979의 존재 및 부재하에 REGN5837 투여의 항종양 효능

[0371]

NALM-6-luc 종양을 보유한 면역 결핍 NSG 마우스는 상기 기재된 바와 같이 항체 또는 비-가교 대조군의 IP 주사를 받았다.

[0372]

종양-보유 마우스에서, 0.04 mg/kg REGN1979의 존재하에 0.04, 0.4 및 4 mg/kg REGN5837로 처리하면 비-가교 대조군 bsAbs(비-TAAxCD28 및 비-TAAxCD3 bsAbs)와 비교하여, 이식 후 23일째에 종양 성장의 통계적으로 유의한 억제력을 가져왔다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$)(도 6). 이식 후 20일째에 0.4 및 4 mg/kg 그룹에서 종양 성장의 유의한 억제가 관찰되었다(두 그룹 모두 $p < 0.05$). REGN5837(4 mg/kg) 또는 REGN1979(0.04 mg/kg) 단일 요법 모두 비-가교 대조군 bsAbs에 비해 종양 성장을 유의하게 감소시키지 않았다. REGN5837 + REGN1979 병용 투여와 bsAb 단일 요법 사이의 차이는 통계적 유의성에 도달하지 않았다. 투여 기간 내내 비-가교 대조군 bsAbs를 투여했을 때 급속한 종양 성장이 관찰되었으며, 모든 마우스는 23일에 안락사되었다. 모든 그룹에서 GVHD는 실험이 끝날 때 적어도 한 마리의 마우스에서 관찰되었다(≥20% 체중 감소로 평가됨).

[0373]

상이한 세트의 마우스를 사용하는 독립적인 실험에서, 혈청 항체 농도를 결정하기 위해 다음 시점에서 혈액을 수집하였다: 7일째에 투여 1 및 4시간 후, 14일째 및 21일째에 투여 1시간 전 및 투여 4시간 후, 그리고 29일째에 한 번. 투여 기간 동안 혈청 내 항체의 최저 농도는 14일째 및 21일째에 투여하기 1시간 전으로 결정되었다. 0.04 mg/kg REGN1979의 존재하에 0.04, 0.4 및 4 mg/kg의 REGN5837 투여량의 투여는 각각 정량 한계(BLQ) 미만 내지 0.1, 1.6 내지 2.3, 및 16.5 내지 21.1 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 혈청 내 REGN5837의 최저 농도와 연관되었다. 혈청 내 REGN1979의 최저 농도는 모든 경우에서 BLQ였다(데이터는 표시되지 않음).

- [0374] **결론**
- [0375] 0.04 mg/kg REGN1979의 존재하에 0.04, 0.4 및 4 mg/kg REGN5837의 투여는 마우스에서 NALM-6 B-세포 백혈병 종양 성장을 억제하는 데 효과적이었다. 대조군에 비해 4 mg/kg REGN5837 또는 0.04 mg/kg REGN1979 단일 요법에서는 유의한 종양 억제가 관찰되지 않았다.
- [0376] **실시예 12: CD22 세포 + 인간 PBMC +/- CD22xCD28 공동 자극 이중 특이적 항체(고정 CD22xCD28, 적정 CD20xCD3)에 대한 FACS 기반 세포 독성**
- [0377] **재료 및 방법**
- [0378] CD20xCD3 표적 사멸의 CD22xCD28 향상은 Nalm6 또는 WSU-DLCL2 세포를 표적화하는 96시간 세포 독성 검정으로 평가되었다. 간단히 말해서, 인간 PBMC를 1×10^6 세포/mL로 보충된 RPMI 배지에 플레이팅하고 부착성 대식세포, 수지상 세포 및 일부 단핵구를 고갈시켜 림프구를 풍부하게 하기 위해 37°C에서 밤새 배양했다. 다음날 Nalm6 또는 WSU-DLCL2 세포를 1uM의 형광 추적 염료 CFDA-SE로 표지하고 부착성 세포가 고갈된 나이브 PBMC를 1uM의 형광 추적 염료 CellTrace Violet으로 표지했다. 표지된 표적 세포 및 PBMC(Nalm6의 경우 이펙터/표적 세포 4:1 비율, WSU-DLCL2의 경우 5:1)를 2.5ug/ml(16.7nM)에서 고정된 농도의 CD22xCD28 REGN5837을 포함하거나 포함하지 않고 CD20xCD3 이중 특이적 항체 REGN1979(농도 범위: 5 nM 내지 0.64pM)의 연속 희석액과 공동 배양했다. Nalm6 세포를 표적으로 하는 검정에서, 2.5ug/ml(16.7nM)의 일정한 양의 CD22xCD28 REGN5838, 1-아암 대조군 CD28 이중 특이적(REGN5678) 또는 IgG4 이소형 대조군(H4sH10154P3)을 첨가하였다. 37°C에서 96시간 동안 배양한 후, 세포를 플레이트에서 수확하고 FACS BD LSRFortessa-X20에서 FACS로 분석했다. FACS 분석을 위해, 세포를 고정 가능한 Live/Dead Far Red 반응성(Invitrogen) 염료로 염색했다. FACS 분석 직전에 20,000개의 계수한 비드를 각 웰에 추가하고 각 샘플에 대해 10,000개의 비드를 수집했다. 사멸 특이성 평가를 위해, 세포는 살아 있는 CFDA-SE 표지된 집단으로 게이팅하였다. 살아 있는 집단의 백분율 또는 수를 기록하고 생존 계산에 사용했다.
- [0379] T 세포 활성화는 CD2, CD4, CD8 및 CD25에 직접 접합된 항체와 함께 세포를 배양하여 평가했다. CD25를 발현하는 CD8+ 세포의 백분율은 T 세포 활성화의 척도로 보고되었다. 또한 T 세포가 증식함에 따라 CellTraceViolet이 희석되어 FACS로 측정했을 때 MFI가 낮아진다. 따라서 T 세포 증식은 CD8+ T 세포에서 CellTraceViolet의 MFI 감소 또는 CellTraceViolet MFI가 감소된 CD8+ 세포의 백분율로 보고되었다.
- [0380] 이 검정으로부터의 상정액은 사이토카인 수준의 분석을 위해 수집되었다. IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 및 IL-2의 농도는 제조업체의 지침에 따라 Cytometric Bead Array(CBA) 키트를 사용하여 분석되었다. 사이토카인 수준은 키트 표준에 의해 생성된 곡선에서 보간되었으며 pg/mL로 보고되었다. 표적 세포 사멸, T 세포 활성화, 증식 및 사이토카인 수준 및 최대 사이토카인 수준에 대한 EC50 값은 Prism 소프트웨어에서 4-매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다.
- [0381] **결과, 요약 및 결론:**
- [0382] 항-CD20xCD3 이중 특이적 항체 REGN1979는 공동 자극 CD22xCD28 항체 또는 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체와 조합하여 인간 CD20 및 CD22를 발현하는 표적 세포를 사멸시키기 위해 나이브 인간 T 세포를 유도하는 능력에 대해 시험되었다.
- [0383] REGN1979는 인간 T 세포를 활성화하고 지시하여 Nalm6(도 7) 또는 WSU-DLCL2(도 8) 세포를 용량 의존 방식으로 사멸시켰다. 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이적 항체를 REGN1979에 첨가하면 REGN1979의 세포 독성 효능(EC50)이 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체를 사용하는 REGN1979와 비교했을 때 Nalm6 세포에 대해 4.7 내지 5.2배 향상되거나(표 26), 또는 REGN1979 단독과 비교했을 때 WSU-DLCL2 세포에 대해 17.5배 향상되었다(표 27).
- [0384] REGN1979에 의해 매개된 관찰된 표적 세포 용해는 각각 CD8+ 세포에 대한 CD25 상향 조절 또는 CellTrace 바이올렛 희석에 의해 측정된 T 세포 활성화 및 증식과 관련이 있었다(도 7, 도 8). REGN1979에 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이성 항체를 추가하면 REGN1979 유도 T 세포 활성화 및 증식의 효능이 1-아암 CD28 또는 이소형 대조군 항체를 사용하는 REGN1979와 비교할 때 Nalm6 세포의 존재 하에서 각각 2.3 내지 2.6배 및 5.4 내지 7.1배 향상되거나(표 26), 또는 REGN1979 단독과 비교할 때 WSU-DLCL2 세포의 존재 하에서 8.2 및 16.1 배 향상되었다(표 27).
- [0385] 인간 PBMC 및 WSU-DLCL2 세포를 사용한 검정에서 REGN1979는 인간 사이토카인의 방출을 유도했다. REGN1979로

관찰된 시토카인 방출은 REGN1979 단독으로 유도된 사이토카인 방출과 비교하여 고정된 농도의 CD22xCD28 존재 하에서 향상되었다(표 28, 도 9).

[0386]

요약하면, 공동 자극은 대조군 항체와 조합하여 또는 단독으로 CD20xCD3으로 관찰된 것과 비교할 때 표적화된 세포 독성, T 세포 활성화 및 사이토카인 방출의 효능을 증가시켰다.

표로 작성한 데이터 요약:

표 26: Nalm6 표적을 사용한 세포 독성 및 T 세포 활성화에 대한 EC50 값 (1 회 실험)

Ab	세포 사멸		T 세포 활성화 (CD8+/CD25+)		T 세포 증식 (CD8+ 세포의 CellTrace MFI)	
	EC50 [M]	IgG4s 와 비교한 배수 EC50	EC50 [M]	IgG4s 와 비교한 배수 EC50	EC50 [M]	IgG4s 와 비교한 배수 EC50
REGN5837	3.89E-11	4.7	4.05E-11	2.3	3.83E-11	5.4
REGN5838	3.57E-11	5.2	3.60E-11	2.6	2.87E-11	7.1
1-팔 CD28	1.88E-10	1.0	9.20E-11	1.0	1.97E-10	1.0
IgG4s 이소	1.84E-10	1.0	9.28E-11	1.0	2.05E-10	1.0

[0387]

표 27: WSU-DLCL2 표적을 사용한 세포 독성 및 T 세포 활성화에 대한 EC50 값 (2 회 실험의 평균)

Ab	세포 사멸		T 세포 활성화 (CD8+/CD25+)		T 세포 증식 (CD8 분할 %)	
	EC50 [M]	REGN1979 단독과 비교한 배수 EC50	EC50 [M]	REGN1979 단독과 비교한 배수 EC50	EC50 [M]	REGN1979 단독과 비교한 배수 EC50
REGN5837	1.39E-13	17.5	1.28E-12	8.2	7.10E-13	16.1
Ab 없음	2.33E-12	1.0	1.22E-11	1.0	1.23E-11	1.0

[0388]

표 28: WSU-DLCL2 세포 독성 분석으로부터의 사이토카인 방출 (2 회 실험의 평균)

		REGN5837	Ab 없음
IL-2	EC50	1.82E-11	5.85E-10
	최대 (pg/ml)	3022	564
	배수 (최대)	6.4	1.0
IL-4	EC50	1.24E-11	8.69E-11
	최대 (pg/ml)	65.035	34.855
	배수 (최대)	1.9	1.0
IL-6	EC50	2.31E-11	8.66E-11
	최대 (pg/ml)	194.36	116.085
	배수 (최대)	1.8	1.0
IL-10	EC50	1.35E-10	1.30E-10
	최대 (pg/ml)	686.15	520.7
	배수 (최대)	1.3	1.0
TNFa	EC50	3.84E-11	2.09E-10
	최대 (pg/ml)	327.85	84.55
	배수 (최대)	4.1	1.0
IFNg	EC50	1.06E-10	2.78E-10
	최대 (pg/ml)	470.7	195.5
	배수 (최대)	2.4	1.0
IL-17a	EC50	2.56E-10	2.74E-10
	최대 (pg/ml)	19.775	15.091
	배수 (최대)	1.4	1.0

[0389]

- [0390] 실시예 13: NHL + 인간 PBMC +/- CD22xCD28 자극에 대한 FACS 기반 세포 독성(고정 CD22xCD28, 적정 CD20xCD3)
- [0391] 실험 절차
- [0392] CD20xCD3 표적 사멸의 CD22xCD28 향상은 인간 기질 세포(HS-5)의 존재하에 자가 PBMC로 1차 NHL 환자 생검으로부터 단리된 NHL 세포를 표적화하는 96시간 세포 독성 검정으로 평가되었다. 간단히 말해서, HS-5 세포는 평평한 바닥 96웰 플레이트에 웰당 5000개의 세포를 플레이팅하고 밤새 배양하였다. 다음 날, NHL 환자의 PBMC를 1uM의 형광 추적 염료 CellTrace Violet으로 표지하였다. 골수 및 표지된 PBMC(이펙터/표적 세포 10:1 비율)를 기질 세포와 함께 웰에 플레이팅하고, 37°C에서 96시간 동안 CD20xCD3 이중 특이적 항체 REGN1979(농도 범위: 6.7 nM 내지 10.7 pM)의 연속 희석액 및 2.5 ug/ml(16.7nM)의 고정 농도의 CD22xCD28 공동 자극 분자 REGN5837 또는 1-아암 대조군 CD28 이중 특이성(REGN5678)과 함께 공동 배양했다. 세포를 플레이트로부터 수확하고 FACS BD LSRFortessa-X20상에서 FACS에 의해 분석하였다. FACS 분석을 위해, 세포를 항체 각테일(CD45, CD19, CD4, CD8, CD25) 및 Flexible Live/Dead 근적외선 반응성 염료(Invitrogen)로 염색했다. FACS 분석 직전에 20,000개의 계수한 비드를 각 웰에 추가하고 각 샘플에 대해 10,000개의 비드를 수집했다. 사멸 특이성 평가를 위해, 표적 세포는 살아 있는 CD45+ 바이올렛 음성 CD19+ 집단으로 게이팅하였다. 생존율은 처리된 웰의 표적 세포의 수를 기반으로 계산되고 처리되지 않은 웰의 표적 세포의 수로 정규화되었다.
- [0393] T 세포를 살아 있는 CD45+ 바이올렛 표지된 CD4+ 또는 CD8+ 집단으로 게이팅하였다. CD25를 발현하는 CD8+ 및 CD4+ 세포의 백분율을 T 세포 활성화의 척도로 보고했다. 또한 T 세포가 증식함에 따라 CellTraceViolet이 희석되어 FACS로 측정했을 때 MFI가 낮아진다. 따라서 T 세포 증식은 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 CellTraceViolet의 MFI의 감소로 보고되었다.
- [0394] 표적 사멸 및 T 세포 활성화 및 증식에 대한 EC50 값은 Prism 소프트웨어에서 4-매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다.
- [0395] 결과 요약 및 결론:
- [0396] 항-CD20xCD3 이중 특이적 항체 REGN1979는 공동 자극 CD22xCD28 항체 또는 1-아암 CD28 대조군 항체와 조합하여 환자 골수로부터의 NHL 세포를 사멸시키기 위해 나이브 자가 T 세포를 유도하는 능력에 대해 테스트되었다.
- [0397] REGN1979는 인간 T 세포를 활성화하고 지시하여 용량 의존적 방식으로 NHL을 고갈시켰다. REGN1979에 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이적 항체를 첨가하면 REGN1979의 세포 독성 효능(EC50)이 1-아암 CD28 대조군 항체를 사용하거나 공동자극(costim)이 없는 대조군 REGN1979와 비교할 때 2.3배 및 3.5배 향상되었다(표 29).
- [0398] REGN1979에 의해 매개된 관찰된 표적 세포 용해는 각각 CD8+ 및 CD4+ 세포에 대한 CD25 상향 조절 또는 CellTrace 바이올렛 희석에 의해 측정된 바와 같이 T 세포 활성화 및 증식과 관련이 있었다. REGN1979에 고정된 농도의 CD22xCD28 이중 특이적 항체를 추가하면 REGN1979 유도 T 세포 활성화 및 증식의 효능이 1-아암 CD28을 사용하거나 공동자극(costim)이 없는 대조군 REGN1979와 비교할 때 각각 2.8 내지 4.2배 및 2.8 내지 4.8배 향상되었다(표 29 및 도 10).
- [0399] 요약하면, 공동 자극은 대조군 항체와 조합된 CD20xCD3으로 관찰된 것과 비교할 때 표적 세포 독성 및 T 세포 활성화의 효능을 증가시켰다.

표로 작성한 데이터 요약:

표 29: 세포 독성 및 T 세포 활성화에 대한 EC50 값

Ab	세포 사멸 EC50 [M]	T 세포 활성화 (CD25+) EC50 [M]		T 세포 분할 (T 세포의 CellTrace MFI) EC50 [M]	
		CD8 T 세포	CD4 T 세포	CD8 T 세포	CD4 T 세포
REGN5837	7.81E-12	1.35E-11	6.96E-12	1.52E-11	8.54E-12
1-팔 CD28	1.80E-11	4.01E-11	2.95E-11	4.71E-11	4.13E-11
공동자극(costim) 없음	2.72E-11	3.77E-11	2.74E-11	4.27E-11	3.93E-11

[0400]

- [0401] 실시예 14. 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL) 모델에서 REGN5837 단독으로, 또한 REGN1979와 조합했을 때의 항종양 효능의 시험관 내 특성화 및 생체 내 평가

[0402] **재료 및 방법-연구 소개 및 결과 요약**

[0403] 시험관 내 및 생체 내 연구를 수행하여 다음을 평가하였다:

[0404] (1) $CD28^+$ T 세포를 $CD22^+$ 표적 세포와 가교시킴으로써 1차 T 세포의 활성화를 향상시키는 REGN5837의 능력. T-세포 활성화는 표적 세포에 대한 세포 독성, T-세포 활성화의 세포 표면 마커의 발현, T-세포 증식 및 사이토카인 방출 수준을 판독 값으로 사용하여 평가되었다. 실험은 T 세포와 $CD20^+$ 표적 세포에서 CD3 분자를 연결하고 T-세포 활성화를 유도하는 $CD20 \times CD3$ bsAb인 REGN1979의 존재 또는 부재 하에서 수행되었다.

[0405] (2) 0.4 또는 4 mg/kg의 REGN1979의 존재 또는 부재하에서의, DLBCL 종양을 갖는 면역 결핍 NSG 마우스에 투여된 $CD22 \times CD28$ bsAb REGN5837의 항종양 효능.

[0406] REGN5837 및 REGN1979는 인간 DLBCL 세포주(WSU-DLCL2), 후기 T-세포 활성화($CD25$)의 마커의 상향 조절, T-세포 증식 및 1차 인간 T 세포로부터의 사이토카인 방출에 대한 REGN1979 매개 T-세포 독성에 대한 REGN5837의 효과를 평가하기 위해 농도 범위에서 조합하여 테스트되었다. REGN5837은 T-세포 세포 독성, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포에서의 $CD25$ 세포 표면 발현, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 매개하는 REGN1979의 효능을 농도 의존적 방식으로 강화했다. 유사하게, REGN5837은 사이토카인 방출을 매개하는 REGN1979의 효능을 농도 의존적 방식으로 향상시켰다. 77.2pM 내지 100nM 범위의 농도에서 REGN5837은 표적 세포에 대한 REGN1979 매개 T-세포 독성의 효능을 증가시켰다; 77.2pM 내지 2.78nM 범위의 농도에서 REGN5837은 REGN1979 매개 T-세포 활성화 및 증식의 효능을 증가시켰지만 REGN5837의 농도를 더 높여도 REGN1979의 효능을 더 이상 증가시키지 않았다(표 30). REGN1979 매개 표적 세포 사멸 및 T-세포 증식의 최대량은 REGN5837의 첨가시 실질적으로 증가하지 않은 반면, REGN5837은 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 및 IL-17 α 의 REGN1979 매개 방출의 최대 수준을 농도 의존적으로 향상시켰다.

[0407] 면역 결핍 NSG 마우스(그룹당 n = 6 내지 7)에 1:1 비율의 WSU-DLCL2 세포 및 인간 PBMC를 피하(SC) 이식하였다. 0.4 또는 4 mg/kg 용량의 REGN1979와 함께 1 mg/kg에서 REGN5837의 항종양 효능을 REGN5837 및 REGN1979 단일 요법, 및 비가교 IgG4^{P-PVA} 대조군 bsAbs와 비교했다. 마우스는 WSU-DLCL2 세포 이식 후 1, 8 및 15일에 복강 내(IP) 주사에 의해 항체를 투여 받았다. 0.4 또는 4 mg/kg REGN1979의 존재하에 1 mg/kg REGN5837로 치료한 결과, 이식 후 28일까지 REGN5837 또는 REGN1979 단일 요법, 및 비가교 대조군 bsAbs와 비교하여 WSU-DLCL2 종양 성장이 통계적으로 유의미하게 억제되었다. REGN1979 단일 요법은 종양 성장을 완만하게 억제한 반면, REGN5837 단일 요법은 비가교 대조군에 비해 효과가 없었다.

[0408] 요약하면, REGN5837 및 REGN1979가 다양한 농도에서 시험관 내에서 조합되어 테스트되었을 때, REGN5837은 $CD22^+$ WSU-DLCL2 세포의 존재하에 인간 T-세포 활성화를 매개하는 REGN1979의 효능을 향상시켰다. REGN1979-매개 사이토카인 방출의 최대 수준은 REGN5837의 존재에서 증가되었지만 세포 독성, T-세포 활성화 또는 증식은 증가하지 않았다. 생체 내에서, 0.4 또는 4 mg/kg REGN1979의 존재하에 1 mg/kg REGN5837은 REGN5837 또는 REGN1979 단일 요법을 단독으로 한 것에 비해 마우스에서 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 종양 성장을 억제하는 데 효과적이었다.

표 30: 인간 PBMC 를 사용한 REGN1979 매개 T 세포 활성화 (표적 세포에 대한 세포 독성, CD25 발현 및 T 세포 증식으로 측정됨)에 대한 REGN5837 의 효과 요약

		REGN5837 의 고정 농도					
		1.00x10 ⁻⁷	1.67x10 ⁻⁸	2.78x10 ⁻⁹	4.63x10 ⁻¹⁰	7.72x10 ⁻¹¹	0
WSU-DLCL2 세포 사멸	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	8.53x10 ⁻¹⁴	1.85x10 ⁻¹³	3.98x10 ⁻¹³	3.46x10 ⁻¹³	8.37x10 ⁻¹³	2.89x10 ⁻¹²
	최대 % 독성	81.5	79.8	80.6	87.5	82.1	83.2
	배수 변화 (EC ₅₀) ^b	33.9	15.7	7.3	8.3	3.5	1.0
CD4 ⁺ T 세포 활성화 (% CD25 ⁺)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1.16x10 ⁻¹³	8.70x10 ⁻¹⁴	7.11x10 ⁻¹⁴	1.46x10 ⁻¹³	2.08x10 ⁻¹³	9.17x10 ⁻¹³
	최대 % CD25 ⁺ 세포	94.1	95.6	94.2	91.9	91.7	92.4
	배수 변화 (EC ₅₀)	7.9		10.5	12.9	6.3	4.4 1.0
CD8 ⁺ T 세포 활성화 (% CD25 ⁺)	REGN1979 EC ₅₀ (M)	6.32x10 ⁻¹³		5.88x10 ⁻¹³	2.68x10 ⁻¹³	9.01x10 ⁻¹³	1.64x10 ⁻¹² 3.38x10 ⁻¹²
	최대 % CD25 ⁺ 세포	89		90.9	89.7	86.2	88.4 87.1
	배수 변화 (EC ₅₀)	5.3		5.7	12.6	3.8	2.1 1.0
CD4 ⁺ T-세포 증식	REGN1979 EC ₅₀ (M)	8.42x10 ⁻¹³		9.31x10 ⁻¹³	4.25x10 ⁻¹³	1.25x10 ⁻¹²	2.36x10 ⁻¹² 1.63x10 ⁻¹¹
	최대 % 증식	54.72		54.09	54.79	52.06	44.73 38.67
	배수 변화 (EC ₅₀) ^a	19.3		17.5	38.3	13.1	6.9 1.0
CD8 ⁺ T-세포 증식	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1.55x10 ⁻¹²		8.31x10 ⁻¹³	7.09x10 ⁻¹³	3.43x10 ⁻¹²	8.36x10 ⁻¹² 1.97x10 ⁻¹¹
	최대 % 증식	59.1		58.9	60.2	56.4	53.2 51.1
	배수 변화 (EC ₅₀) ^a	12.7		23.7	27.8	5.7	2.4 1.0

^a REGN1979 는 4.8fM 내지 10nM 의 농도 범위에서 테스트되었다.

^b EC₅₀ 의 배수 변화는 EC₅₀ (REGN5837 없음)/EC₅₀ ([M] REGN5837)로 계산되었다.

[0409]

[0410]

실시에 15: REGN1979-매개 인간 T-세포 활성화에 대한 REGN5837의 효과의 평가 및 WSU-DLCL2 세포 존재하에 다양한 농도에서 조합한 REGN5837 및 REGN1979의 테스트.

[0411]

인간 PBMC 및 WSU-DLCL2 세포로 이식한 후의 NSG 마우스에서 인간 CD20xCD3 bsAb(REGN1979)의 준-유효 용량의 존재 또는 부재하에 인간 CD22xCD28 bsAb REGN5837의 항종양 효능을 평가하기 위해 다음 매개 변수를 측정하여 시험관 내 및 생체 내 연구 모두를 수행하였다: a) CD22⁺ 표적 세포에 대한 T-세포 세포 독성;

[0412]

b) T-세포 활성화의 마커인 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 세포 표면에서 CD25의 상향 조절; c) T-세포 증식; d) 사이토카인 방출(IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ 및 IL-17A)

[0413]

재료 및 방법

[0414]

세포주

[0415]

WSU-DLCL2: WSU-DLCL2는 41세 백인 남성의 흉막 삼출액으로부터 분리된 인간 DLBCL 세포주(Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575)이다.

[0416]

인간 PBMC

[0417]

세포 독성, T-세포 활성화, T-세포 증식 및 사이토카인 방출 분석을 위해, 인간 기증자로부터의 류코팩은 뉴욕

혈액 센터에서 입수했다(기증자 # 1500A).

[0418] 생체 내 마우스 실험을 위해 인간 PBMC는 ReachBio(Cat. # 0500-401)에서 입수했다.

[0419] 실험 설계

[0420] REGN5837 및 REGN1979는 WSU-DLCL2 세포에 대한 REGN1979 매개 T-세포 독성, T-세포 증식, 후기 T-세포 활성화 마커의 세포 표면 발현(CD25), 및 인간 T 세포로부터의 사이토카인 방출에 대한 REGN5837의 효과를 평가하기 위해 다양한 농도에서 조합하여 테스트되었다. 표적 세포 사멸, T-세포 활성화 및 T-세포 증식의 백분율은 본원에 기재된 바와 같이 결정되었다.

[0421] WSU-DLCL2 세포 및 PBMC를 사용하는 DLBCL 모델에서 REGN5837 단독 및 REGN1979와의 조합의 항종양 효능을 본원에 기재된 바와 같이 평가하였다. 표 31 참조.

[0422] T-세포 활성화를 매개하는 REGN1979의 효능에 대한 REGN5837의 효과에 대한 시험관 내 평가

[0423] 인간 1차 T 세포 분리

[0424] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 50 mL SepMate™ 튜브를 사용하여 밀도 구배 원심 분리를 통해 건강한 기증자 백혈구 펙으로부터 분리되었다. 간단히 말해서, 15 mL의 FicollPaque PLUS를 50 mL SepMate 튜브에 적층한 다음 D-PBS로 1:2로 희석된 30 mL의 전혈을 첨가했다. 튜브는 브레이크를 끈 상태에서 10분 동안 1200 x g에서 실온에서 원심 분리되었다. 플라스마와 PBMC를 함유하는 최상층은 새로운 튜브에 따랐다. SepMate 제조업체의 프로토콜에 따라 후속 단계를 따랐다. 분리된 PBMC는 5 mL 크리오바이알(cryovial)에서 250×10^6 세포/mL의 농도로 10% DMSO를 함유하는 FBS에서 동결되었다. PBMC를 37° 수조에서 해동하고 1억 PBMC 당 10mL로 50 U/mL 벤조나아제 뉴클레아제를 함유하는 자극 배지(10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA 및 0.01mM BME가 보충된 X-VIVO 15 세포 배양 배지)에 재현탁하고 300 x g에서 10분 동안 원심 분리하였다. CD3⁺ T 세포는 제조업체의 권장 지침에 따라 StemCell Technologies의 EasySep™ 인간 CD3⁺ T 세포 분리 키트를 사용하여 펠렛 PBMC에서 분리되었다.

[0425] PBMC를 사용한 유세포 분석 기반 T 세포 활성화 분석

[0426] 동종 1차 자극에 의해, 또는 REGN1979에 의해 제공되는 "신호 1"과 함께 매개된 T-세포 활성화를 향상시키는 REGN5837의 능력은 이펙터 세포로서 WSU-DLCL2 표적 세포 및 인간 PBMC를 사용하여 평가되었다. PBMC는 본원에 기술된 바와 같이 림프구에 대해 농축되었다. 표적 및 이펙터 세포는 본원에 기재된 바와 같이 시험 물질 및 대조군 항체와 함께 배양되었다. 본원에 기재된 바와 같이 T-세포 세포 독성, 증식 및 T-세포 활성화 마커의 상향 조절을 평가하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 추가로, REGN1979-매개 사이토카인 방출에 대한 REGN5837의 효과를 본원에 기재된 바와 같이 평가하였다. 비-TAAxCD28 bsAb(REGN5837과 동일한 CD28-결합 아암 및 비-결합 아암 함유)가 REGN5837에 대한 비-가교 대조군으로 테스트되었다.

[0427] PBMC의 림프구 농축

[0428] 인간 PBMC를 완전 배지(10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신-글루타민으로 보충된 RPMI 세포 배양 배지)에 1×10^6 세포/mL로 플레이팅하고 37°C에서 밤새 배양하여 대식세포, 수지상 세포 및 일부 단핵구와 같은 부착 세포를 고갈시켜 림프구를 풍부하게 한다.

[0429] 시험 물질과 함께 PBMC 및 표적 세포 배양

[0430] 림프구가 풍부한 PBMC를 수확하고 1μM의 Violet Cell Tracker 형광 추적 염료로 표지했다. WSU-DLCL2 표적 세포는 1μM의 형광 염료 Vybrant CFDA-SE로 표지했다.

[0431] 이어서, 염료 표지된 PBMC를 5:1의 비율로 염료 표지된 표적 세포(5×10^3 표적 세포/웰의 WSU-DLCL2)로 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다.

[0432] 도금된 PBMC 및 표적 세포를 12.9pM 내지 100nM(REGN5837 또는 비-TAAxCD28) 및 4.8fM 내지 10nM(REGN1979 또는 비-TAAxCD3) 범위의 최종 농도에서 시험 물질 또는 각각의 대조군과 함께 37°C에서 72시간 동안 배양하였다.

[0433] 유세포 분석

[0434] 시험 물질 및 대조군과 함께 배양한 후, 염료 표지된 세포를 LIVE/DEAD 염색 및 CD2, CD4, CD8 및 CD25에 대한

형광 표지 항체 카테일로 염색하였다. 계수 비드(웰당 20 μ L)를 BD Celesta 유세포 분석기에서 샘플 분석 직전에 첨가했다. 유세포 분석 데이터를 사용하여 표적 세포 생존, T-세포 증식 및 T-세포 활성화 마커의 상향 조절을 결정했다. EC_{50} 값은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 9-점 용량-반응 곡선에 대한 4-매개 변수 로지스틱 방정식에서 결정되었다. 세포 독성, T-세포 활성화(CD25 상향 조절) 및 증식에 대한 최대 반응은 Prism 곡선 맞춤에 의해 생성된 최대 반응 고원으로 결정되었다. 대조군과 비교한 EC_{50} 의 상대적 변화는 $EC_{50}^{REGN5837 \text{ 없음}}/EC_{50}^{[M] \text{ REGN5837}}$ 로 계산되었으며 최대 사이토카인 방출의 상대적 변화는 $최대_{[M] \text{ REGN5837}}/최대_{REGN5837 \text{ 없음}}$ 로 계산되었다.

[0435] **표적 세포 생존**

[0436] 각 실험 조건에서 생존 가능한 표적 세포의 백분율은 수집된 비드의 수/웰로 정규화된 살아 있는 CFDA-SE-표지된 표적 세포의 수/웰로서 계산되었다. 표적 세포 생존의 백분율은 항체가 없는 대조군 조건(PBMC만 존재할 때의 표적 세포)에서 생존 가능한 표적 세포의 수에 대한 임의의 실험 조건에서 생존 가능한 표적 세포의 수의 비율로서 결정되었다.

[0437] 이러한 방식으로 보고된 각 실험 조건에서 표적 세포에 대한 세포 독성의 백분율은 100에서 생존 백분율을 뺀 값으로 결정되었다(상기 설명된 대로 계산됨).

[0438] **$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포에서 CD25 발현**

[0439] CD25(후기 활성화 T 세포의 마커)의 상향 조절은 살아 있는 $CD2^+$ 및 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포에서 게이팅하여 평가되었다. $CD4$ 또는 $CD8$ 을 발현하는 총 T 세포 중 CD25를 발현하는 활성화된 T 세포의 백분율을 보고하였다.

[0440] **$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 증식**

[0441] 1차 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포 증식은 총 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 중 분할된 세포의 백분율을 계산하여 유세포 분석을 사용하여 평가했다. 각 세포의 형광 강도가 각 분할 라운드마다 2배씩 감소하기 때문에 Violet Cell Tracker로 염색된 세포의 형광 강도를 세포 분열의 관독 값으로 사용되었다.

[0442] **사이토카인 방출 분석**

[0443] 세포 배양 상청액에서 사이토카인(IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ 및 IL-17A)의 수준은 제조업체의 지침에 따라 BD Cytometric Bead Array 인간 Th1/Th2/Th17 사이토카인 키트를 사용하여 정량화되었다.

[0444] **WSU-DLCL2 세포 이종 이식을 사용한 DLBCL의 생체 내 모델**

[0445] 모든 실험에 암컷 NSG 마우스를 사용했다. 모든 마우스에 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 세포를 SC 이식하고 항체를 IP로 투여했다. 연구 기간 동안 주당 여러 번 캘리퍼를 사용하여 종양 성장을 측정했다. 모든 실험에서 마우스는 표준 조건 하에서 Regeneron 동물 시설에 보관되었다. 모든 실험은 Regeneron의 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)의 지침에 따라 수행되었다.

[0446] **WSU-DLCL2 세포 배양 조건 및 종양 이식**

[0447] WSU-DLCL2 세포주는 Leibnitz Institute-DSMZ에서 입수하여 페니실린, 스트렙토마이신, 글루타민, 및 1mM HEPES가 보충된 10% FBS가 있는 RPMI-1640 배지에서 유지되었다.

[0448] WSU-DLCL2 세포(3×10^6 세포)를 수집하고 5×10^5 PBMC와 혼합하고 PBS 및 GFR Matrigel의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다. 암컷 NSG 마우스에게 오른쪽 옆구리에 100 μ L의 세포 혼합물을 SC 주사했다.

[0449] **종양 측정을 위한 항체 투여**

[0450] 시험 물품 또는 대조군으로 투여하기 전에, 마우스를 종양 부담에 따라 계층화된 그룹으로 할당하고 계층화하였다.

[0451] 항체(REGN5837, REGN1979, REGN5671 [비-TAAxCD28 비-가교 대조군 bsAb], 또는 H4sH17664D [비-TAAxCD3 비-가교 대조군 bsAb])는 이식 후 1, 8, 및 15일에 단일 요법으로 또는 조합하여 표 31에 명시된 용량으로 IP 주사 투여되었다.

표 31: 종양 성장 및 생존을 평가하기 위한 실험 설계

그룹	그룹 당 N	REGN5837 및 비-TAAxCD28의 투여량	REGN1979 또는 비-TAAxCD3의 투여량	BsAb 투여 일정 (IP 주사)	종양 부피 측정일
REGN5837 + REGN1979	7	1 mg/kg	0.4 mg/kg	WSU-DLCL2 세포의 이식 후 1, 8, 및 15 일	이식 후 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57, 및 63 일
REGN5837 + REGN1979	7		4 mg/kg		
REGN5837 + 비-TAAxCD3	7		4 mg/kg		
비-TAAxCD28 + REGN1979	6		0.4 mg/kg		
비-TAAxCD28 + REGN1979	6 ^a		4 mg/kg		
비-TAAxCD28 + Non-TAAxCD3	7		4 mg/kg		

^a 실험 중에 한 마리의 마우스가 사망하여 제외되었다.

종양 측정 및 지정 종점

종양 X 및 Y 직경의 캘리퍼 측정(길이 및 폭의 수직 측정)을 사용하여 시간에 따른 종양 성장을 모니터링했다. 종양 부피를 계산했다($X * Y * [X/2]$, 여기서 X는 더 짧은 직경). 종양이 지정된 종양 종점(종양 직경 > 20 mm 또는 종양 궤양화)에 도달하면 마우스를 안락사시켰다. 이 종점은 IACUC 표준을 따른다.

종양 성장 및 생존의 통계 분석

시간에 따른 종양 부피의 결과는 다중 비교를 위한 Tukey 사후 테스트에 이어 분산의 양방향 분석(ANOVA)을 사용하여 분석되었다. 시간 경과에 따른 생존 결과는 모든 그룹에서 Mantel-Cox 테스트를 사용하여 분석되었으며 개별 그룹별 비교를 위해 추가 Mantel-Cox 테스트가 실행되었다. 차이가 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. GraphPad Prism 8 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행했다.

결과

WSU-DLCL2 표적 세포에 대한 T-세포 세포 독성 및 인간 PBMC로부터의 사이토카인 방출을 매개하는 REGN1979의 능력에 대한 REGN5837의 효과

WSU-DLCL2 세포에 대한 REGN1979 매개 세포 독성, T-세포 활성화, T-세포 증식 및 인간 PBMC의 T 세포로부터의 사이토카인 방출에 대한 REGN5837의 효과를 평가하기 위해 앞에서 설명한대로 REGN5837 및 REGN1979를 다양한 농도에서 조합하여 테스트하였다. 표 30은 WSU-DLCL2 세포에 대한 REGN1979 매개 세포 독성, T-세포 활성화 및 T-세포 증식에 대한 REGN5837의 효과를 보여준다. 사이토카인 방출에 대한 REGN5837의 효과를 입증하는 2명의 인간 기증자로부터의 수치 결과가 표 32에 요약되어 있다.

REGN1979 매개 세포 독성 및 인간 T 세포 증식에 대한 REGN5837의 효과

REGN1979의 효능(potency)(EC_{50}) 및 효능(efficacy)(최대 반응)에 대한 REGN5837의 농도 증가 효과는 WSU-DLCL2 표적 세포에 대한 REGN1979 매개 세포 독성, REGN1979 매개 T-세포 활성화 및 인간 PBMC로부터의 인간 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 REGN1979 매개 증식을 평가(evaluate)하여 평가하였다(assess). REGN5837은 WSU-DLCL2 세포에 대한 세포 독성, T-세포 활성화($CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포에서 $CD25$ 발현으로 측정됨), 및 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포 증식을 농도 의존적으로 매개하는 REGN1979의 효능을 강화했다. 77.2pM 내지 100nM 범위의 농도에서 REGN5837은 표적 세포에 대한 REGN1979 매개 T-세포 독성의 효능을 증가시켰다; 77.2pM 내지 2.78nM 범위의 농도에서 REGN5837은 REGN1979 매개 T-세포 활성화 및 증식의 효능을 증가시켰지만 REGN5837의 농도가 더 높아져도 REGN1979의 효능을 더 이상 증가시키지 않았다. 이러한 데이터는 도 11과 표 30에 그래프로 표시된다.

REGN5837 존재하에 인간 PBMC에서 REGN1979 매개 사이토카인 방출

인간 PBMC로부터 REGN1979 매개 사이토카인 방출의 효능 및 최대 반응에 대한 REGN5837의 농도 증가 효과를 평

가하였다. 인간 PBMC 및 WSU-DLCL2 세포의 존재하에, REGN5837의 농도 증가는 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , 및 IL-17A의 REGN1979 매개 방출의 최대 수준을 농도 의존적으로 향상시켰다(도 12). 더욱이, REGN5837의 농도 증가는 사이토카인 방출을 매개하는 REGN1979의 효능을 향상시키는 경향을 보여주었다. REGN1979에 의해 매개된 EC₅₀ 값, 최대 사이토카인 수준 및 배경 사이토카인 수준(REGN5837 제외) 이상의 상대적 증가는 도 12 및 표 32에 요약되어 있다.

표 32

		REGN5837의 고정 농도					
		1.0 X10 ⁻⁷	1.67 X 10 ⁻⁸	2.78 X 10 ⁻⁹	4.63 X 10 ⁻¹⁰	7.72 X 10 ⁻¹¹	0
IL-4	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	1.66 X 10 ⁻¹¹	1.53 X 10 ⁻¹¹	1.28 X 10 ⁻¹¹	1.89 X 10 ⁻¹¹	3.77 X 10 ⁻¹⁰	9.99 X 10 ⁻¹⁰
	최대 CKR (pg/mL) ^b	2,637	2,793	2,705	1,560	935	775
	배수 변화 (CKR) ^c	3.4	3.6	3.5	2.0	1.2	1.0
IL-2	REGN1979 EC ₅₀ (M)	2.81 X 10 ⁻¹¹	1.96 X 10 ⁻¹¹	5.18 X 10 ⁻¹²	5.36 X 10 ⁻¹¹	3.89 X 10 ⁻⁸	1.25 X 10 ⁻¹⁰
	최대 CKR (pg/mL)	79.3	75.4	63.2	70.3	116	36.2
	배수 변화 (CKR)	2.2	2.1	1.7	1.9	3.2	1.0
IL-6	REGN1979 EC ₅₀ (M)	5.13 X 10 ⁻¹¹	7.89 X 10 ⁻¹²	2.68 X 10 ⁻¹¹	1.45 X 10 ⁻¹²	1.61 X 10 ⁻¹⁰	7.42 X 10 ⁻¹¹
	최대 CKR (pg/mL)	366	304	367	246	210	190
	배수 변화 (CKR)	1.9	1.6	1.9	1.3	1.1	1.0
IL-10	REGN1979 EC ₅₀ (M)	3.54 X 10 ⁻¹¹	1.04 X 10 ⁻¹⁰	2.43 X 10 ⁻¹⁰	5.29 X 10 ⁻¹¹	3.34 X 10 ⁻¹¹	9.95 X 10 ⁻¹¹
	최대 CKR (pg/mL)	528	683	835	633	450	512
	배수 변화 (CKR)	1.0	1.3	1.6	1.2	0.9	1.0
TNF- α	REGN1979 EC ₅₀ (M)	5.03 X 10 ⁻¹²	8.69 X 10 ⁻¹³	3.45 X 10 ⁻¹²	2.08 X 10 ⁻⁰³	1.62 X 10 ⁻¹⁰	2.43 X 10 ⁻¹⁰
	최대 CKR (pg/mL)	236	129	170	NC	35.4	29.6
	배수 변화 (CKR)	8.0	4.4	5.8	NC	1.2	1.0
IFN- γ	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1.17 X 10 ⁻¹⁰	5.34 X 10 ⁻¹¹	2.00 X 10 ⁻¹⁰	6.72 X 10 ⁻¹¹	6.57 X 10 ⁻¹¹	1.82 X 10 ⁻¹⁰
	최대 CKR (pg/mL)	525	537	693	348	167	2.06
	배수 변화 (CKR)	2.6	2.6	3.4	1.7	0.8	1.0

[0464]

IL-17A	REGN1979 EC ₅₀ (M)	3.22 X 10 ⁻¹⁰	1.11 X 10 ⁻¹⁰	7.60 X 10 ⁻¹¹	4.63 X 10 ⁻¹⁰	1.86 X 10 ⁻¹⁰	2.50 X 10 ⁻¹⁰
	최대 CKR (pg/mL)	26.6	25.2	20.6	33.3	21.9	20.5
	배수 변화 (CKR)	1.3	1.2	1.0	1.6	1.1	1.0

^a REGN1979는 4.8fM 내지 10nM의 농도 범위(ange)에서 테스트되었다.
^b 최대 CKR은 PRISM 곡선 맞춤에 의해 결정된 최대 고원으로 보고되었다.
^c 혈청 내 최대 사이토카인 수준의 배수 변화는 최대 CKR([M] REGN5837)/최대 CKR (REGN5837 없음)으로 계산되었다.
 약어: CKR, 사이토카인 방출; NC, 사이토카인 방출 수준이 테스트된 REGN1979 농도 범위에서 포화에 도달하지 않았거나 용량-반응 곡선을 맞출 수 없기 때문에 계산되지 않았음.

[0465]

[0466] **REGN1979의 준-유효 용량의 존재 및 부재하에 REGN5837의 투여의 항종양 효능**

[0467] WSU-DLCL2 종양을 보유한 면역 결핍 NSG 마우스는 본원에 앞서 기술된 바와 같이 항체 또는 비-가교 대조군을 IP 주사받았다.

[0468] 종양-보유 마우스에서, 0.4 또는 4 mg/kg REGN1979의 존재하에 1 mg/kg REGN5837로 처리하면 비-가교 대조군 bsAbs(비-TAAxCD28 및 TAAxCD3 bsAbs)과 비교하여 28일째(최종 항체 투여 6일 후)까지 종양 성장을 통계적으로 유의하게 억제하였다(도 13a 및 13b). 1 mg/kg REGN5837 및 0.4 mg/kg REGN1979의 조합은 46일째까지 REGN1979 단일 요법에 비해 종양 부피를 상당히 감소시켰다.

[0469] 0.4 및 4 mg/kg REGN1979 단일 요법은 28일째까지 비-가교 대조군에 비해 완전한 종양 억제를 초래한 반면, REGN5837 단일 요법은 효과가 없었다. 투여 기간 동안 비-가교 대조군 bsAbs로 투여시 급속한 종양 성장이 관찰되었고, 모든 마우스는 125일째에 안락사되었다.

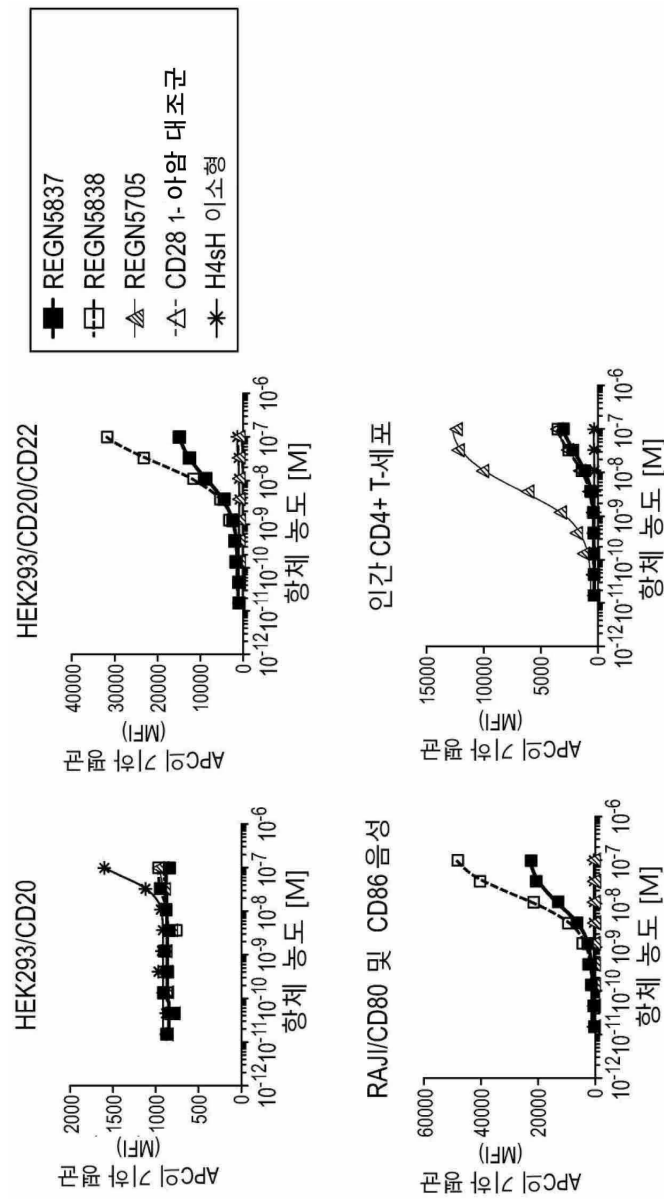
[0470] Mantel-Cox 테스트는 모든 그룹에 걸쳐 생존에서 통계적으로 유의한 차이를 감지했으며($p = 0.0001$), 그룹별 비교를 위해 추가 Mantel-Cox 테스트를 수행했다. 0.4 또는 4 mg/kg REGN1979와 함께 조합하여 1 mg/kg REGN5837을 투여한 마우스(각각 85% 및 70% 생존율)에서 비-가교 대조군 항체를 투여한 마우스(생존 없음)와 비교하여 생존율의 유의한 증가가 관찰되었다(도 14).

[0471] 더욱이, REGN5837 또는 REGN1979 단일 요법으로 투여받은 마우스와 비교하여 0.4 또는 4 mg/kg REGN1979와 함께 조합하여 1 mg/kg REGN5837을 투여한 마우스에서 생존율의 유의한 증가가 관찰되었다.

[0472] 본 발명은 여기에 설명된 특정 실시 양태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본 명세서에 설명된 것 외에 본 발명의 다양한 변형은 전술한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위에 속하도록 의도된다.

도면

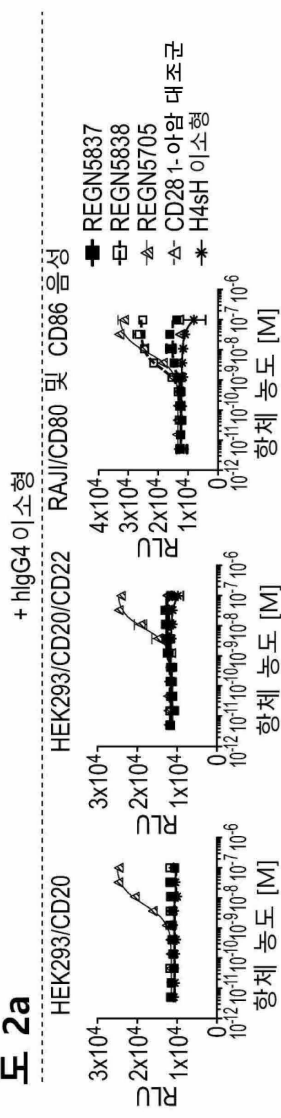
도면1



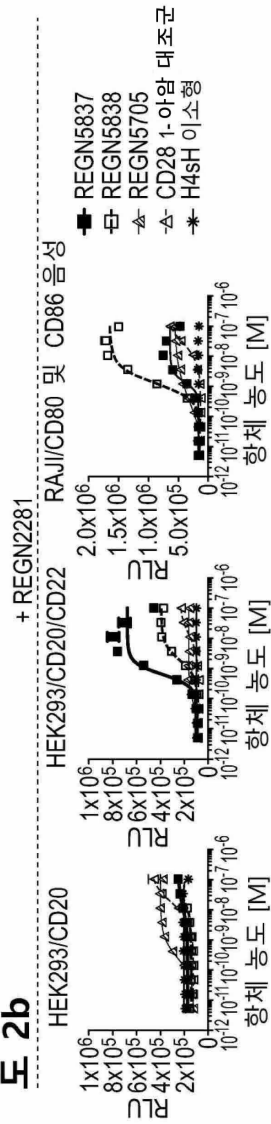
도면2

CD28 이중 특이적 항체는 일차 T-세포 자극 및 CD22 표적 발현의 존재하에 루시퍼라제 생산을 증가시킨다.

도 2a



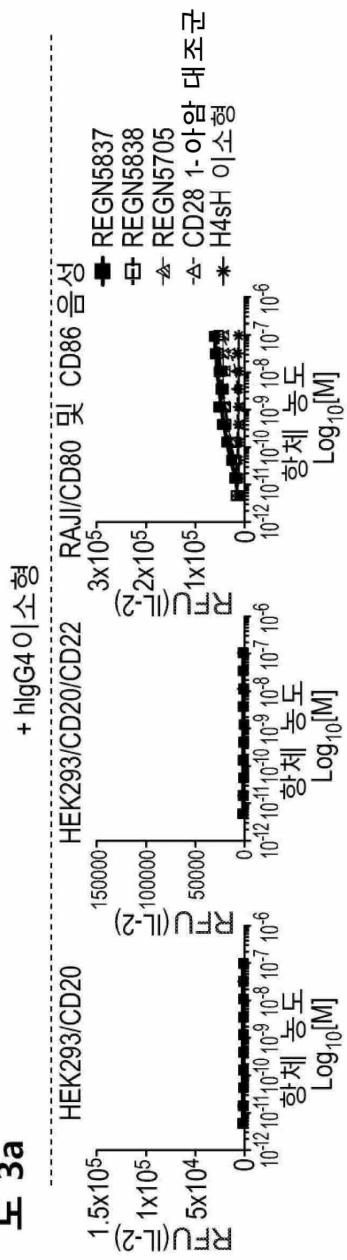
도 2b



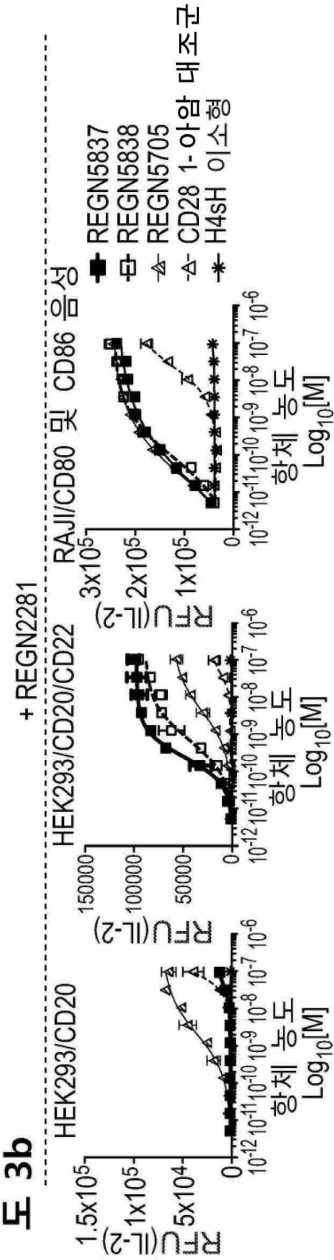
도면3

CD28 이중 특이적 항체는 일차 T-세포 자극 및 CD22 표적 발현의 존재하에 IL-2 생산을 증가시킨다.

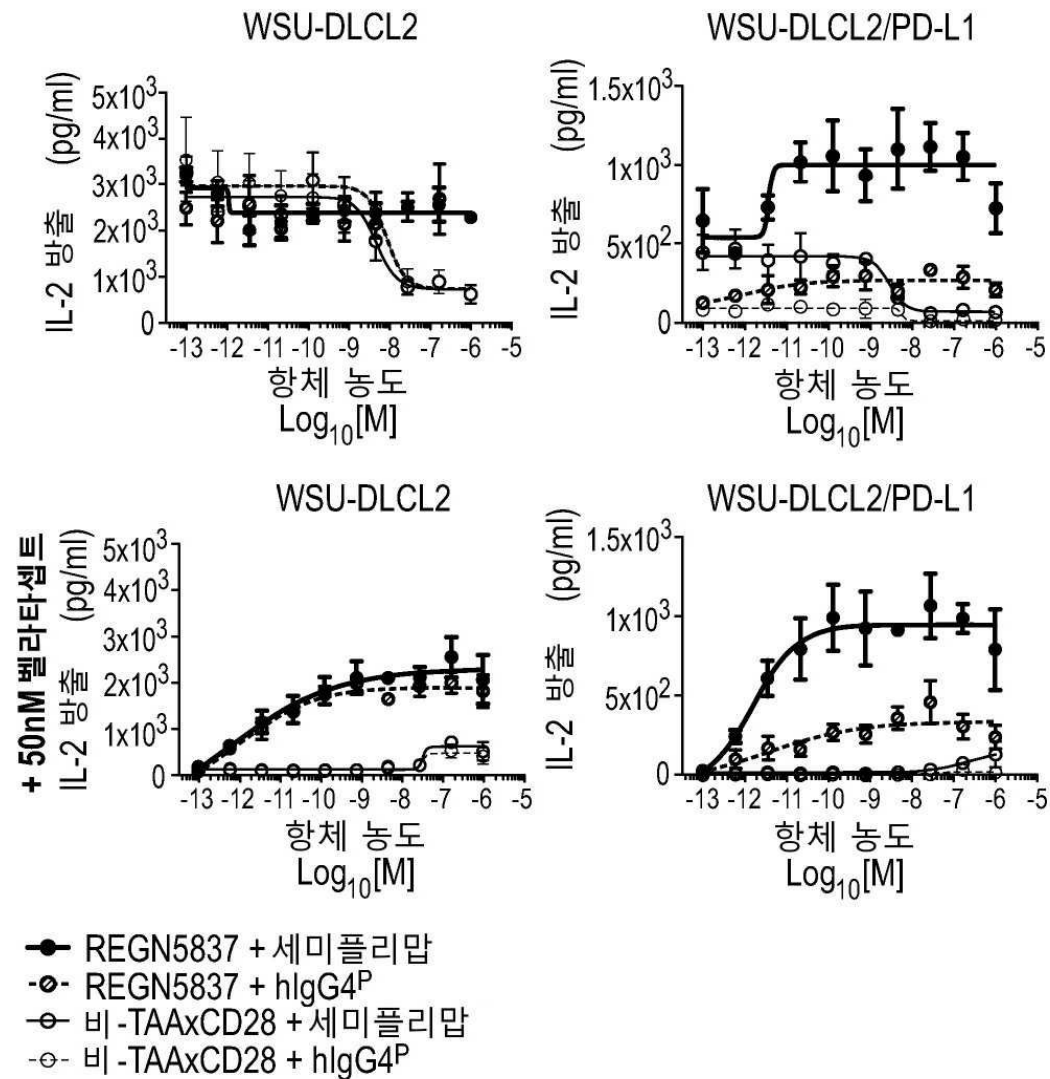
도 3a



도 3b

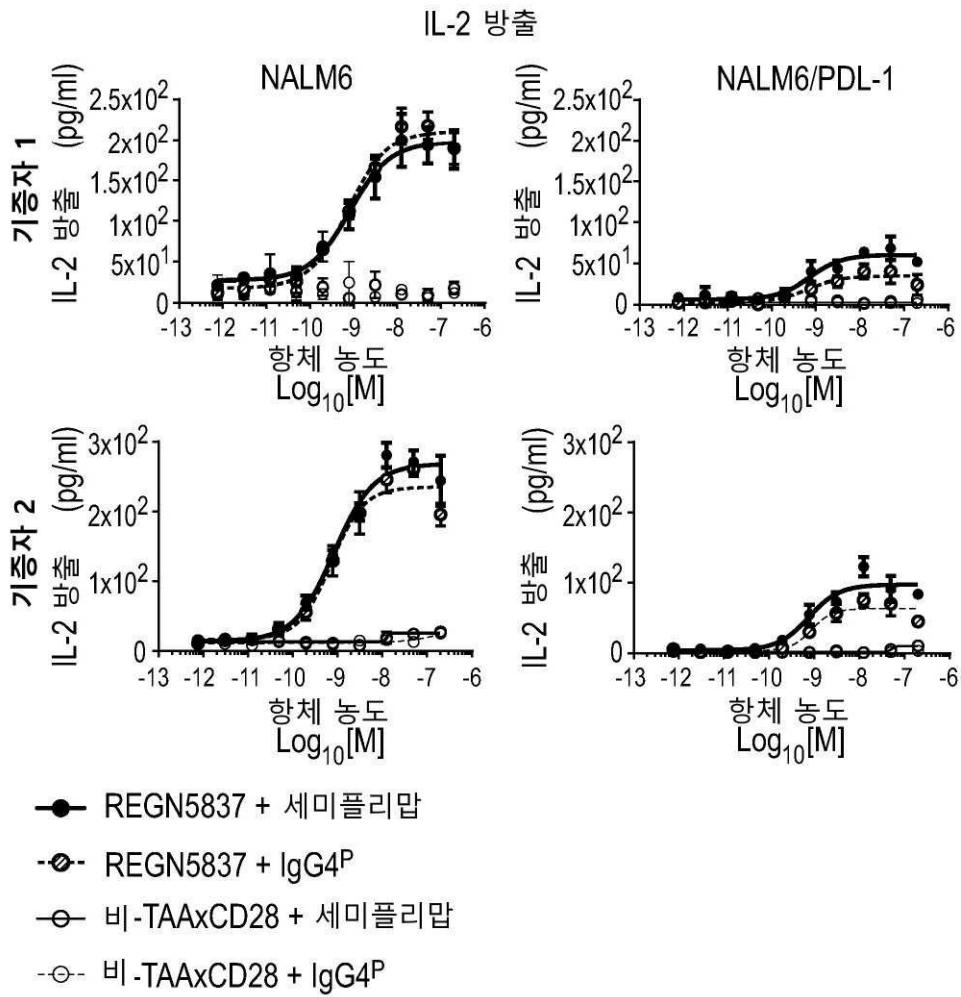


도면4



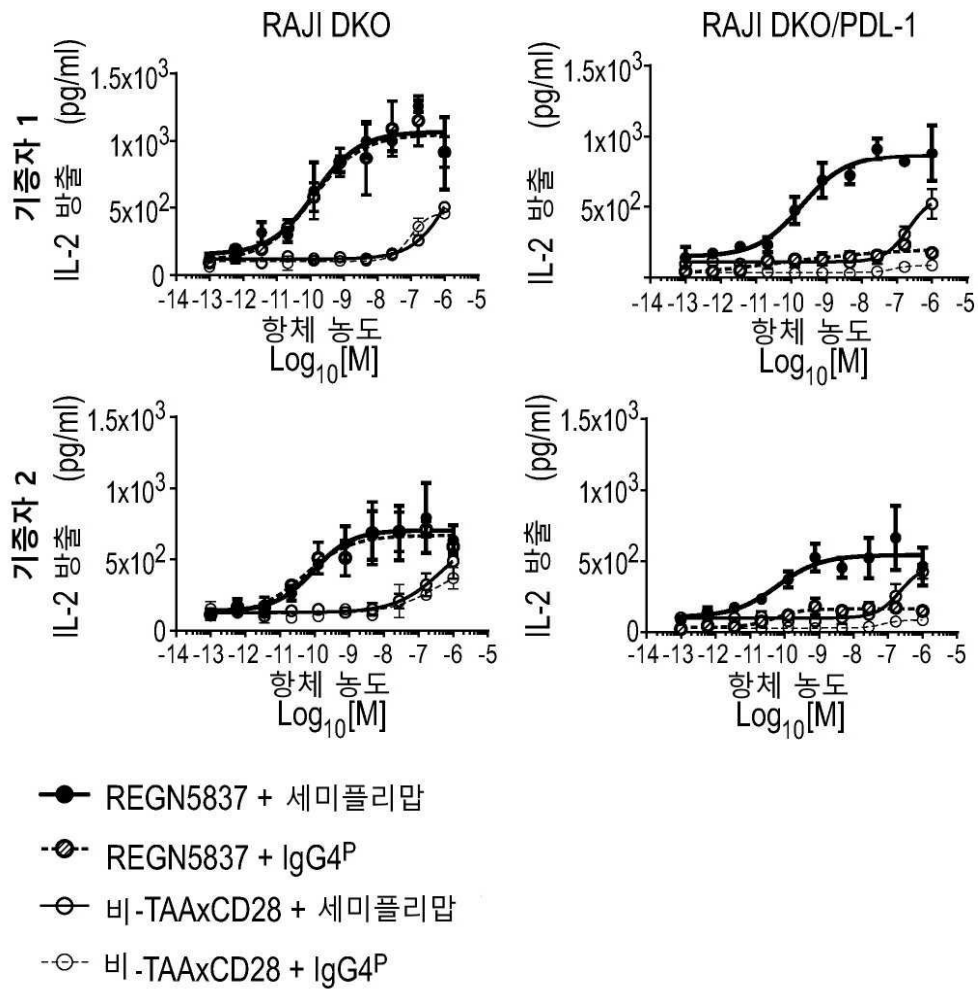
REGN5837 + 세미플리맵의 조합은 PD-L1을 발현시키는 WSU-DLCL2 세포의 존재하에, 가장 현저하게는 벨라셉트의 존재하에 최대 IL-2 방출을 향상시킨다.

도면5a



REGN5837과 세미플리맵의 조합은 PD-L1을 발현시키도록 조작된 NALM6 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다.

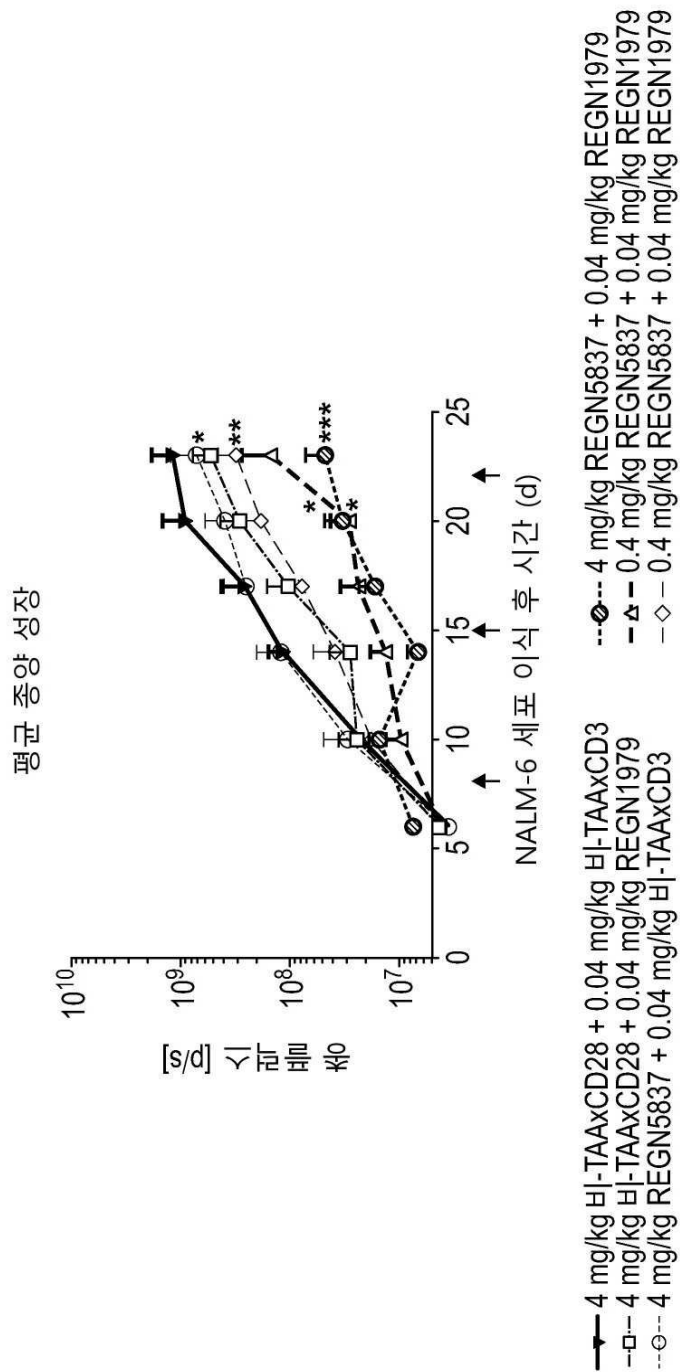
도면5b



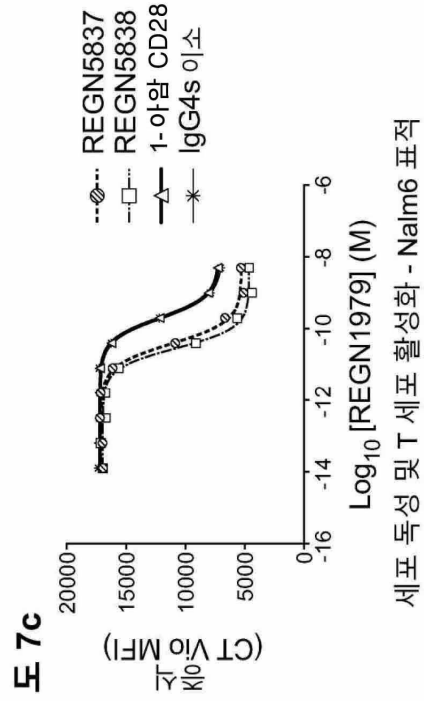
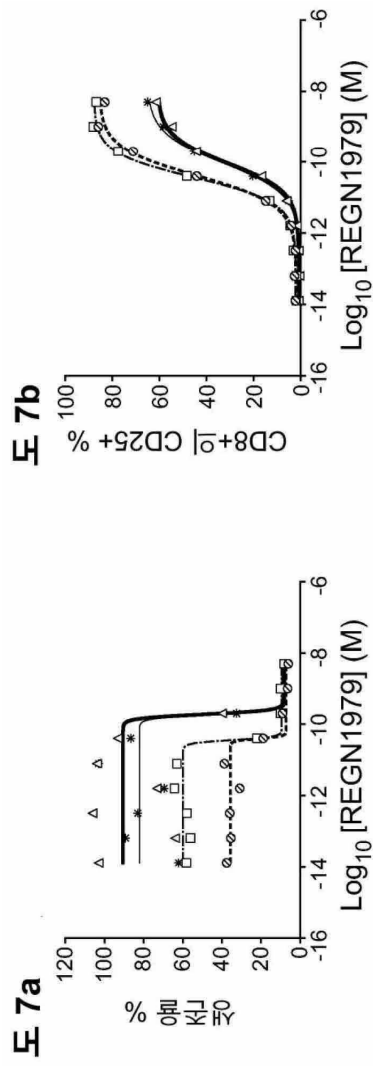
REGN5837과 세미플리맵의 조합이 PD-L1을 발현시키도록 조작된 RAJI 세포에서 REGN5837 단독 처리보다 IL-2 방출을 향상시킨다

도면6

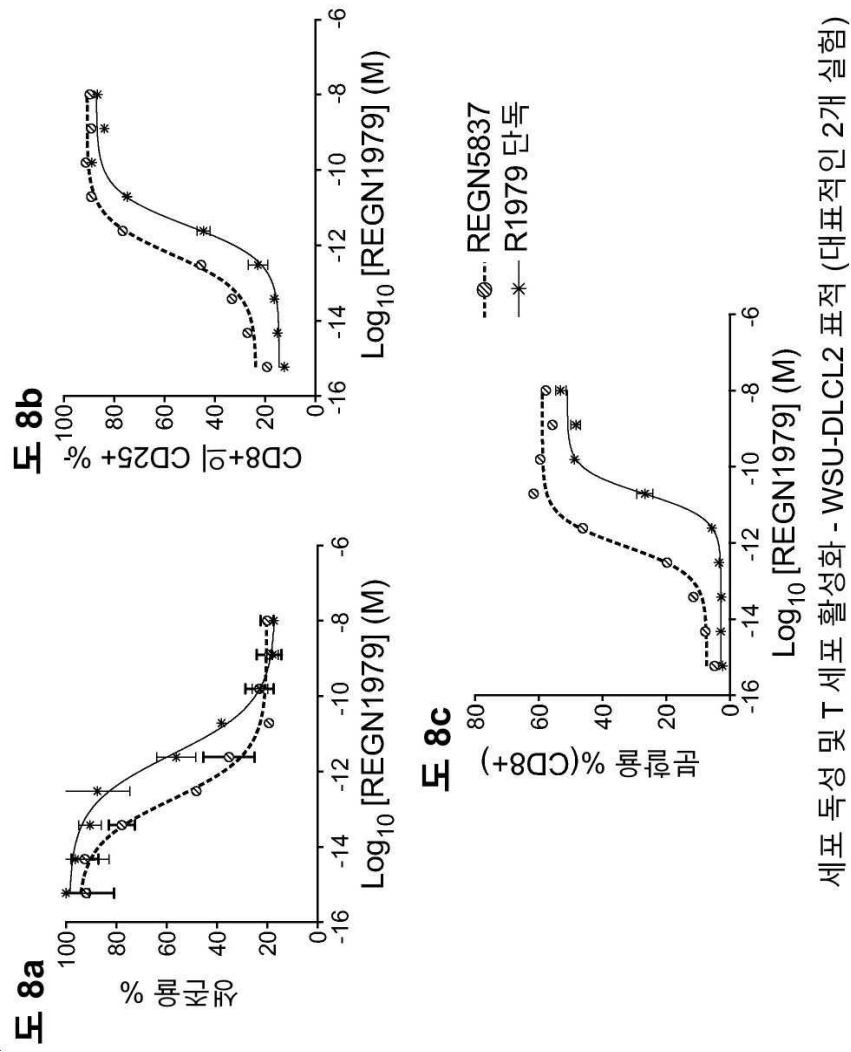
NALM-6-Luc 종양을 갖고 있는 NSG 마우스를 REGN1979의 존재하에 REGN5837로 치료하는 것이 상당한 종양 억제와 관련이 있다



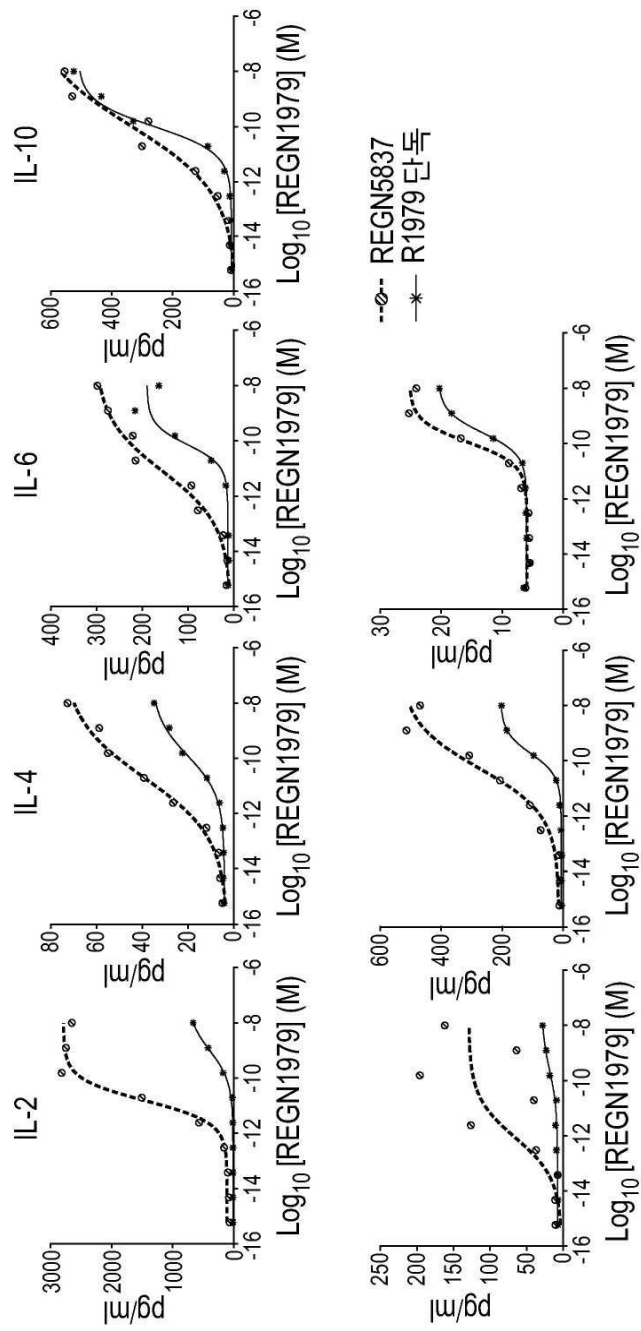
도면7



도면8

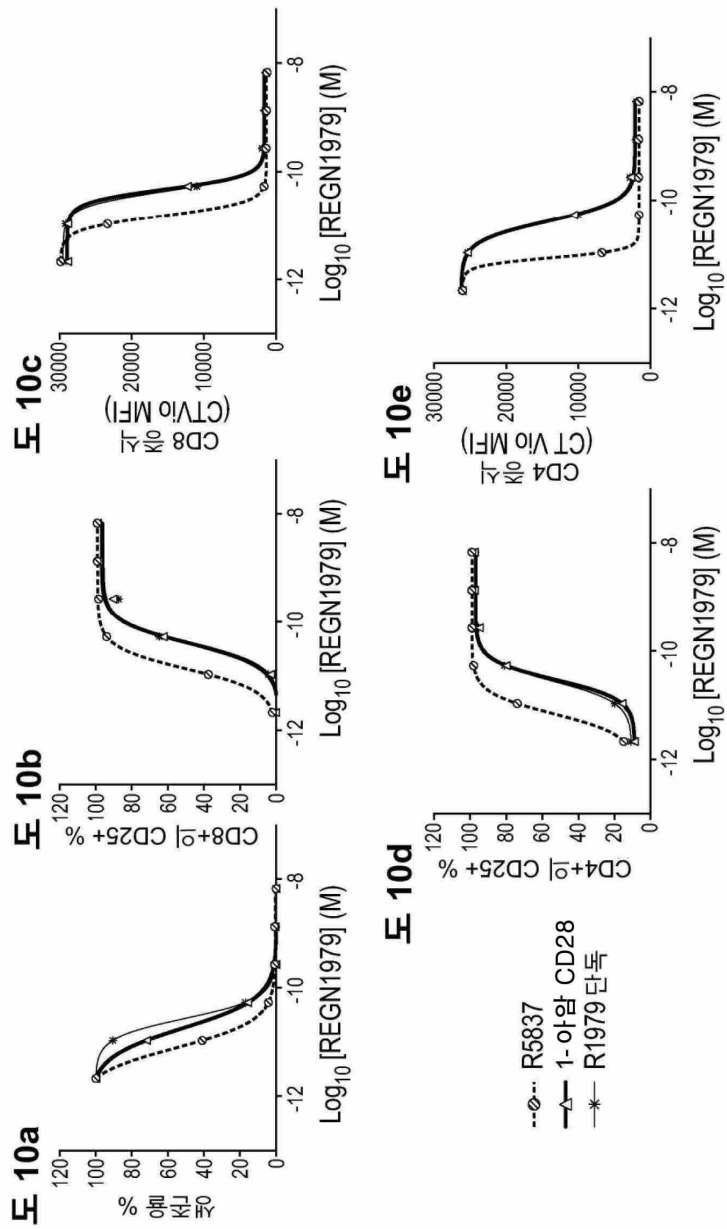


도면9



WSU-DLCL2 세포 독성 검정에서의 사이토카인 방출 (대표적인 2개 실험)

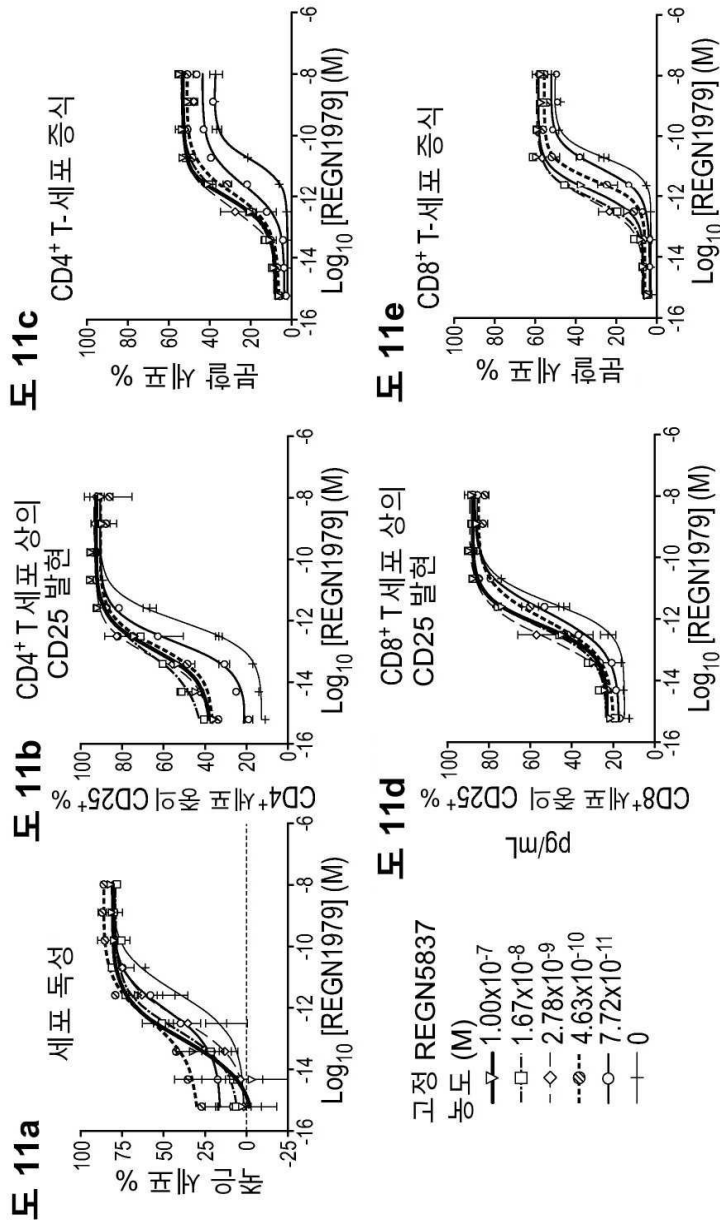
도면10



세포 독성, T 세포 활성화 및 증식

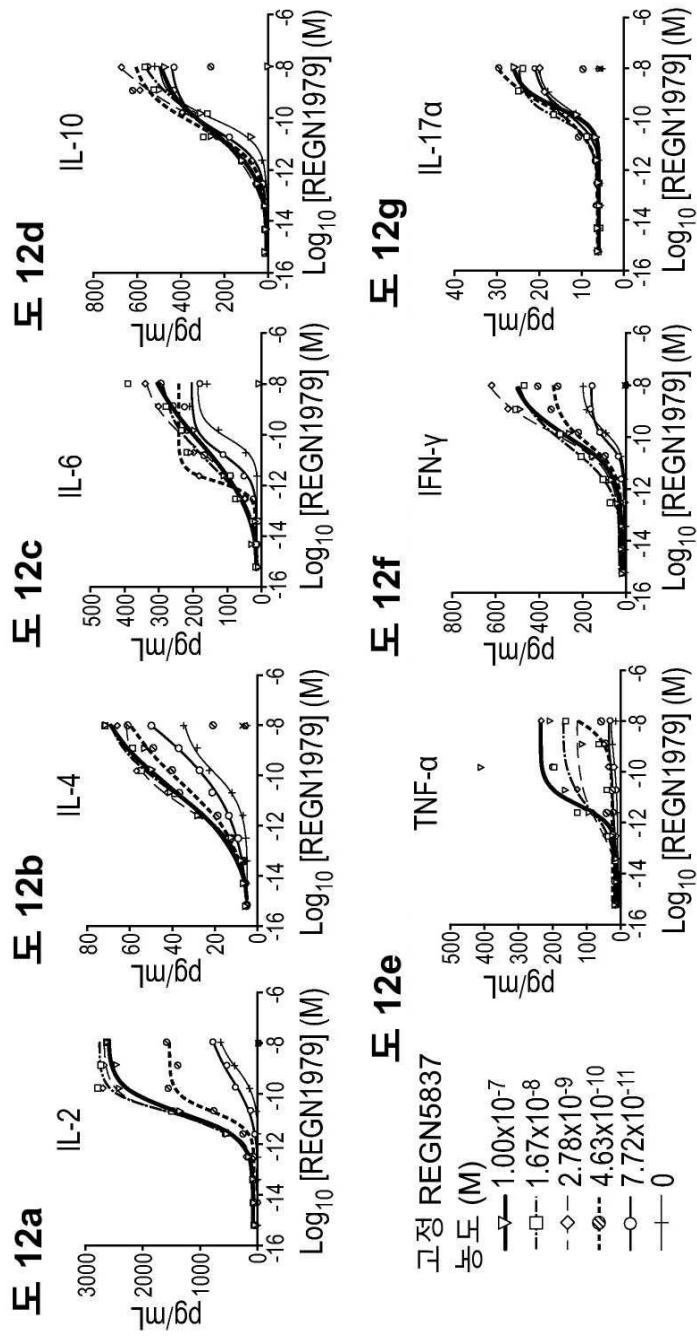
도면11

REGN5837은 농도 의존적인 방식으로 REGN1979-매개 세포 독성, CD25의 세포 표면 발현, 및 T-세포 증식의 효능을 향상시킨다



도면12

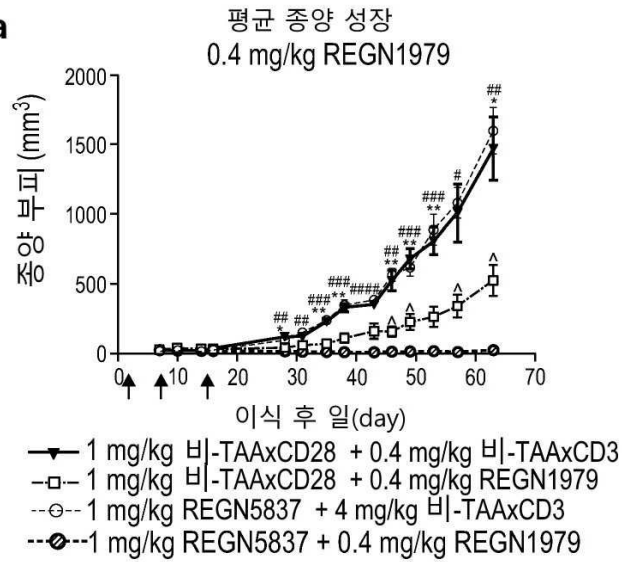
REGN5837은 WSU-DLCL2 B-세포 림프종 세포의 존재하에 농도 의존적인 방식으로 인간 T 세포로부터 REGN1979-매개 사이토카인 방출의 효능 및 최고 수준을 향상시킨다



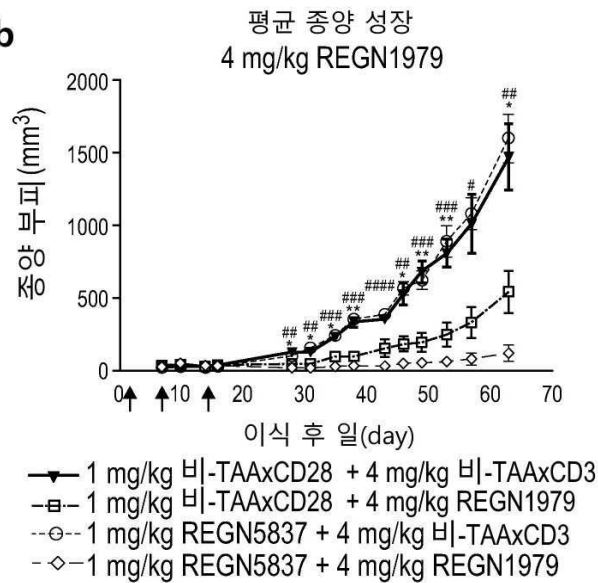
도면13

WSU-DLCL2 종양을 갖고 있는 NSG 마우스를 준 유효 용량의 REGN1979의 존재하에 REGN5837로 치료하는 것이 유의한 종양 억제와 관련된다

도 13a

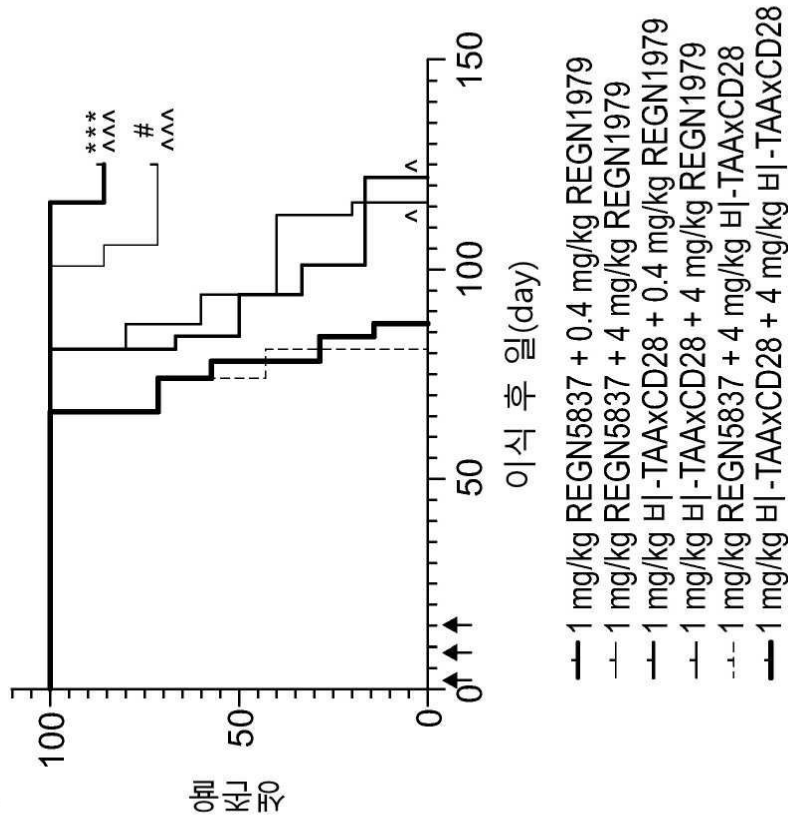


도 13b



도면14

WSU-DLCL2 종양을 갖고 있는 NSG 마우스를 준 유효 용량의 REGN1979의 존재하에 REGN5387로 치료하는 것이 REGN5387 또는 REGN1979 단일 요법보다 상당히 더 큰 생존과 관련된다



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> BISPECIFIC ANTI-CD28 X ANTI-CD22 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 118003-49220

<140><141><150> 62/781,689

<151> 2018-12-19

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 1

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata caactttgcc acgtactgga ttgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtt gatgggaatc atctatcctg gtgactctga gaccacatac 180

aaccctgcct tccaaggcca gggtaccatc tcagccgaca agtccatcag taacgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgcatgt attattgtgc gagagtagga 300

ggatatgtga gtggtaccag ttgccacaac tggttcgacc cctggggcct gggaaccctg 360

gtcacctgtc cctca 375

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe

50						55						60							
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ala	Tyr				
65						70						75						80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys				
85						90						95							
Ala	Arg	Val	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gly	Thr	Ser	Cys	His	Asn	Trp	Phe				
100						105						110							
Asp	Pro	Trp	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
115						120						125							
<210>																			

```
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 3
```

<400> 3

ggatacaact ttgccacgta ctgg 24

```
<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
```

<400> 4

Gly Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr Trp

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 5

atctatcctg gtgactctga gacc

24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 6

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr

1 5

<210> 7

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 7

gcgagagtag gaggatattg tagtggtacc agttgccaca actggttcga cccc

54

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Pro

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 9

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

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	Ser	Ser	Pro
				85					90						95

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

100 105

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 13

ggtgcatcc

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Gly Ala Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 15

cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 17

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 17

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag ccctctgggtt caccttcagt ggctctgata tgcactgggt cgcagggt 120
tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaaacc aacctaatac ttacgcgaca 180
gcatatgctg cgtcggtgaa aggcagggtt accatctcca gagatgattc aaagaacacg 240
gcgcatttgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtattt ttgtactaga 300

caaaagcagg tcgtttataa ttaccatcac tactacggtg tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggtca ccgtctctc a 381

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30
Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Ala His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Thr Arg Gln Lys Gln Val Val Tyr Asn Tyr His His Tyr Tyr

100

105

110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 19

gggttcacct tcagtggctc tgat

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Asp

1

5

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 21

attagaaacc aacctaataag ttacgcgaca

30

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 23

actagacaaa agcaggctcgt ttataattac catcactact acggtatgga cgtc 54

<210> 24

<211> 18

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Thr Arg Gln Lys Gln Val Val Tyr Asn Tyr His His Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 25

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD28-HCVR-NA"

<400> 25

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac ccactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagc atgggggggtt 300

cggagggact actactacta cggatatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

CD28-HCVR-AA"

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28-HCDR1-NA"

<400> 27

ggtggctcca tcagtagtta ctac

24

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28-HCDR1-AA"

<400> 28

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28-HCDR2-NA"

<400> 29

atctattaca gtgggatcac c

21

<210> 30

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28-HCDR2-AA"
 <400> 30
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr

1 5
 <210> 31
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28- HCDR3-NA"

<400> 31
 cgagatgggg ggttcggagg gactactact actacgtat ggacgtc 47

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 CD28- HCDR3-AA"
 <400> 32

Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

10369N_VH(mouse).mIgG1"

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Phe Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ile Asn Phe Gly Ser Asn Tyr Asp Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala

195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys

210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285

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

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

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

10369N_VK(mouse).mKappa"

<400> 34

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

1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ile

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asn Ser Val Glu Thr

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Phe

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 35

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

14226P2_VH(human).hIgG4 stealth/star"

<400> 35

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr		
210	215	220
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

3-20 GL VK.hKappa"

<400> 36

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 Ser Ser Pro

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu
210
<210> 37
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
10154P_VH(human).hIgG4 stealth"
<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Asn Tyr Arg Ala Ala Asn Thr Trp 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 Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gln Asp Arg Val Ile Ile Lys Asp Tyr Tyr Val Met Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

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

370 375 380

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

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

 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 38
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 1-39 GL (PP) VK.hKappa"
 <400
 > 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 39

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 VAC3B9_VH(human).hIgG4"

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
130 135 140

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
195 200 205

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
325 330 335

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 40

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

FAAR9F07_VH(human).hIgG4 star"

<400> 40

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

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

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 41

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
FAAR9F07_VK(human).hKappa"

<400> 41

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

VAC3B9_VH(human).hIgG4 stealth"

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 130 135 140
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

260 265 270
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

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

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

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

450

<210> 43

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

FAAR9F07_VH(human).hIgG4 stealth/star"

<400> 43

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

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

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

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

195 200 205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

FAAR9F07_VK(human).hKappa"

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 45

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

1238N_VH(human).hIgG4"

<400> 45

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

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

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

35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Arg His Arg Val Thr Arg Thr Ala Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

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

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

130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

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

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

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

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

210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

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

260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

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

290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

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

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

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

355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

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

405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

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

435 440 445

<210> 46

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

1238N VK(human).hKappa"

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Asp Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 47

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
11838P2_VH(human).hIgG4 stealth (PSMA)"

<400

> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp His Gly Val Phe Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

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

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

[illegible]

Gly Lys

450

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 221 \rangle$ source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

14226P2_VH(human).hIgG4 stealth/star (CD28)"

<400> 48

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

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

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

370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

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

405 410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430
Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 49

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

3-20 GL VK.hKappa"

<400> 49

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 50

<211> 696

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN5140 hCD22 ecto (D20-R687).mmH"

<400> 50

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

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn
35 40 45

Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn
65 70 75 80

Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly
85 90 95

Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg
100 105 110

Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu
115 120 125

Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu
130 135 140

Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu
145 150 155 160

Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
165 170 175

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser
180 185 190

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys
195 200 205

Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys
210 215 220

Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp
225 230 235 240

Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr
245 250 255

Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr
275 280 285

Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val

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

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

 Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val
 420 425 430
 Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu
 435 440 445
 Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
 450 455 460
 Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu
 465 470 475 480

 Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro
 485 490 495
 Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe
 500 505 510
 Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly
 515 520 525
 Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro
 530 535 540

Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln
 545 550 555 560
 Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg
 565 570 575
 Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser
 580 585 590
 Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr
 595 600 605

Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys
 610 615 620
 Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys
 625 630 635 640
 Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
 645 650 655
 Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys Leu
 660 665 670

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 675 680 685
 Asp Leu His His His His His His
 690 695

<210> 51

<211> 697

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN5280 mFC22 ecto (D18-R686).mmH"

<400> 51

Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile Tyr Ala Trp
 1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg Val Leu Asp Gly
 20 25 30

Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Gln Asn
35 40 45

Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile
65 70 75 80

Asn Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Val Asn Asp Ser
85 90 95

Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu
100 105 110

Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln
115 120 125

Leu Pro Pro Lys Leu Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu
130 135 140

Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu
145 150 155 160

Glu Gly Ala Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser
165 170 175

Thr Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
180 185 190

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly
195 200 205

Lys Val Leu Ser Glu Asp Met Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro
210 215 220

Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg Lys Gly
225 230 235 240

Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn Pro Glu Tyr
245 250 255

Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Ile Leu Leu Lys Glu Gln Asn
260 265 270

Thr Leu Met Leu Thr Leu His Lys Val Thr Lys Ser Gln Ser Gly Arg

275 280 285
 Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Ala Thr Ser Glu Lys
 290 295 300
 Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile
 305 310 315 320
 Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile
 325 330 335

 Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly
 340 345 350
 Lys Glu Val Gln Gly Arg Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile
 355 360 365
 Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu
 370 375 380
 Gly Ile Gly Glu Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro
 385 390 395 400

 Pro Lys Lys Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu
 405 410 415
 Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile
 420 425 430
 Val Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
 435 440 445
 Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala Val
 450 455 460

 Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Thr
 465 470 475 480
 Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys
 485 490 495
 Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp
 500 505 510
 Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn
 515 520 525

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

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

Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Gln Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys
660 665 670
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
675 680 685
Glu Asp Leu His His His His His His
690 695

<210> 52

<211> 696

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN5281 mfCD22 ecto (D20-R687).mmH"

<400> 52

Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile Tyr Ala Trp
1 5 10 15

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

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

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

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

 Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Ile Pro Leu Lys Glu Gln Asn Thr

260	265	270
Leu Met Leu Thr Leu His Lys Val Thr Lys Ser Gln Ser Gly Arg Tyr		
275	280	285
Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val		
290	295	300
Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Ser Ser Arg Val Gln Ile Ser		
305	310	315
		320
Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser		
325	330	335
Pro Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys		
340	345	350
Glu Val Gln Gly Arg Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu		
355	360	365
Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Glu Ala Gly Asn Ile Leu Gly		
370	375	380
Ile Gly Glu Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro		
385	390	395
Lys Lys Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly		
405	410	415
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val		
420	425	430
Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu		
435	440	445
Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala Val Ala		
450	455	460
Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Thr Leu		
465	470	475
Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro		
485	490	495
Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe		
500	505	510

Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly
515 520 525

Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro
530 535 540

Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln
545 550 555 560

Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg
565 570 575

Leu Arg Val Ser Met Ser Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr
580 585 590

Ala Thr Leu Ile Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr
595 600 605

Ala Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met
610 615 620

Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys
625 630 635 640

Gln Gly Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu
645 650 655

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Gln Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys Leu
660 665 670

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
675 680 685

Asp Leu His His His His His His
690 695

<210> 53

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN2012 hCD28 ecto (N19-P152).mFc"

<400> 53

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

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

 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 130 135 140
 Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 165 170 175

 Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 180 185 190
 Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 195 200 205
 Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 210 215 220
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 225 230 235 240

 Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile

245 250 255
 Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
 260 265 270
 Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
 275 280 285
 Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
 290 295 300

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
 325 330 335
 Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 340 345 350
 His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 54

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN2011 hCD28 ecto (N19-P152).mmH"

<400> 54

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

35 40 45
 Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
 85 90 95
 Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly

 100 105 110
 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 130 135 140
 Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
 145 150 155 160
 His His

<210> 55

<211> 159

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

REGN3595 mCD28 ecto (N20-L150).mmH"

<400> 55

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

Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg Ser Asn Ala
 50 55 60
 Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val Thr Phe Arg
 65 70 75 80
 Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile

85 90 95
 Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg Ser Asn Gly
 100 105 110

Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr Gln Ser Ser
 115 120 125

Pro Lys Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu
 130 135 140

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 145 150 155

<210> 56

<211> 847

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

Human CD22 Amino Acid Sequence: Accession number CAA42006"

<400> 56

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
 20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
 35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr

50 55 60

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
 85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
 100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp

115 120 125
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His

130 135 140
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
165 170 175
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser

180 185 190
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
210 215 220

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

245 250 255
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
260 265 270

Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
275 280 285

Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
290 295 300

Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser

305 310 315 320
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
325 330 335

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu
340 345 350

Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His

355 360 365
 Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro

 370 375 380
 Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn
 385 390 395 400
 Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln
 405 410 415
 Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
 420 425 430
 Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn

 435 440 445
 Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu
 450 455 460
 Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
 465 470 475 480
 Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
 485 490 495
 Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys

 500 505 510
 Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
 515 520 525
 Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu
 530 535 540
 Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser

 565 570 575
 Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala
 580 585 590
 Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu
 595 600 605

Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val
610 615 620
Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His
625 630 635 640
Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala
645 650 655
Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
660 665 670
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val
675 680 685
Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys
690 695 700
Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
705 710 715 720
Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735
Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
740 745 750
Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro
755 760 765
Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
770 775 780
Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
785 790 795 800
Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
805 810 815
Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
820 825 830
Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
835 840 845
<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
epitope of CD22 bound by REGN5837 (mAb33037P2)"

<400> 57

Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro

1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser

20 25

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
epitope of CD22 bound by REGN5837 (mAb33037P2)"

<400> 58

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn

1 5 10 15

Phe

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
epitope of CD22 bound by REGN5838 (mAb33041P2)"

<400> 59

Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu

1 5 10 15

Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu

20

25

30

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 60

His His His His His His

1

5

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<400> 66

000

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71

000

<210> 72

<400> 72

000

<210> 73

<400> 73

000

<210> 74

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser

35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

	85		90		95	
Phe	Tyr	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr
		Val	Asn	Gln	Thr	Asp
				Ile	Tyr	Phe
					Cys	
	100		105		110	
Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro
		Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp
				Asn	Glu	Lys
					Ser	
	115		120		125	
Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val
		Lys	Gly	Lys	His	Leu
			Cys	Pro	Ser	Pro
	130		135		140	
Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys
		Pro	Phe	Trp	Val	Leu
			Val	Val	Val	Gly
	145		150		155	
					160	
Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser
		Leu	Leu	Val	Thr	Val
			Ala	Phe	Ile	Ile
		165		170		175
Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg
		Ser	Arg	Leu	Leu	His
			Ser	Asp	Tyr	Met
	180		185		190	
Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro
		Gly	Pro	Thr	Arg	Lys
			His	Tyr	Gln	Pro
	195		200		205	
Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe
		Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser
	210		215		220	