



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월12일

(11) 등록번호 10-2531517

(24) 등록일자 2023년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7004568(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년07월04일

심사청구일자 2022년03월11일

(85) 번역문제출일자 2022년02월10일

(65) 공개번호 10-2022-0025210

(43) 공개일자 2022년03월03일

(62) 원출원 특허 10-2016-7002903
원출원일자(국제) 2014년07월04일

심사청구일자 2019년07월03일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/064326

(87) 국제공개번호 WO 2015/001085

국제공개일자 2015년01월08일

(30) 우선권주장
PCT/EP2013/064330 2013년07월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007042261 A2*

WO2012143524 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

젠맵 에이/에스

덴마크 1560 코펜하겐 브이 칼베보드 브뤼게 43

(72) 발명자

반 덴 브링크, 에드워드

네덜란드 엔엘-3584 쉐이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

네에이센, 조스트 예이.

네덜란드 엔엘-3584 쉐이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 이에리

(54) 발명의 명칭 인간화 또는 키메라 CD3 항체

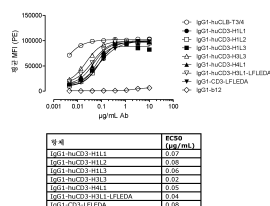
(57) 요약

본 발명은 CD3에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 이중특이적 항체, 조성물, 제약 조성물, 질환의 치료에서 상기 항체의 용도, 및 치료 방법에 관한 것이다.

[대표도]

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



도 1a, 도 1b

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/574 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

(72) 발명자

라브레인, 아란 프랑크

네덜란드 엔엘-3584 셰이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

메이스터스, 요이스

네덜란드 엔엘-3584 셰이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

스취르만, 야닌

네덜란드 엔엘-3584 셰이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

파렌, 파울

네덜란드 엔엘-3584 셰이엠 위트레흐트 예일란 60
젠맵 비.브이. 내

(30) 우선권주장

PCT/EP2014/050340 2014년01월09일

유럽특허청(EPO)(EP)

PA 2014 00009 2014년01월09일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

각각 서열 1, 2, 및 3에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 각각 서열 4에 제시된 서열, 서열 GTN, 및 서열 5에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 결합 영역을 포함하고,

상기 VH 영역은 서열 6에 제시된 아미노산 서열에 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖고, 상기 VL 영역은 서열 10에 제시된 아미노산 서열에 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 가지며,

인간, 시노몰거스(cynomolgus) 및 레서스(rhesus) 원숭이 CD3에 결합하는 능력을 갖는 것인, 인간 CD3에 결합하는 전장 인간화 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VH 영역이

- a) 서열 6에 제시된 VH 서열;
- b) 서열 8에 제시된 VH 서열;
- c) 서열 7에 제시된 VH 서열; 및
- d) 서열 9에 제시된 VH 서열

로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 VL 영역이

- a) 서열 10에 제시된 VL 서열;
- b) 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- c) 서열 12에 제시된 VL 서열

로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 VH 영역이 서열 6에 제시된 VH 서열을 갖고, 상기 VL 영역이 서열 10에 제시된 VL 서열을 갖는 것인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택된 이소형의 제1 및 제2 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, IgG1 클래스 또는 그의 동종이형의 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소하도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정되는 것인 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정되는 것인 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 측정되는 것인 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하며, 여기서 상기 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 하나 이상의 아미노산이 각각 L, L, D, N, 및 P가 아닌 것인 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산이 각각 L 및 L이 아닌 것인 항체.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산이 각각 F 및 E; 또는 A 및 A인 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산이 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A인 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산이 각각 F, E, 및 A인 항체.

청구항 16

제14항에 있어서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산이 각각 F, E, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P인 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, IgG1m(za) 동종이형의 이뮤노글로불린의 중쇄 또는 서열 15에 제시된 IgG1m(f) 동종이형의 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 18

제6항에 있어서, 각각의 중쇄 이소형이 카파(κ) 또는 람다(λ) 경쇄와 조합될 수 있는 것인 항체.

청구항 19

제1항에 따른 항체의 제1 결합 영역, 및 상기 제1 항원 결합 영역과는 상이한 표적에 결합하는 제2 결합 영역을

포함하는 이중특이적 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체가 제1 및 제2 중쇄를 포함하는 것인 이중특이적 항체.

청구항 21

제20항에 있어서,

- a) 상기 이중특이적 항체가 제8항에 따라 변형된 Fc 영역을 포함하거나; 또는
- b) 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나가 제11항에 정의된 바와 같이 변형된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것인

이중특이적 항체.

청구항 22

제19항에 있어서, 각각의 상기 제1 및 제2 중쇄가 적어도 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역을 포함하고, 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 대응하는 위치의 적어도 하나의 아미노산이 치환되고, 상기 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 대응하는 위치의 적어도 하나의 아미노산이 치환되고, 상기 제1 및 상기 제2 중쇄가 동일한 위치에서 치환되지는 않은 것인 이중특이적 항체.

청구항 23

제22항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산이 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산이 상기 제2 중쇄에서 R이거나, 또는 그 반대인 이중특이적 항체.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 제1 결합 영역이 제1항에 따른 것이고, 상기 제2 결합 영역이 상기 제1 결합 영역과는 상이한 표적에 결합하는 것인 이중특이적 항체.

청구항 25

하기 (i) 및 (ii)의 핵산 서열을 모두 포함하는 발현 벡터, 또는 하기 (i)의 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터 및 하기 (ii)의 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터의 세트:

- (i) 제1항에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열;
- (ii) 제1항에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열.

청구항 26

제25항에 따른 발현 벡터 또는 발현 벡터의 세트를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 재조합 진핵, 재조합 원핵, 또는 재조합 미생물 숙주 세포인 숙주 세포.

청구항 28

제1항에 따른 항체 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체를 포함하는, 암, 감염성 질환, 또는 자가면역 질환 치료용 조성물.

청구항 29

제1항에 따른 항체 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암, 감염성 질환, 또는 자가면역 질환 치료용 제약 조성물.

청구항 30

- a) 제26항에 따른 숙주 세포를 배양하고;
- b) 배양 배지로부터 제1항에 따른 항체, 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 제1항에 따른 항체, 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체를 생산하는 방법.

청구항 31

제1항에 따른 항체, 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물.

청구항 32

- a) 제1항에 따른 항체 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체와 CD3 사이의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 샘플을 상기 항체 또는 이중특이적 항체와 접촉시키고,
- b) 복합체의 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내에서 CD3 항원, 또는 CD3을 발현하는 세포의 존재를 검출하는 방법.

청구항 33

- i) 제1항에 따른 항체, 또는 제19항에 따른 이중특이적 항체; 및
- ii) 키트의 사용 설명서를 포함하는, 샘플 내에서 CD3 항원, 또는 CD3을 발현하는 세포의 존재를 검출하기 위한 키트.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 CD3에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체, 상기 인간화 또는 키메라 항체를 포함하는 조성물, 및 질환의 치료에서 상기 인간화 또는 키메라 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분화 집단 (Cluster of Differentiation) 3 (CD3)은 수년 동안 알려졌고, 따라서 많은 측면에서 관심의 대상이었다. 구체적으로, CD3, 또는 CD3이 그의 일부인 T-세포 수용체 복합체에 대해 유도된 항체가 알려져 있다. 5개의 인간화 OKT3 이펙터 기능 변이체 항체의 시험관 내 특성화가 설명된 바 있다 [1].

[0003] 항-CD3 모노클로날 항체 hOKT3감마1(Ala-Ala)를 사용한 치료는 지속적인 면역억제성 약물 치료의 부재 하에 제1형 당뇨병의 발병 후에 적어도 2년 동안 C-펩티드 반응 및 임상 파라미터를 개선한다 [2].

[0004] 표적화된 항체 요법을 개선하기 위한 유망한 방법은 세포독성 세포를 특이적으로 항원-발현 암세포에 전달하는 것이다. 종양 세포의 효율적인 사멸을 위해 T-세포를 사용하는 상기 개념은 문헌에 기재되어 있다 [3]. 그러나, 초기 임상 연구는 주로 낮은 효율, 심각한 부작용 (시토카인 폭풍 (storm)) 및 이중특이적 항체의 면역원성 때문에 다소 실망스러웠다 [4]. 이중특이적 항체의 설계 및 적용의 발전은 시토카인 폭풍의 초기 장벽을 부분적으로 극복하였고, 용량 제한 독성을 보이지 않으면서 임상 효과를 개선하였다 [5].

[0005] 예를 들어, 한 아암 (arm)으로 종양 세포 상의 항원을, 다른 아암으로, 예를 들어 T 세포 상의 CD3을 표적화하는 특정 이중특이적 항체는 Fc 영역에 의한 Fc 수용체 결합을 제공한다. 결합시에, T 세포, 종양 세포 및 항체 Fc 영역에 결합하는 이펙터 세포의 복합체가 형성되고, 이것은 종양 세포의 사멸을 유도한다 [4]. 카툼악소맵은 마우스 IgG2a/랫트 IgG2b 이중이량체로 이루어지고, 복강내 적용 후에 암-연관 복수의 치료에 성공적인 것으로 밝혀졌다 [6]. 그러나, 마우스/랫트 하이브리드는 면역원성이고 [7], 인간의 장기간 정맥내 치료를 위해 적용될 수 없다. 카툼악소맵에 기인한 빈번한 치료와 관련된 유해한 사건은 시토카인-방출 관련 증상 (즉, 발열, 메스꺼움, 구토, 한기, 심계항진 및 저혈압)을 포함하였고 [8]-[9], 이것은 카툼악소맵의 Fc 영역의 이펙터 기능과 관련된다. 또 다른 항체는 낮은 HER2 발현을 보이는 세포주에서 세포독성을 유도하는 에르투막소맵 (HER2xCD3)이다. 에르투막소맵은 전이성 유방암에 대한 II상 임상이 진행 중이다 [10]-[11].

[0006] 시노몰거스 (cynomolgus) 및/또는 레서스 (rhesus) 원숭이 CD3에 교차반응성인 CD3 항체가 문헌에 설명되어 있지만 [12]-[13], 상기 교차반응성 항체에 대한 추가의 개선이 필요하다.

발명의 내용

[0007] **발명의 개요**

[0008] 본 발명의 목적은 인간화 또는 키메라 CD3 항체를 제공하는 것이다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 인간 CD3에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체에 관한 것이고, 여기서 상기 항체는 각각 서열 1, 2, 및 3에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 각각 서열 4에 제시된 서열, 서열 GTN, 및 서열 5에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 결합 영역을 포함한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체의 제1 결합 영역, 및 상기 제1 항원 결합 영역과는 상이한 표적에 결합하는 제2 결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 구조물에 관한 것이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (i) 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, (ii) 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, 또는 (iii) (i)과 (ii) 둘 모두를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체, 조성물, 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체, 조성물, 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체, 조성물, 또는 제약 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0018] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체, 조성물 또는 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CD3-발현 세포의 관련 또는 축적을 특징으로 하는 질환의 진단 방법에 관한 것이고, 임의로 상기 인간화 또는 키메라 항체는 검출가능한 작용제로 표지된다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) 본 발명에 따른 숙주 세포를 배양하고, b) 배양 배지로부터 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체의 생산 방법에 관한 것이다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) 항체 또는 이중특이적 항체와 CD3 사이의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 샘플을 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체와 접촉시키고, b) 복합체의 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내에서 CD3 항원, 또는 CD3을 발현하는 세포의 존재를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 i) 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체, 및 ii) 키트의 사용 설명서를 포함하는, 샘플 내에서 CD3 항원, 또는 CD3을 발현하는 세포의 존재를 검출하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체에 결합하는 항-이디오타입 (idiotypic) 항체에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1: (도 1a) IgG1-huCD3의 단일특이적 항체 변이체 및 (도 1b) 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 huCD3xHER2의 인간 T-세포주 Jurkat에 대한 결합 곡선을 도시한 것이다. 제시된 데이터는 실시예 2에 설명된 바와 같은 하나

의 대표적인 실험의 평균 형광 강도 (MFI)이다. 표는 최대 결합의 1/2을 유도하는 항체 농도 ($\mu\text{g/mL}$) (EC50)를 보여준다.

도 2: 시노물거스 T-세포주 HSC-F에 대한 (도 2a) IgG1-huCD3의 단일특이적 항체 변이체 및 (도 2b) 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 huCD3xHER2의 결합 곡선을 도시한 것이다. 제시된 데이터는 실시예 2에 설명된 바와 같은 하나의 대표적인 실험의 평균 형광 강도 (MFI)이다.

도 3: IgG1-huCD3 항체 변이체에 의한 T-세포 활성화. PBMC 배양액 내에서 인간 (도 3a) 및 시노물거스 (도 3b) 기원으로부터의 T-세포 상에서 CD69의 발현을 실시예 3에 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 측정하였다. 이들 실험을 2회 수행하고, 한 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 4: IgG1-huCD3 항체 변이체에 의해 유도된 T-세포 증식. 인간 (도 4a) 또는 시노물거스 (도 4b) PBMC를 IgG1-huCD3 항체 변이체와 함께 3일 동안 인큐베이션하고, 그 후 실시예 4에 설명된 바와 같이 세포 증식 ELISA에 의해 증식을 측정하였다. 2개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 5: 비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 huCD3 항체 변이체에 의한 인간 (도 5a) 및 시노물거스 (도 5b) T-세포-매개 세포독성의 유도를 실시예 5에 설명된 바와 같이 결정하였다. 2개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 6: 인간 T-세포주 Jurkat에 대한 IgG1-huCD3의 비-활성화, 단일특이적 항체 변이체 (도 6a) 및 비-활성화, 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1-huCD3xHER2 (도 6b)의 결합 곡선을 도시한 것이다. 제시된 데이터는 실시예 2에 설명된 바와 같은 하나의 대표적인 실험의 평균 형광 강도 (MFI)이다. 표는 최대 결합의 1/2을 유도하는 항체 농도 ($\mu\text{g/mL}$) (EC50)를 보여준다.

도 7: 시노물거스 T-세포주 HSC-F에 대한 IgG1-huCD3의 비-활성화, 단일특이적 항체 변이체 (도 7a) 및 비-활성화, 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1-huCD3xHER2 (도 7b)의 결합 곡선을 도시한 것이다. 제시된 데이터는 실시예 2에 설명된 바와 같은 하나의 대표적인 실험의 평균 형광 강도 (MFI)이다. 표는 최대 결합의 1/2을 유도하는 항체 농도 ($\mu\text{g/mL}$) (EC50)를 보여준다.

도 8: 비-활성화 단일특이적 IgG1-huCD3 (도 8a 및 b) 또는 비-활성화 이중특이적 bsIgG1-huCD3xHER2 항체 변이체 (도 8c 및 d)에 의한 T-세포 활성화. PBMC 배양액 내에서 인간 (도 8a 및 c) 및 시노물거스 (도 8b 및 d) 기원으로부터의 T-세포 상에서 CD69의 발현을 실시예 3에 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 측정하였다. 이들 실험을 2회 수행하고, 한 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 9: 비-활성화 단일특이적 IgG1-huCD3 (도 9a 및 b) 또는 비-활성화 이중특이적 bsIgG1-huCD3xHER2 항체 변이체 (도 9c 및 d)에 의해 유도된 T-세포 증식. T-세포 증식은 다양한 항체 변이체와 함께 3일 동안 인큐베이션한 인간 (도 9a 및 c) 또는 시노물거스 (도 9b 및 d) PBMC 내에서 측정하였고, 이때 증식은 실시예 4에 설명된 바와 같이 세포 증식 ELISA에 의해 측정하였다. 2개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 10: 비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 huCD3 항체 변이체에 의한 인간 (도 10a) 및 시노물거스 (도 10b) T-세포-매개 세포독성의 유도를 실시예 5에 설명된 바와 같이 결정하였다. 이중으로 수행된 2개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 11: IgG1-huCD3 항체 변이체에 의한 레서스 T-세포 활성화. PBMC 배양액 내에서 레서스 기원으로부터의 T-세포 상에서 CD69의 발현을 실시예 6에 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 측정하였다.

도 12: huCLB-T3/4 항체의 비-활성화 변이체에 의한 T-세포 활성화. IgG1-huCLB-T3/4 변이체를 PBMC 상에서 측정하였다. PBMC 배양액 내에서 T-세포 상에서 CD69의 발현을 실시예 7에 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 측정하였다. 3개의 실험의 대표적인 예가 제시된다.

도 13: huCLB-T3/4 항체의 비-활성화 변이체에 의한 T-세포 증식. PBMC를 항체와 함께 3일 동안 인큐베이션한 후, 실시예 8에 설명된 바와 같이 세포 증식 ELISA에 의해 증식을 측정하였다. 2개의 독립적인 실험으로부터의 대표적인 결과를 제시한다.

도 14: CD3 항체의 비-활성화 항체 변이체에 의해 유도된 시험관 내 T-세포-매개 세포독성. 항체 변이체 (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, LFLEDANQPS [도 14a-g])에 의한 T-세포-매개 세포독성의 유도를 실시예 9에 설명된 바와 같이 결정하였다. 이중으로 수행된 실험으로부터의 평균을 제시한다.

도 15: 비-활성화 huCLB-T3/4 변이체에 의해 유도된 시험관 내 T-세포 매개 세포독성. 항체 변이체 (LFLEDA

LAL [도 15a-c])에 의한 T-세포 매개 세포독성의 유도를 실시예 9에 설명된 바와 같이 결정하였다. 이중으로 수행된 한 실험으로부터의 평균이 제시된다.

도 16: 비-활성화 huCLB-T3/4 항체 변이체에 대한 C1q의 결합의 평가. 단일특이적 IgG1 huCLB-T3/4 (도 16a-c) 및 bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 (도 b-d) 및 그의 비-활성화 항체 변이체에 대한 C1q의 결합을 실시예 10에 설명된 바와 같이 ELISA에 의해 평가하였다. 그래프 내의 결과는 n = 2 실험에 대한 결과를 나타낸다.

도 17: 비-활성화 huCLB-T3/4 항체 변이체의 약동학 (PK) 분석을 실시예 11에 설명된 바와 같이 야생형 IgG1-huCLB-T3/4 항체와 비교하였다. 인간 IgG1의 혈장 농도를 시간에 대해 플로팅하였다 (도 17a). 혈장 클리어런스를 실시예 11에 설명된 바와 같이 계산하였다 (도 17b). 가로 점선은 SCID 마우스에서 인간 IgG1 항체의 평균 클리어런스 (10 mL/일/kg)를 나타낸다.

도 18: 건강한 HLA-형 공여자 사이에서 양성 T-세포 반응의 빈도. 증식 및 IL-2 분비 검정 둘 모두에서 ≥ 1.9 의 SI 지수를 양성 반응으로 간주하였다. 진찰실에서 높은 수준의 면역원성을 보이고 에피스크린(EpiScreen) 검정에서 일상적으로 20-30% T-세포 반응을 유도하는, 인간화 A33을 임상 벤치마크 (benchmark) 대조군 항체로서 사용하였다. PBMC 품질을 검토하기 위해 (해동 후에) KLH 반응을 포함시켰다.

도 19: 본 발명에 따른 인간화 CD3 항체의 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 가변 영역의 서열 정렬.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

발명의 상세한 설명

[0026]

한 측면에서, 본 발명은 인간 CD3에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체에 관한 것이고, 여기서 상기 항체는 각각 서열 1, 2, 및 3에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 (VH) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 각각 서열 4에 제시된 서열, 서열 GTN, 및 서열 5에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 (VL) 영역 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 결합 영역을 포함한다.

[0027]

본원에서 사용되는 용어 "항체"는 유의한 시간, 예컨대 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등의 반감기, 또는 임의의 다른 관련된 기능적으로 규정된 시간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합과 연관된 생리학적 반응의 유도, 촉진, 향상 및/또는 조정에 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하기에 충분한 시간)으로 전형적인 생리학적 조건 하에 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들의 유도체를 나타내고자 의도된다. 항원과 상호작용하는 결합 영역 (또는 본원에서 또한 사용될 수 있는 결합 도메인, 두 용어는 동일한 의미를 가짐)은 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 가변 영역을 포함한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포 및 T-세포) 및 보체계의 성분, 예컨대 보체 활성화의 고전적 경로의 제1 성분인 C1q를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 상기 나타난 바와 같이, 본원에서 사용되는 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥상 분명하게 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 상호작용하는, 예컨대 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 용어 "항체" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) Fab' 또는 Fab 단편, 즉 V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편, 또는 WO2007059782 (젠맵 A/S (Genmab A/S))에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 즉 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) 필수적으로 V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 및 (iv) 필수적으로 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인 V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 V_L 및 V_H 영역이 페어링하여 1가 분자 (단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv (scFv)로 알려짐, 예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)] 및 [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 형성되도록 할 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다. 상기 단일쇄 항체는 달리 언급되거나 문맥상 분명하게 모순되지 않는 한, 용어 항체 내에 포함된다. 상기 단편이 일반적으로 항체의 의미 내에 포함되지만, 이들은 종합적으로 및 각각 독립적으로 상이한 생물학적 특성 및 유용성을 보이는 본 발명의 특유한 특징이다. 본 발명의 측면에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편이 본원에서 추가로 논의된다. 또한, 용어 항체는 달리 특정되지 않으면, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 알려진 기술, 예컨대 효소에 의한 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 기술에 의해 제공되는, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체 단편

(항원-결합 단편)을 또한 포함함을 이해하여야 한다. 생성되는 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 "이뮤노글로불린 중쇄", "이뮤노글로불린의 중쇄" 또는 "중쇄"는 이뮤노글로불린의쇄 중의 하나를 나타내고자 의도된다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭됨) 및 이뮤노글로불린의 이소형을 규정하는 중쇄 불변 영역 (본원에서 CH로 약칭됨)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 일반적으로 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 힌지 영역을 추가로 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "이뮤노글로불린"은 폴리펩티드 쇄의 2개의 쌍 (저 분자량 경쇄 (L)의 한 쌍 및 중쇄 (H)의 한 쌍)으로 이루어진 구조상 관련된 당단백질의 클래스를 나타내고자 의도되고, 여기서 4개의 쇄는 모두 디설피드 결합에 의해 잠재적으로 상호 연결된다. 이뮤노글로불린의 구조의 특성은 밝혀져 있다 (예를 들어 [14] 참조). 이뮤노글로불린의 구조 내에서, 2개의 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설피드 결합을 통해 상호 연결된다. 중쇄와 마찬가지로, 각각의 경쇄는 일반적으로 다음과 같은 몇 개의 영역으로 이루어진다; 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 CL로 약칭됨). 경쇄 불변 영역은 일반적으로 하나의 도메인, 즉 CL로 이루어진다. 또한, VH 및 VL 영역은 보다 보존된 프레임워크 영역 (FR)으로 칭하는 영역이 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 칭해지는 초가변성의 영역 (또는 서열이 초가변성일 수 있는 초가변 영역 및/또는 구조상 규정된 루프)으로 다시 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 일반적으로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 ([15] 참조). CDR 서열은 IMGT에서 제공된 방법을 이용하여 결정할 수 있다 [16]-[17].

[0029] 본원에서 사용되는 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 클래스 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM) 또는 그의 임의의 동종이형, 예컨대 IgG1m(za) 및 IgG1m(f) [서열 15]를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 IgG1 클래스 또는 그의 임의의 동종이형의 이뮤노글로불린의 중쇄를 포함한다. 또한, 각각의 중쇄 이소형은 카파(κ) 또는 람다(λ) 경쇄와 조합될 수 있다.

[0030] 본원에서 사용되는 용어 "키메라 항체"는 가변 영역이 비-인간 종으로부터 유래하고 (예를 들어 설치류로부터 유래하고) 불변 영역이 상이한 종, 예컨대 인간으로부터 유래하는 것인 항체를 나타낸다. 키메라 항체는 항체 조작에 의해 생성될 수 있다. "항체 조작"은 상이한 종류의 항체 변형에 대해 일반적으로 사용되고 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 대한 용어이다. 특히, 키메라 항체는 [18]에서 표준 DNA 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 따라서, 키메라는 유전자 조작된 또는 효소에 의해 조작된 재조합 항체일 수 있다. 키메라 항체를 생성하는 것은 통상의 기술자의 지식 범위 내에 포함되고, 따라서, 본 발명에 따른 키메라 항체의 생성은 본원에서 설명되는 바와 다른 방법에 의해 수행될 수 있다. 치료 용도를 위한 키메라 모노클로날 항체가 항체 면역원성을 감소시키기 위해 개발된다. 이들은 일반적으로 비-인간 (예를 들어 관심있는 항원에 특이적인 뮤린 (murine)) 가변 영역, 및 인간 불변 항체 중쇄 및 경쇄 도메인을 함유할 수 있다. 키메라 항체의 측면에서 사용되는 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 이뮤노글로불린의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하는 영역을 나타낸다.

[0031] 본원에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 인간 항체 불변 도메인 및 인간 가변 도메인에 대한 높은 수준의 서열 상동성을 갖도록 변형된 비-인간 가변 도메인을 포함하는 유전자 조작된 비-인간 항체를 나타낸다. 이것은 함께 항원 결합 부위를 형성하는 6개의 비-인간 항체 상보성 결정 영역 (CDR)을 상동성 인간 수용자 프레임워크 영역 (FR) 상에 이식 (grafting)함으로써 달성될 수 있다 ([19]-[20] 참조). 모 항체의 결합 친화도 및 특이성을 완전히 재구성하기 위해, 모 항체 (즉, 비-인간 항체)로부터의 프레임워크 잔기의 인간 프레임워크 영역 내로의 치환 (역-돌연변이)이 필요할 수 있다. 구조적 상동성 모델링은 항체의 결합 특성에 중요한 프레임워크 영역 내의 아미노산 잔기를 확인하는 것을 도울 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열, 1차적으로 비-인간 아미노산 서열에 하나 이상의 아미노산 역-돌연변이를 임의로 포함하는 인간 프레임워크 영역, 및 완전한 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 임의로, 바람직한 특징, 예컨대 친화도 및 생물화학적 특성을 갖는 인간화 항체를 얻기 위해, 반드시 역-돌연변이일 필요는 없는 추가의 아미노산 변형이 적용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 인간화 또는 키메라 항체는 "인간화 또는 키메라 CD3 항체", "본 발명의 인간화 또는 키메라 항체", "CD3 항체", 또는 "본 발명의 CD3 항체"로 칭할 수 있고, 이들은 문맥상 모순되지 않는 한 모두 동일한 의미 및 목적을 갖는다.

[0033] 비-인간 기원의 항체의 아미노산 서열은 인간 기원의 항체와 별개의 것이고, 따라서 비-인간 항체는 인간 환자에게 투여될 때 잠재적으로 면역원성이다. 그러나, 항체의 비-인간 기원에도 불구하고, 그의 CDR 절편은 그의 표적 항원에 결합하는 항체의 능력을 책임지고, 인간화는 항체의 특이성 및 결합 친화도를 유지하는 것을 목적

으로 한다. 따라서, 비-인간 치료 항체의 인간화는 상기 인간화 항체가 비-인간 기원의 항체의 특이성 및 결합 친화도를 동시에 유지하면서 인간에서 그의 면역원성을 최소화하기 위해 수행된다.

[0034] 본원에서 사용되는 용어 "결합 영역"은 예를 들어 세포, 박테리아, 또는 비리온에 존재하는 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체의 영역을 나타낸다.

[0035] 본원에서 사용되는 용어 "결합"은 항체의 미리 결정된 항원 또는 표적에 대한 결합을 나타내고, 여기서 결합은 일반적으로 예를 들어 항원을 리간드로서, 항체를 분석물로서 사용하여 BIAcore 3000 기기로 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정시에 약 10^{-6} M 이하, 예를 들어 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 또는 더 미만의 K_D 에 대응하는 친화도로 이루어지고, 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련되는 항원 이외의 다른 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 10배 더 낮은, 예컨대 적어도 100배 더 낮은, 예를 들어 적어도 1,000배 더 낮은, 예컨대 적어도 10,000배 더 낮은, 예를 들어 적어도 100,000배 더 낮은 K_D 에 대응하는 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 정도는 항체의 K_D 에 의존적이기 때문에, 항체의 K_D 가 매우 낮을 때 (즉, 항체는 고도로 특이적일 때), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 정도는 적어도 10,000배일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 " K_D " (M)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 나타낸다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "인간 CD3"은 T-세포 공수용체 단백질 복합체의 일부이고 4개의 별개의쇄로 이루어진 인간 분화 집단 3 단백질을 나타낸다. 또한, CD3은 다른 종에서 발견되고, 따라서, 용어 "CD3"은 본원에서 사용될 수 있고, 문맥상 모순되지 않으면 인간 CD3으로 제한되지 않는다. 포유동물에서, 복합체는 CD3 γ (감마)쇄 (인간 CD3 γ 쇄 스위스프룻(Swissprot) P09693, 또는 시노몰거스 원숭이 CD3 γ 스위스프룻 Q95LI7), CD3 δ (델타)쇄 (인간 CD3 δ 스위스프룻 P04234, 또는 시노몰거스 원숭이 CD3 δ 스위스프룻 Q95LI8), 2개의 CD3 ϵ (엡실론)쇄 (인간 CD3 ϵ 스위스프룻 P07766; 또는 시노몰거스 CD3 ϵ 스위스프룻 Q95LI5), 레서스 CD3 ϵ (스위스프룻 G7NCB9), 및 CD3 ζ (제타)쇄 (인간 CD3 ζ 스위스프룻 P20963, 시노몰거스 원숭이 CD3 ζ 스위스프룻 Q09TK0)를 포함한다. 이들쇄는 T-세포 수용체 (TCR)로 알려진 분자와 회합하고, T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 포함한다.

[0037] 스위스프룻 번호로 언급되는 아미노산 서열이 단백질의 번역 후에 제거되는 신호 펩티드를 포함하는 것은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 따라서, 세포 표면에 존재하는 단백질, 예컨대 CD3은 신호 펩티드를 포함하지 않는다. 특히, 표 1에 제시된 아미노산 서열은 상기 신호 펩티드를 포함하지 않는다. 표 1에 제시된 상기 단백질은 "성숙 단백질"로 칭할 수 있다. 따라서, 서열 14는 성숙 인간 CD3 δ (델타)의 아미노산 서열을 보여주고, 서열 13은 성숙 인간 CD3 ϵ (엡실론)의 아미노산 서열을 보여주고, 서열 21은 성숙 시노몰거스 CD3 ϵ 의 아미노산 서열을 보여주고, 서열 23은 성숙 레서스 CD3 ϵ 의 아미노산 서열을 보여준다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "성숙"은 임의의 신호 또는 리더 서열을 포함하지 않는 단백질을 나타낸다.

[0038] 신호 펩티드 서열 상동성, 길이, 및 절단 부위 위치가 상이한 단백질 사이에서 유의하게 상이함은 공지되어 있다. 단일 펩티드는 상이한 방법에 의해 결정할 수 있고, 예를 들어 본 발명의 서열 13은 SignalP 적용 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>에서 이용가능함)에 따라 결정되었다.

[0039] 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체는 CD3의 엡실론쇄, 예컨대 인간 CD3의 엡실론쇄 (서열 13)에 결합한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체는 인간 CD3 ϵ (엡실론) (서열 13)의 N-말단부의 아미노산 1-27 내의 에피토프에 결합한다. 상기 특정 실시양태에서, 항체는 심지어 다른 비-인간 영장류 종, 예컨대 시노몰거스 원숭이 (시노몰거스 CD3 엡실론 서열 21) 및/또는 레서스 원숭이 (레서스 CD3 엡실론 서열 23)와 교차-반응할 수 있다.

[0040] 본원에서 사용되는 용어 "교차-반응하다"는 항체, 예컨대 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 상이한 종 내의 그의 표적에 결합하는 능력을 나타낸다. 특히, 본원에서 설명되는 실시예에서 예시되는 인간화 CD3 항체는 인간 (실시예 2), 시노몰거스 (실시예 2) 및 레서스 원숭이 CD3에 모두 결합하는 능력을 갖는다.

[0041] 프레임워크 영역을 추가로 포함하는, 본원에서 규정되는 CDR 서열을 포함하는 본 발명에 따른 항체는 본래의 항체에 비해 CDR 서열 외부의 서열이 상이할 수 있지만, 완전한 결합 능력을 계속 보유한다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 임의의 서열에 특정 서열 동일성을 갖는 가변 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체에 관한 것이다.

- [0042] 본 발명의 측면에서 사용되는 용어 "서열 동일성"은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭 (gap)의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수 (즉, % 상동성 = [동일한 위치의 #/위치의 총 #] x 100)로서의 두 서열 간의 동일성 %를 나타낸다. 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 %는 이. 마이어스 (E. Meyers) 및 더블유. 밀러 (W. Miller) [21]의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 동일성 %는 니들만 (Needleman) 및 분쉬 (Wunsch) 알고리즘 [22]을 이용하여 결정될 수 있다. 다중 정렬은 바람직하게는 Clustal W 알고리즘 [23] (예를 들어, 벡터 (Vector) NTI 어드밴스 (Advance)® 소프트웨어 버전 11.5; 인비트로젠 인크. (Invitrogen Inc.))을 이용하여 수행한다.
- [0043] 따라서, 한 실시양태에서, VH 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:
- [0044] a) 서열 6에 제시된 VH 서열;
- [0045] b) 서열 8에 제시된 VH 서열;
- [0046] c) 서열 7에 제시된 VH 서열; 및
- [0047] d) 서열 9에 제시된 VH 서열.
- [0048] 한 특정 실시양태에서, VH 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 96% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:
- [0049] a) 서열 6에 제시된 VH 서열;
- [0050] b) 서열 8에 제시된 VH 서열;
- [0051] c) 서열 7에 제시된 VH 서열; 및
- [0052] d) 서열 9에 제시된 VH 서열.
- [0053] 한 실시양태에서, VL 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:
- [0054] a) 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0055] b) 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- [0056] c) 서열 12에 제시된 VL 서열.
- [0057] 한 특정 실시양태에서, VL 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:
- [0058] a) 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0059] b) 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- [0060] c) 서열 12에 제시된 VL 서열.
- [0061] 한 실시양태에서, VH 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다:
- [0062] a) 서열 6에 제시된 VH 서열;
- [0063] b) 서열 8에 제시된 VH 서열;
- [0064] c) 서열 7에 제시된 VH 서열; 및
- [0065] d) 서열 9에 제시된 VH 서열.
- [0066] 한 실시양태에서, VL 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다:
- [0067] a) 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0068] b) 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- [0069] c) 서열 12에 제시된 VL 서열.

- [0070] 한 실시양태에서, VH 또는 VL 서열 중 어느 하나만이 본원에 개시된 서열 중의 하나에 100% 동일하고, 다른 하나는 본원에 개시된 서열 중의 하나와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0071] 한 특정 실시양태에서, VH 서열은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖고:
- [0072] a) 서열 6에 제시된 VH 서열;
- [0073] b) 서열 7에 제시된 VH 서열;
- [0074] c) 서열 8에 제시된 VH 서열; 및
- [0075] d) 서열 9에 제시된 VH 서열;
- [0076] VL 서열은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 서열에 제시된 적어도 하나의 아미노산 서열에 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는다:
- [0077] i. 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0078] ii. 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- [0079] iii. 서열 12에 제시된 VL 서열.
- [0080] 한 실시양태에서, VH 및 VL 서열은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다;
- [0081] a) 각각 서열 6 및 10; 각각 서열 7 및 10; 각각 서열 8 및 10; 각각 서열 9 및 10; 각각 서열 6 및 11; 각각 서열 7 및 11; 각각 서열 8 및 11; 각각 서열 9 및 11; 각각 서열 6 및 12; 각각 서열 7 및 12; 각각 서열 8 및 12; 및 각각 서열 9 및 12에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VH 및 VL 서열;
- [0082] b) 각각 서열 6 및 10; 각각 서열 7 및 10; 각각 서열 8 및 10; 각각 서열 9 및 10; 각각 서열 6 및 11; 각각 서열 7 및 11; 각각 서열 8 및 11; 각각 서열 9 및 11; 각각 서열 6 및 12; 각각 서열 7 및 12; 각각 서열 8 및 12; 및 각각 서열 9 및 12에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VH 및 VL 서열;
- [0083] c) 각각 서열 6 및 10; 각각 서열 7 및 10; 각각 서열 8 및 10; 각각 서열 9 및 10; 각각 서열 6 및 11; 각각 서열 7 및 11; 각각 서열 8 및 11; 각각 서열 9 및 11; 각각 서열 6 및 12; 각각 서열 7 및 12; 각각 서열 8 및 12; 및 각각 서열 9 및 12에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VH 및 VL 서열;
- [0084] d) 각각 서열 6 및 10; 각각 서열 7 및 10; 각각 서열 8 및 10; 각각 서열 9 및 10; 각각 서열 6 및 11; 각각 서열 7 및 11; 각각 서열 8 및 11; 각각 서열 9 및 11; 각각 서열 6 및 12; 각각 서열 7 및 12; 각각 서열 8 및 12; 및 각각 서열 9 및 12에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VH 및 VL 서열;
- [0085] e) 각각 서열 6 및 10; 각각 서열 7 및 10; 각각 서열 8 및 10; 각각 서열 9 및 10; 각각 서열 6 및 11; 각각 서열 7 및 11; 각각 서열 8 및 11; 각각 서열 9 및 11; 각각 서열 6 및 12; 각각 서열 7 및 12; 각각 서열 8 및 12; 및 각각 서열 9 및 12에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VH 및 VL 서열;
- [0086] f) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0087] g) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0088] h) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0089] i) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0090] j) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0091] k) 서열 6에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VL 서열;

- [illegible]

- [illegible]

- [0155] cj) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0156] ck) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0157] cl) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0158] cm) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0159] cn) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0160] co) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0161] cp) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0162] cq) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0163] cr) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 95% 동일성을 갖는 VL 서열;
- [0164] cs) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 97% 동일성을 갖는 VL 서열; 및
- [0165] ct) 서열 9에 제시된 서열에 적어도 100% 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열 10, 11, 또는 12에 제시된 서열에 적어도 99% 동일성을 갖는 VL 서열.
- [0166] 한 실시양태에서, 결합 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 및 VL을 포함한다;
- [0167] a) 서열 6에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0168] b) 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0169] c) 서열 9에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0170] d) 서열 6에 제시된 VH 서열, 및 서열 11에 제시된 VL 서열;
- [0171] e) 서열 6에 제시된 VH 서열, 및 서열 12에 제시된 VL 서열;
- [0172] f) 서열 7에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0173] g) 서열 7에 제시된 VH 서열, 및 서열 11에 제시된 VL 서열;
- [0174] h) 서열 7에 제시된 VH 서열, 및 서열 12에 제시된 VL 서열;
- [0175] i) 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 11에 제시된 VL 서열;
- [0176] j) 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 12에 제시된 VL 서열;
- [0177] k) 서열 9에 제시된 VH 서열, 및 서열 11에 제시된 VL 서열; 및
- [0178] l) 서열 9에 제시된 VH 서열, 및 서열 12에 제시된 VL 서열.
- [0179] 특정 실시양태에서, 결합 영역은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 서열 및 VL 서열을 포함한다;
- [0180] a) 서열 6에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열;
- [0181] b) 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열; 및
- [0182] c) 서열 9에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열.

- [0183] 본 발명에 따른 인간화 항체는 인간 가변 프레임워크 영역으로 사용하기 위한 적절한 상동성 정도를 갖는 중쇄 및 경쇄 인간 서열을 확인하기 위해 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인간 배선 (germline) 가변 영역 서열의 데이터베이스에 대해 비교함으로써 생성될 수 있다. 일련의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 예를 들어 무린 CDR을 프레임워크 영역 (상기 설명된 바와 같이 확인된) 상에 이식하고, 필요한 경우 항체 결합 효율의 회복에 중요할 수 있는 확인된 잔기의 특이적 무린 서열로의 역-돌연변이 (특이적 위치(들)에서 프레임워크 영역 내의 하나 이상의 인간 아미노산 잔기의 비-인간 아미노산으로의 돌연변이)에 의해 설계될 수 있다. 인 실리코 (in silico) 기술; iTope™ 및 TCED™의 적용에 의해 결정된, 잠재적인 T-세포 에피토프의 발생률이 가장 낮은 변이체 서열을 선택할 수 있다 ([24], [25], 및 [26]).
- [0184] 또한, 본 발명에 따른 인간화 항체는 "탈면역화"될 수 있다. 탈면역화는 단백질 서열, 예컨대 본 발명에 따른 인간화 항체 내에서와 같이 요구될 수 있고, 인간 T-세포 에피토프의 존재는 이들이 헬퍼 (helper) T-세포를 활성화하는 잠재력을 갖기 때문에 면역원성 위험 프로파일을 증가시킬 수 있다. 상기 헬퍼 T-세포의 활성화는 탈면역화에 의해 방지될 수 있다. 탈면역화는 항체의 결합 친화도를 유의하게 감소시키지 않으면서 T-세포 에피토프를 제거하기 위해 인간화 항체의 아미노산 서열 내에 돌연변이를 도입함으로써 수행될 수 있다.
- [0185] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 인간화 항체는 (i) 비-인간 전체 가변 중쇄 서열 및/또는 전체 가변 경쇄 서열을 인간 배선 서열의 데이터베이스와 비교하고, (ii) 인간화 서열을 얻기 위해 비-인간 서열에 최고의 상동성을 갖는 인간 배선 서열을 선택하고, (iii) 필요한 경우 역-돌연변이(들)에 의해 인간화 서열을 최적화하고, (iv) 서열을 적합한 발현 시스템에서 발현시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있다.
- [0186] 따라서, 본 발명에 따른 전장 항체는 (i) 비-인간 가변 중쇄 서열 및 가변 경쇄 서열을 인간 배선 서열의 데이터베이스와 비교하고, (ii) 비-인간 서열에 최고의 상동성을 갖는 인간 배선 서열을 선택하고, (iii) 인간화 서열을 얻기 위해 선택된 인간 배선 내에 비-인간 CDR을 이식하고, (iv) 필요한 경우 역-돌연변이(들)에 의해 인간화 서열을 최적화하고, (v) 불변 중쇄 및 경쇄 서열을 확인하고, (vi) 완전한 중쇄 서열 및 완전한 경쇄 서열을 적합한 발현 시스템에서 발현시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 전장 항체는 실시예 1에 설명된 바와 같이 생산할 수 있다. CDR 서열 또는 전체 가변 영역 서열로부터 출발하여 전장 항체를 생산하는 것은 통상의 기술자의 지식 범위에 포함된다. 따라서, 통상의 기술자는 본 발명에 따른 전장 항체를 생성하는 방법을 알 것이다.
- [0187] 본원에서 사용되는 용어 "완전한 중쇄 서열"은 가변 중쇄 및 불변 중쇄 서열로 이루어진 서열을 의미한다.
- [0188] 본원에서 사용되는 용어 "완전한 경쇄 서열"은 가변 경쇄 및 불변 경쇄 서열로 이루어진 서열을 의미한다.
- [0189] 역-돌연변이(들)은 표준 DNA 돌연변이 유발에 의해 도입될 수 있다. 상기 DNA 돌연변이 유발을 위한 표준 기술은 문헌 [18]에 기재되어 있다. 대안적으로, 시판되는 키트, 예컨대 퀵체인지(Quickchange)™ 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타진 (Stratagene))를 사용하거나, 또는 신규 (de novo) DNA 합성에 의해 요구되는 역-돌연변이를 도입할 수 있다.
- [0190] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다.
- [0191] 키메라 항체는 비-인간 (예컨대 무린) 항체의 모든 불변 영역 서열을 인간 기원의 불변 영역 서열로 치환함으로써 생성될 수 있다. 따라서, 전체 비-인간 가변 영역 서열은 키메라 항체 내에 유지된다. 따라서, 본 발명에 따른 키메라 항체는 비-인간 가변 중쇄 (서열 27), 비-인간 가변 경쇄 서열 (서열 28), 인간 불변 중쇄 및 인간 불변 경쇄 서열을 적합한 발현 시스템에서 발현시켜 전장 키메라 항체를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산될 수 있다. 대체 방법을 사용할 수 있다. 상기 키메라 항체의 생산 방법은 통상의 기술자의 지식 범위에 포함되고, 따라서, 통상의 기술자는 본 발명에 따른 키메라 항체를 생산하는 방법을 알 것이다.
- [0192] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다.
- [0193] 한 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 본원에서 사용되는 용어 "전장 항체"는 그의 이소형의 야생형 항체에서 정상적으로 발견되는 것에 대응하는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 포함하는 항체 (예를 들어, 모 항체 또는 변이체 항체)를 나타낸다.
- [0194] 한 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.
- [0195] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 영역"은 N-말단에서 C-말단 방향으로 적어도 힌지 영역, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하는 영역을 나타낸다. Fc 영역은 힌지 영역의 N-말단부에 CH1 영역을 추가로 포함할 수 있다.

- [0196] 본원에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 힌지 영역을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 힌지 영역은 카바트 (Kabat)에서 제시된 Eu 넘버링에 따른 아미노산 216-230에 대응한다.
- [0197] 달리 언급되거나 문맥상 모순되지 않는 한, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 Eu-넘버링 지수 ([27]에 기재된)에 따라 넘버링되고, "카바트에서 제시된 Eu 넘버링에 따라", "카바트에 따른 Eu 넘버링", 또는 "Eu 넘버링 시스템에 따라"로 칭할 수 있다.
- [0198] 본원에서 사용되는 용어 "CH1 영역" 또는 "CH1 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH1 영역을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH1 영역은 Eu 넘버링 시스템에 따른 아미노산 118-215에 대응한다. 그러나, CH1 영역은 또한 본원에서 설명되는 임의의 다른 아형일 수 있다.
- [0199] 본원에서 사용되는 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH2 영역을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 Eu 넘버링 시스템에 따른 아미노산 231-340에 대응한다. 그러나, CH2 영역은 또한 본원에서 설명되는 임의의 다른 아형일 수 있다.
- [0200] 본원에서 사용되는 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 CH3 영역을 나타낸다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 Eu 넘버링 시스템에 따른 아미노산 341-447에 대응한다. 그러나, CH3 영역은 또한 본원에서 설명되는 임의의 다른 아형일 수 있다.
- [0201] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 중쇄의 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 이뮤노글로불린 중쇄는 각각의 이뮤노글로불린 클래스 내의 임의의 동종이형, 예컨대 IgG1m(f) (서열 15)일 수 있다. 따라서, 한 특정 실시양태에서, 이뮤노글로불린 중쇄의 이소형은 IgG1, 또는 그의 임의의 동종이형, 예컨대 IgG1m(f) (서열 15)이다.
- [0202] T-세포 수용체 (TCR)의 일부인 항원 CD3을 표적화할 때, 세포 사멸의 T-세포 특이적 메카니즘이 바람직하다. 다른 이펙터 기능, 예를 들어 보체 활성화는 필요없을 수 있고, 따라서, 이펙터 기능의 감소가 바람직하다. C1q 결합은 보체 캐스케이드의 제1 단계이고, 따라서 항체의 보체-의존성 세포독성 (CDC) 능력에 대한 지표로서 기능한다. 항체에 대한 C1q의 결합을 방지할 수 있으면, 보체 캐스케이드의 활성화도 방지될 수 있다.
- [0203] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99%, 또는 100% 감소하도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.
- [0204] 본원에서 사용되는 용어 "변형된"은 야생형 Fc 영역의 아미노산 서열에 동일하지 않은 Fc 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. 즉, 예를 들어, C1q에 대한 결합 부위, 다른 이펙터 분자에 대한 결합 부위 또는 Fc 수용체 (FcR)에 대한 결합을 변경하기 위해 야생형 Fc 영역의 특정 위치에서의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입된다. 상기 아미노산 서열의 변형(들)은 하나 이상의 아미노산을 보존적 아미노산으로 치환함으로써 제조될 수 있거나 또는 하나 이상의 아미노산을 야생형에 존재하는 아미노산에 물리적으로 및/또는 기능적으로 유사한 대체 아미노산으로 치환함으로써 제조될 수 있다. 치환은 또한 비-보존적 아미노산으로 치환함으로써 수행될 수 있다.
- [0205] 본 발명의 측면에서, 아미노산은 보존적 또는 비-보존적 아미노산으로 설명되고, 따라서 그에 따라 분류될 수 있다. 아미노산 잔기는 또한 대안적 물리적 및 기능적 특성에 의해 규정된 클래스로 분류될 수 있다. 따라서, 아미노산의 클래스는 하기 표의 하나 또는 둘 모두에 반영될 수 있다:

[0206] **보존적 클래스의 아미노산 잔기**

산성 잔기	D 및 E
염기성 잔기	K, R, 및 H
친수성 비하전 잔기	S, T, N, 및 Q
지방족 비하전 잔기	G, A, V, L, 및 I
비극성 비하전 잔기	C, M, 및 P
방향족 잔기	F, Y, 및 W

[0207]

[0208] 아미노산 잔기의 대안적 물리적 및 기능적 분류

알콜기 함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐-회합 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음하전 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양하전 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴 형성에 관련되는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0209]

[0210] 본 발명의 측면에서, 항체, 예컨대 인간화 또는 키메라 항체 내의 치환은 다음과 같이 표시된다:

[0211] 본래의 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산;

[0212] 아미노산의 잘 인정된 명명법을 참고로 하여, 임의의 아미노산 잔기를 나타내기 위해 코드 Xaa 및 X를 포함하는 3문자 코드, 또는 1문자 코드가 사용된다. 따라서, 표기 "L234F" 또는 "Leu234Phe"은 항체가 아미노산 위치 234에 류신의 페닐알라닌으로의 치환을 포함함을 의미한다.

[0213] 제시된 위치에서 한 아미노산의 임의의 다른 아미노산으로의 치환은 다음과 같이 언급된다:

[0214] 본래의 아미노산 - 위치 ; 또는 예를 들어 "L234".

[0215] 본래의 아미노산(들) 및/또는 치환된 아미노산(들)이 모든 아미노산(들)은 아니지만 하나 초과와 아미노산을 포함할 수 있는 변형의 경우, 하나 초과와 아미노산은 ", " 또는 "/"로 분리될 수 있다. 예를 들어, 위치 234에서 류신의 페닐알라닌, 아르기닌, 리신 또는 트립토판으로의 치환은 다음과 같이 표시된다:

[0216] "Leu234Phe,Arg,Lys,Trp" 또는 "Leu234Phe/Arg/Lys/Trp" 또는 "L234F,R,K,W" 또는 "L234F/R/K/W" 또는 "L234의 F, R, K 또는 W로의 치환".

[0217] 상기 명칭은 본 발명의 문맥에서 교환가능하게 사용될 수 있지만, 동일한 의미 및 목적을 갖는다.

[0218] 또한, 용어 "치환"은 다른 19개의 천연 아미노산 중의 임의의 하나로, 또는 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산으로의 치환을 포함한다. 예를 들어, 위치 234에서 아미노산 L의 치환은 각각의 다음 치환을 포함한다: 234A, 234C, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234P, 및 234Y. 이것은 명칭 234X와 동등한 것이고, 여기서 X는 본래의 아미노산 이외의 다른 임의의 아미노산을 나타낸다. 상기 치환은 또한 L234A, L234C 등, 또는 L234A,C 등 또는 L234A/C/ 등으로 표시될 수 있다. 이와 같은 방식은 본원에서 상기 치환의 임의의 하나를 구체적으로 포함하도록 본원에서 언급되는 각각의 및 모든 위치에 유추를 통해 적용된다.

[0219] 본 발명에 따른 항체는 또한 아미노산 잔기의 결실을 포함할 수 있다. 상기 결실은 "del"로 표시되고, 예를 들어 L234del 표기를 포함한다. 따라서, 상기 실시양태에서, 위치 234의 류신은 아미노산 서열로부터 결실되었다.

[0220] 용어 "아미노산" 및 "아미노산 잔기"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0221] 본원에서 사용되는 용어 "C1q 결합"은 항체가 그의 항원에 결합할 때 상기 항체에 대한 C1q의 결합을 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "그의 항원에 결합된"은 생체 내 및 시험관 내 둘 모두에서 그의 항원에 대한 항체의 결합을 나타낸다.

[0222] C1q 결합을 언급할 때 본원에서 사용되는 용어 "감소시키다"는 야생형 항체에 대한 C1q 결합에 비해 항체에 대한 C1q의 결합을 감소, 최소화 또는 심지어 완전히 억제하는 본 발명에 따른 항체의 능력을 나타낸다.

[0223] 본 발명에 따른 항체의 비교 검정에서의 사용과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "야생형 항체"는 불활성이 아

닌 것을 제외하고 시험되는 항체와 동일한 항체를 나타낸다. 상기 측면에서, 용어 "불활성"은 실시예 10에서 결정된 바와 같이, 즉, C1q 결합이 ELISA에 의해 결정될 경우 C1q의 결합이 감소되거나 존재하지 않는; 실시예 4에서 결정된 바와 같이, 즉, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정에서 측정된 Fc-매개 T-세포 증식이 감소되거나 존재하지 않는; 및/또는 실시예 3에서 결정된 바와 같이, 즉, PBMC-기반 기능적 검정에서 측정된 Fc-매개 CD69 발현이 감소되거나 존재하지 않는 변형된 Fc 영역을 나타낸다. 따라서, 야생형 항체는 이뮤노글로불린 중쇄에 천연 생성 아미노산을 포함하고, 즉, 항체는 예를 들어 C1q, Fc 수용체 등과 상호작용하는 항체의 능력을 변경하거나 감소시킬 수 있는 임의의 아미노산 변형을 포함하지 않는다. 따라서, 그러한 야생형 항체는 예를 들어 C1q에 결합할 수 있는 활성화 항체를 유지할 것이다. 야생형 항체 및 본 발명의 항체는 항체를 이중특이적 항체 등으로 만들기 위해, 이펙터 기능을 유도하는 항체의 능력에 영향을 주는 것과는 다른 아미노산 변형을 포함할 수 있다.

[0224] 본원에서 사용되는 용어 "ELISA"는 기질을 확인하기 위해 항체 및 색상 변화를 이용하는 시험인 효소 연결 면역 흡착 검정을 나타낸다. 제1 특이적 항체는 플레이트 표면에 부착된다. 여기에, 샘플로부터의 단백질이 첨가되고, 상기 제1 특이적 항체에 대한 결합이 시험된다. 샘플로부터의 항체에 결합하는 제2 항체를 첨가한다. 제2 항체는 효소에 연결되고, 마지막 단계에서 효소의 기질을 함유하는 물질이 첨가된다. 후속 반응은 검출가능함 신호, 가장 통상적으로는 기질의 색상 변화를 생성한다. ELISA 방법의 개념은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, ELISA를 수행하기 위한 다양한 방법이 본 발명에 따른 항체를 평가하는 방법의 일부로 고려된다. 따라서, 다양한 형태의 ELISA가 예컨대 실시예 4에서 설명되는 바와 같이 수행될 수 있기 때문에, 상기 설명은 제한하는 의미로 이해되지 않아야 한다.

[0225] 구체적으로, C1q에 결합하는 본 발명에 따른 항체의 능력은 (i) 상기 항체를 96-웰 플레이트 상에 코팅하고, (ii) 3% 혈청을 첨가하고, (iii) 항-인간 C1q 항체를 첨가하고, (iv) 플레이트를 성숙시키고, (v) OD₄₀₅ nm에서 측정하는 단계를 포함하는 ELISA에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형된 Fc 영역을 포함하고, 여기서 C1q 결합은 (i) 상기 항체를 96-웰 플레이트 상에 코팅하고, (ii) 3% 혈청을 첨가하고, (iii) 항-인간 C1q를 첨가하고, (iv) 플레이트를 성숙시키고, (v) OD₄₀₅ nm에서 측정하는 단계를 포함하는 ELISA에 의해 결정될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, C1q의 결합은 실시예 10에 설명된 바와 같이 평가한다.

[0226] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 특정 세포의 표면에서 발견되는 단백질을 나타낸다. FcR은 항체의 Fc 영역에 결합한다. 이들이 인식하는 항체의 종류를 기초로 하여 분류되는 몇몇의 상이한 종류의 FcR이 존재한다. 예를 들어, Fc γ (감마) 수용체는 IgG 클래스의 항체에 결합한다.

[0227] 본원에서 사용되는 용어 "Fc γ 수용체", "Fc 감마 수용체" 또는 "Fc γ R"은 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 Fc 수용체의 군을 나타내고, 옹소닌화된 (opsonized) (코팅된) 미생물의 포식작용을 유도하기 위한 가장 중요한 Fc 수용체이다. 상기 패밀리는 상이한 분자 구조 때문에 그의 항체 친화도가 상이한 몇몇의 구성원, 즉 Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32a), Fc γ RIIb (CD32b), Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RIIIb (CD16b)를 포함한다.

[0228] Fc-매개 이펙터 기능은 인간 이뮤노글로불린 G (IgG) 분자의 생물학적 활성의 일부를 형성한다. 상기 이펙터 기능의 예는 예를 들어 다양한 이펙터 분자의 Fc 영역에 대한 결합에 의해 촉발되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 포함한다. 본 발명의 측면에서, "Fc 결합", "Fc 수용체 결합", "FcR 결합", 및 "항체 Fc 영역의 FcR에 대한 결합"은 Fc 영역의 Fc 수용체 (FcR) 또는 이펙터 분자에 대한 Fc 결합을 나타낸다. 용어 "Fc γ R 결합" 및 "Fc γ RI 결합"은 각각 Fc 감마 수용체 및 Fc 감마 수용체 I에 대한 Fc 영역의 결합을 나타낸다. CD3 항체가 T-세포에 결합할 때, CD3 항체의 야생형 Fc 영역은 다른 세포, 예를 들어 단핵구 상에 존재하는 FcR에 결합하고, 이것은 T-세포의 비-특이적, Fc-매개된 활성화를 유발한다. 그러한 T-세포의 비-특이적, Fc-매개 활성화는 요구되지 않을 수 있다. 또한, T-세포는 표적화된, 또는 표적-특이적 T-세포 활성화에 의해 활성화될 수 있다. 상기 표적화된 T-세포 활성화는 다양한 적응증, 예컨대 암의 치료를 위해 매우 바람직할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "표적화된 T-세포 활성화"는 특이적 표적, 예컨대 종양 세포 상의 종양 표적에 결합하는 제1 결합 영역 결합, 및 T-세포 특이적 표적, 예컨대 CD3에 결합하는 제2 결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체의 사용에 의해 T-세포를 특이적 세포, 예컨대 종양 세포로 유도함을 나타낸다. 따라서, T-세포의 특이적 세포, 예를 들어 종양 세포에 대한 표적화는, 결합 영역의 하나는 T-세포 상에 존재하는 CD3에 결합하고 다른 결합 영역은 예를 들어 종양 세포 상의 표적 특이적 항원에 결합하는 이중 특이적 항체의 사용에 의해 용이해질 수 있다. 하지만, 비-특이적, Fc-매개 T-세포 활성화가 계속 가능하고,

따라서 Fc-매개된 가교를 통한 상기 요구되지 않는 비-특이적, Fc-매개 T-세포 활성화는 방지되어야 하고, Fc 영역을 상기 활성화에 대해 불활성으로 만듦으로써 불가능하게 할 수 있다. 이에 의해, 상기 불활성 Fc 영역과 존재하는 Fc 수용체 사이의 상호작용은 억제된다. 본 발명의 인간화 항체는 몇몇의 상이한 검정에서 시험될 때 불활성인 것으로 입증되었다 (실시예 3 내지 5 참조). 또한, Fc 영역에 아미노산 변형을 포함하는 또 다른 시험된 CD3 항체, 즉 huCLB-T3/4가 상이한 검정에서 시험될 때 불활성인 것으로 입증되었다 (실시예 7 내지 10 참조). 실시예에서 설명되는 바와 같이 아미노산 치환 L234F, L235E, 및 D265A를 포함하는 본 발명에 따른 인간화 CD3 항체는 T-세포 상의 낮은 수준의 CD69 발현 (실시예 3), Fc-매개 T-세포 증식의 중단 (실시예 4), 및 이 중독이적 항체의 형태일 때 비-특이적 표적 사멸의 부재 (실시예 5)를 보였다. 따라서, 본 발명의 인간화 항체는 야생형 항체에 비해 몇몇의 검정에서 우수한 결과를 제시한다.

[0229] 본 발명에 따른 항체는 Fc 영역에 변형을 포함할 수 있다. 항체가 상기 변형을 포함할 때, 항체는 불활성, 또는 비-활성화 항체가 될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "불활성화", "불활성" 또는 "비-활성화"는 적어도 임의의 Fc γ 수용체에 결합하거나, FcR의 Fc-매개된 가교를 유도하거나, 또는 개별적인 항체의 2개의 Fc 영역을 통한 표적 항원의 FcR-매개된 가교를 유도할 수 없거나, 또는 C1q에 결합할 수 없는 Fc 영역을 나타낸다. 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 Fc 영역의 불활성화는 단일특이적 형식의 항체를 사용하여 유리하게 시험되지만, 그와 같이 확인된 불활성 Fc 영역은 이중특이적 또는 다른 인간화 또는 키메라 다중특이적 CD3 항체에서 사용될 수 있다.

[0230] 몇몇 변이체는 치료 항체 개발의 개발을 위해 Fc 감마 수용체 및 C1q와의 상호작용에 불활성인 항체의 Fc 영역을 제조하기 위해 구축될 수 있다. 상기 변이체의 예를 본원에서 설명한다.

[0231] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0232] 본원에서 사용되는 용어 "감소시키다"는 대조군 단백질, 예컨대 항체에 비해 활성 또는 발현의 감소를 나타낸다. 특히, T-세포 증식을 언급할 때 용어 "감소시키다"는 야생형 항체에 의해 결합된 T-세포의 증식에 비해 T-세포의 증식을 감소, 최소화 또는 심지어 완전히 억제하는 본 발명에 따른 항체의 능력을 나타낸다. T-세포 증식을 감소시키는 항체의 능력은 실시예 4 및 실시예 8에 설명된 바와 같이 PBMC-기반 기능적 검정에 의해 평가할 수 있다. 한 실시양태에서, 검정은 인간 PBMC를 사용하여 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 검정은 시노몰거스 PBMC를 사용하여 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 검정은 레서스 PBMC를 사용하여 수행한다. 본 발명에 따른 항체는 교차반응성이기 때문에, 본원에서 설명되는 PBMC-기반 검정은 사용되는 종의 PBMC가 항체의 교차-반응성 스펙트럼 내에 존재하는 한 T-세포 증식의 감소를 보이는 임의의 종, 예를 들어 인간, 시노몰거스 또는 레서스 원숭이의 PBMC를 사용하여 수행할 수 있다.

[0233] 본원에서 사용되는 용어 "말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정"은 본 발명의 항체의 기능적 특징, 예컨대 항체가 T-세포 증식 또는 CD69 발현에 영향을 끼치는 능력을 평가하기 위해 사용되는 검정을 나타내고, 여기서 존재하는 유일한 세포는 말초 혈액 단핵 세포이다. 따라서, 한 실시양태에서, T-세포 증식은 PBMC를 37°C에서 5% (vol/vol) CO₂ 가습 인큐베이터 내에서 3일 동안 1-1000 ng/mL의 항체와 함께 인큐베이션하고, 증식하는 세포의 DNA 내로 혼입되는 화합물, 예컨대 BrdU를 첨가하고, 5 hr 동안 인큐베이션하고, 세포를 펠렛화하고, 세포를 건조하고, 임의로 세포를 4°C에서 보관하고, 세포를 ELISA 플레이트에 코팅하고, 항-BrdU-퍼옥시다제와 함께 90 min 동안 실온에서 인큐베이션하고, 약 30 min 동안 1 mg/mL 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)과 함께 성장시키고, 100 μ l 2% 옥살산을 첨가하여 반응을 중지시키고, 적합한 마이크로플레이트 판독기로 405 nm에서 흡광도를 측정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정한다.

[0234] 본원에서 사용되는 용어 "증식"은 세포 분열의 측면에서 세포 성장을 나타낸다.

[0235] 용어 "BrdU"는 본원에서 사용될 때, 5-브로모-2'-데옥시우리딘을 나타내고, 이것은 티미딘의 상동체이다. BrdU가 제한된 시간 (예를 들어 4시간) 동안 세포 배양액에 첨가될 때, 이것은 증식하는 세포의 DNA 내에 혼입될 것이다. 세포를 고정한 후, 혼입된 BrdU의 검출은 항-BrdU-퍼옥시다제를 사용하여 ELISA로 수행될 수 있다. 따라서, BrdU 혼입은 증식에 대한 척도이다.

[0236] 한 실시양태에서, 항체는 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형된 Fc 영역을 포함하며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 측정된다.

- [0237] 본원에서 사용되는 용어 "감소시키다"는 대조군 단백질, 예컨대 항체에 비해 활성 또는 발현의 감소를 나타낸다. 특히, T-세포 활성화 마커 CD69의 발현 수준을 언급할 때 용어 "감소시키다"는 항체의 결합 영역 둘 모두가 CD3에 결합한다면 T-세포가 야생형 항체에 의해 결합될 때의 CD69의 발현 수준에 비해 CD69의 발현 수준의 감소를 나타낸다. CD69의 발현을 감소시키는 항체의 능력은 실시예 3 및 실시예 7에 설명된 바와 같이 PBMC-기반 기능적 검정에 의해 평가할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, CD69의 발현은 PBMC를 37°C에서 5% (vol/vol) CO₂ 가습 인큐베이터 내에서 16-24 hr 동안 1-1000 ng/mL의 항체와 함께 인큐베이션하고, 세포를 세척하고, 세포를 4°C에서 마우스 항-인간 CD28-PE 및 마우스-항-인간 CD69-APC 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 CD28 양성 세포 상에서 CD69-발현을 결정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정한다.
- [0238] 본원에서 사용되는 용어 "CD69"는 CD69 유전자에 의해 코딩되는 인간 막횡단 C-형 렉틴 단백질인 분화 집단 69를 나타낸다. 생체 내 및 시험관 내 둘 모두에서 T 림프구 및 자연 킬러 (NK) 세포의 활성화는 CD69의 발현을 유도한다. CD69는 증식을 포함하는 세포 활성화 사건에 관여하는 신호 전달 수용체로서 기능하고, 자연 킬러 세포 및 혈소판을 포함하는 림프구, 특이적 유전자의 유도에서 신호 전달 수용체로서 기능한다.
- [0239] 본원에서 사용되는 용어 "말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정"은 본 발명의 항체의 기능적 특징, 예컨대 T-세포 증식 또는 CD69 발현에 영향을 끼치는 상기 항체의 능력을 평가하기 위해 사용되는 검정을 나타내고, 여기서 존재하는 유일한 세포는 말초 혈액 단핵 세포이다. 실시예 3, 4, 5, 및 7에서 설명된 바와 같은 PBMC-기반 기능적 검정은 (i) PBMC를 항체와 함께 37°C에서 5% (vol/vol) CO₂ 가습 인큐베이터 내에서 약 16-24 hr 동안 인큐베이션하고, (ii) 세포를 세척하고, (iii) 세포를 4°C에서 마우스 항-인간 CD28-PE 및 마우스-항-인간 CD 69-APC 항체로 염색하고, (iv) CD69 발현이 평가될 때, 유동 세포측정법에 의해 CD28 양성 세포 상에서 CD69 발현을 결정하는 단계를 포함하는 방법에 의해 측정한다. 따라서, 한 실시양태에서, CD69 발현은 실시예 3, 4, 5, 또는 7에서 설명된 바와 같이 결정할 수 있다.
- [0240] 따라서, C1q 및 Fc 감마 수용체와의 상호작용에서 지배적인 역할을 수행하는 Fc 영역 내의 아미노산은 변형될 수 있다. 변형될 수 있는 아미노산 위치의 예는 위치 L234, L235 및 P331을 포함한다. 이들의 조합, 예컨대 L234F/L235E/P331S는 인간 CD64, CD32A, CD16 및 C1q에 대한 결합의 큰 감소를 야기할 수 있다.
- [0241] 따라서, 한 실시양태에서, L234, L235 및 P331에 대응하는 적어도 하나의 위치의 아미노산은 각각 A, A 및 S일 수 있다 ([1], [28]). 또한, L234F 및 L235E 아미노산 치환은 Fc 감마 수용체 및 C1q와의 상호작용이 중단된 Fc 영역을 생성할 수 있다 ([29]-[30]). 따라서, 한 실시양태에서, L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E일 수 있다. D265A 아미노산 치환은 모든 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 감소시키고 ADCC를 억제할 수 있다 ([31]). 따라서, 한 실시양태에서, D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A일 수 있다. C1q에 대한 결합은 위치 D270, K322, P329, 및 P331을 돌연변이시키므로써 중단될 수 있다. 상기 위치를 D270A 또는 K322A 또는 P329A 또는 P331A로 돌연변이시키면 CDC 활성이 결여된 항체를 제조할 수 있다 ([32]). 따라서, 한 실시양태에서, D270, K322, P329 및 P331에 대응하는 적어도 하나의 위치의 아미노산은 각각 A, A, A, 및 A일 수 있다.
- [0242] Fc 영역의 Fc 감마 수용체 및 C1q와의 상호작용을 최소화하는 다른 방법은 항체의 글리코실화 부위의 제거에 의한 것이다. 위치 N297의 예를 들어 Q, A, 및 E로의 돌연변이는 IgG-Fc 감마 수용체 상호작용에 매우 중요한 글리코실화 부위를 제거한다. 따라서, 한 실시양태에서, N297에 대응하는 위치의 아미노산은 G, Q, A 또는 E일 수 있다 ([33]). Fc 영역과 Fc 감마 수용체의 상호작용을 최소화하기 위한 또 다른 대체 방법은 다음 돌연변이에 의해 얻을 수 있다; P238A, A327Q, P329A 또는 E233P/L234V/L235A/G236del ([31]).
- [0243] 대안적으로, 인간 IgG2 및 IgG4 하위클래스는 C1q 및 Fc 감마 수용체와 이들의 상호작용이 천연적으로 손상된 것으로 간주되지만, Fc γ 수용체 (Fc 감마 수용체)와의 상호작용이 보고되었다 ([34]-[35]). 상기 잔류하는 상호작용을 중단시키는 돌연변이는 두 이소형 모두에서 이루어질 수 있고, 이것은 FcR 결합과 연관된 원치않는 부작용을 감소시킨다. IgG2의 경우에, 이들은 L234A 및 G237A를, IgG4의 경우에는 L235E를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 인간 IgG2 중쇄의 L234 및 G237에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A 및 A일 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 IgG4 중쇄의 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 E일 수 있다.
- [0244] IgG2 항체에서 Fc 감마 수용체 및 C1q와의 상호작용을 보다 최소화하기 위한 다른 방법은 문헌 [36] 및 [37]에 기재된 것을 포함한다.
- [0245] 항체의 힌지 영역이 또한 Fc 감마 수용체 및 보체와의 상호작용에 중요할 수 있다 ([38]-[39]). 따라서, 힌지

영역 내의 돌연변이 또는 힌지 영역의 결실은 항체의 이펙터 기능에 영향을 줄 수 있다.

- [0246] 본원에서 사용되는 용어 "가교"는 항체 Fc 영역에 대한 결합을 통해 FcR-보유 세포에 의해 표적 항원에 결합된 항체 Fab 아암(들) (1가 또는 2가)의 간접적인 가교 형성을 나타낸다. 따라서, 표적 항원-보유 세포 상의 그의 표적 항원에 결합하는 항체는 FcR을 발현하는 또 다른 세포와 가교될 수 있다.
- [0247] 본원에서 사용되는 용어 "비특이적 사멸"은 T-세포 또는 다른 이펙터 세포의 종양 표적 항원-비의존 활성화를 통한 상기 세포의 세포독성 기능에 의한 세포의 사멸을 나타낸다. 따라서, 비특이적 사멸은 종양-표적 보유 세포가 예를 들어 CDC의 유도에 의해 종양 표적에 결합하는 항체에 의해서가 아니라, 예를 들어 세포독성 T-세포에 의해 사멸될 수 있음을 의미한다.
- [0248] 본 발명자들은 비-활성화 Fc 영역이 Fc 영역 내의 적어도 5개의 특이적 아미노산 위치 중 하나 이상을 변형함으로써 얻을 수 있음을 밝혀내었다 (실시에 3 내지 5, 7 내지 10 참조).
- [0249] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하고, 상기 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L, D, N, 및 P가 아니다.
- [0250] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L, D, N, 및 P가 아니다.
- [0251] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235 및 D265에 대응하는 위치의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L 및 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0252] 본원에서 사용되는 용어 "위치에 대응하는 아미노산"은 인간 IgG1 중쇄 내의 아미노산 위치 번호를 나타낸다. 달리 언급되거나 문맥상 모순되지 않는 한, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 Eu-넘버링 지수 ([27]에서 설명되는)에 따라 넘버링된다. 따라서, 또 다른 서열 내의 아미노산 또는 절편에 "대응하는" 한 서열 내의 아미노산 또는 절편은 일반적으로 디폴트 설정에서 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, ClustalW 또는 유사한 프로그램을 사용하여 다른 아미노산 또는 절편과 정렬하고 인간 IgG1 중쇄에 대해 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 것이다. 서열 또는 서열 내의 절편을 정렬하여 본 발명에 따른 아미노산 위치에 대응하는 서열 내의 위치를 결정하는 방법은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있는 것으로 간주된다.
- [0253] 본 발명의 문맥에서, 아미노산은 상기 설명된 바와 같이 규정할 수 있다.
- [0254] 중쇄 내의 아미노산을 언급할 때 용어 "아미노산은 ~가 아니다" 또는 유사한 표현은 아미노산이, 언급된 특정 아미노산 이외의 다른 임의의 아미노산임을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 인간 IgG1 중쇄의 L234에 대응하는 위치의 아미노산은 L이 아니라는 것은 아미노산이 L 이외의 다른 임의의 천연 또는 비-천연 생성 아미노산일 수 있음을 의미한다.
- [0255] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D가 아니다.
- [0256] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0257] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.
- [0258] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "소수성"은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택된다.
- [0259] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "극성"은 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0260] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 지방족 비하전, 방향족 또는 산성 아미노산이다.
- [0261] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "지방족 비하전"은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0262] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "방향족"은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0263] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "산성"은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0264] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0265] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D가 아니다.
- [0266] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 아미노산 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0267] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.
- [0268] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "소수성"은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택된다.
- [0269] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "극성"은 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택된다.
- [0270] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0271] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 지방족 비하전, 방향족 또는 산성 아미노산이다.
- [0272] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "지방족 비하전"은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0273] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "방향족"은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0274] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "산성"은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0275] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0276] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297에 대응하는 위치의 아미노산은 N이 아니다.
- [0277] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 N297에 대응하는 위치의 아미노산은 N이 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 P이다.
- [0278] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297에 대응하는 위치의 아미노산은 N이 아니다.
- [0279] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 N297에 대응하는 위치의 아미노산은 N이 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 P이다.
- [0280] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L 및 L이 아니다.
- [0281] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L 및 L이 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0282] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 아미노산은 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0283] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.
- [0284] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "소수성"은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0285] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "극성"은 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택된다.
- [0286] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0287] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L 및 L이 아니다.
- [0288] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L 및 L이 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0289] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.
- [0290] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0291] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택된다.
- [0292] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0293] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 지방족 비하전, 방향족 또는 산성 아미노산이다.
- [0294] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "지방족 비하전"은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, G, I, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0295] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "방향족"은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0296] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "산성"은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0297] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0298] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이다.
- [0299] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0300] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이다.
- [0301] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E; 또는 A 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0302] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E이다.
- [0303] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F 및 E이다.
- [0304] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 적어도 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A 및 A이다.
- [0305] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 적어도 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A 및 A이다.
- [0306] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L, L, 및 D가 아니다.
- [0307] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L, L 및 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0308] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 아미노산은 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 위치 D265에 대응하는 아미노산은 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0309] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.

- [0310] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "소수성"은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0311] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "극성"은 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0312] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0313] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 소수성 또는 극성 아미노산이다.
- [0314] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W 및 Y로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0315] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 아미노산의 군으로부터 선택되고, 인간 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 C, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0316] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 및 Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0317] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 지방족 비하전, 방향족 또는 산성 아미노산이다.
- [0318] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "지방족 비하전"은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, G, I, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0319] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "방향족"은 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, T, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0320] 아미노산 잔기와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "산성"은 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0321] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되고, L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0322] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235 및 D265에 대응하는 위

치의 아미노산은 각각 L, L, 및 D가 아니다.

- [0323] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 L, L, 및 D가 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0324] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 지방족 비하전, 방향족 또는 산성 아미노산이다.
- [0325] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, G, I, L, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, G, I, 및 V로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0326] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 D 및 E로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0327] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 A, E, F, G, I, L, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택되고, L234 및 L235에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, D, E, F, G, I, T, V, 및 W로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0328] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이다.
- [0329] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0330] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이다.
- [0331] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A; 또는 A, A, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 위치 N297 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 N 및 P이다.
- [0332] 특정 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0333] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0334] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, A, 및 A이다.
- [0335] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 A, A, 및 A이다.
- [0336] 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, Q, 및 S이다.
- [0337] 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, Q, 및 S이다.
- [0338] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0339] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0340] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열, 서열 10에 제시된 VL 서열을

포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0341] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열, 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0342] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열, 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0343] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열, 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하고, 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0344] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 항체의 제1 결합 영역, 및 제1 결합 영역 이외의 하나 이상의 상이한 표적에 결합하는 하나 이상의 결합 영역을 포함하는 다중특이적 항체에 관한 것이다. 그러한 다중특이적 항체는 이중특이적 항체일 수 있다.

[0345] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 항체의 제1 결합 영역, 및 제1 결합 영역 이외의 상이한 표적에 결합하는 제2 결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

[0346] 용어 "다중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한, 예컨대 적어도 3개의, 일반적으로 비-중첩 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항체를 나타낸다. 상기 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에 존재할 수 있다. 에피토프가 상이한 표적 상에 존재할 경우, 상기 표적은 동일한 세포 또는 상이한 세포 또는 세포 종류에 존재할 수 있다.

[0347] 용어 "이중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한, 일반적으로 비-중첩 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항체를 나타낸다. 상기 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에 존재할 수 있다. 에피토프가 상이한 표적 상에 존재할 경우, 상기 표적은 동일한 세포 또는 상이한 세포 또는 세포 종류에 존재할 수 있다.

[0348] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 중쇄를 포함한다.

[0349] Fc 영역의 변형에 관한 실시양태 및 특이적 아미노산 치환에 관한 실시양태는 본 발명에 따른 임의의 이중특이적 항체의 일부로 고려된다. 따라서, 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나는 본원에서 설명되는 임의의 실시양태에서 규정되는 바와 같이 변형된 하나 이상의 아미노산, 예컨대 불활성 Fc 영역 제공과 관련하여 설명된 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 모두는 본원에서 설명되는 임의의 실시양태에서 규정되는 바와 같이 변형된 하나 이상의 아미노산, 예컨대 불활성 Fc 영역 제공과 관련하여 설명된 것을 포함한다. 따라서, 이중특이적 항체는 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따라 변형된 Fc 영역을 포함하거나; 또는 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나는 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에서 규정되는 바와 같이 변형된 하나 이상의 아미노산을 포함한다.

[0350] 따라서, 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0351] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0352] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0353] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도

도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0354] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0355] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체에 비해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 100% 감소되도록 변형되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0356] 또 다른 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0357] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0358] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0359] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0360] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0361] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소된 Fc-매개 T-세포 증식을 매개하도록 변형되며, 여기서 상기 T-세포 증식은 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)-기반 기능적 검정으로 측정된다.

[0362] 또 다른 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.

[0363] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.

[0364] 한 실시양태에서, 이종특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.

- [0365] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.
- [0366] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.
- [0367] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서, Fc 영역은 상기 항체가 Fc-매개 CD69 발현을 야생형 항체에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99% 또는 100% 감소시키도록 변형되며, 여기서 상기 Fc-매개 CD69 발현은 PBMC-기반 기능적 검정으로 결정된다.
- [0368] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0369] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0370] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0371] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 6에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0372] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0373] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.
- [0374] 본 발명에서 사용될 수 있는 이중특이적 항체 분자의 예는 다음을 포함한다: (i) 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 아암을 갖는 단일 항체, (ii) 예를 들어 추가의 펩티드 링커에 의해 직렬로 연결된 2개의 scFv를 통해 2개의 상이한 에피토프에 대한 특이성을 갖는 단일쇄 항체; (iii) 각각의 경쇄 및 중쇄가 2개의 가변 도메인을 짧은 펩티드 연결을 통해 직렬로 포함하는 것인 이중-가변-도메인 항체 (DVD-IgTM) ([40]); (iv) 화학적으로 연결된 이중특이적 (Fab')₂ 단편; (v) 각각의 표적 항원에 대한 2개의 결합 부위를 갖는 4가 이중특이적 항체를 생성하는 2개의 단일쇄 디아바디 (diabody)의 융합체인 TandAb®; (vi) 다가 분자를 생성하는, scFv와 디아바디의 조합물인 플렉시바디 (flexibody); (vii) Fab에 적용될 때, 상이한 Fab 단편에 연결된 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어진 3가 이중특이적 결합 단백질 생성할 수 있는, 단백질 키나제 A 내의 "이량체화 및 도킹 (docking) 도메인"을 기초로 한 소위 "독 (dock) 및 록 (lock)" 분자 (독-앤-록(Dock-and-Lock)®); (viii) 예를 들어, 인간 Fab-아암의 말단 둘 모두에 융합된 2개의 scFv를 포함하는 소위 스콜피온 (Scorpion) 분자; 및 (ix) 디아바디.
- [0375] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 디아바디, 크로스-바디 (cross-body), 또는 본 발명에서 설명된 바와 같이 제어된 Fab 아암 교환을 통해 얻은 이중특이적 항체, 예를 들어 듀오바디(DuoBody)® (예컨대 문헌 [41]에서 설명된)이다.
- [0376] 이중특이적 항체의 상이한 클래스의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: (i) 이중이량체화하게 만드는 상보성 CH3 도메인을 갖는 IgG-유사 분자; (ii) 분자의 두 측면이 적어도 2개의 상이한 항체의 Fab 단편 또는

Fab 단편의 일부를 각각 포함하는 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자; (iii) 전장 IgG 항체가 추가의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부에 융합된 IgG 융합 분자; (iv) 단일쇄 Fv 분자 또는 안정화된 디아바디가 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 일부에 융합된 Fc 융합 분자; (v) 상이한 Fab-단편이 함께 융합되고, 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 일부에 융합된 Fab 융합 분자; 및 (vi) 상이한 단일쇄 Fv 분자 또는 상이한 디아바디 또는 상이한 중쇄 항체 (예를 들어 도메인 항체, 나노바디스(Nanobodies)®)가 서로 융합되거나 또는 중쇄 불변-도메인, Fc-영역 또는 그의 일부에 융합된 또 다른 단백질 또는 캐리어 분자에 융합된 ScFv- 및 디아바디-기반 및 중쇄 항체 (예를 들어, 도메인 항체, 나노바디스®).

[0377] 상보성 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG-유사 분자의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 트리오맵 (Triomab)® (트리온 파마 (Trion Pharma)/프레세니우스 바이오테크 (Fresenius Biotech), [42]), knobs-into-Holes (제넨테크 (Genentech), [43]), 크로스맵(CrossMAb) (로슈 (Roche), [44]) 및 정전기 적으로 일치된 (암젠 (Amgen), [45]-[46]; 추가이 (Chugai), [47]; 온코메드 (Oncomed), [48]), LUZ-Y (제넨테크), DIG-바디 (DIG-body) 및 PIG-바디 (PIG-body) (파맵신 (Pharmabcine)), 가닥 교환 조작 도메인 바디 (Strand Exchange Engineered Domain body (시드바디 (SEEDbody)) (이엠디 세로노 (EMD Serono), [49]), 비클로닉스 (Biclonics) (메루스 (Merus)), Fc Δ Adp (리제네론 (Regeneron), [50]), 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (화이자 (Pfizer)/리나트 (Rinat), [51]), 아지메트릭 스캐폴드 (Azymetric scaffold) (자임웁스 (Zymeworks)/머크 (Merck), [52]), mAb-Fv (젠코르 (Xencor), [53]), 2가 이중특이적 항체 (로슈) 및 듀오바디® 분자 (젠맵 A/S, [41]).

[0378] 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 이중 표적화 (DT)-Ig (GSK/도만티스 (Domantis)), 투-인-원 (Two-in-one) 항체 (제넨테크), 가교된 Mab (카르마노스 캔서 센터 (Karmanos Cancer Center)), mAb2 (에프-스타 (F-Star), [54]), 지바디스(Zybodies)™ (진게니아 (Zyngenia)), 통상의 경쇄를 갖는 방식 (크루셀 (Crucell)/메루스, [55]), $\kappa\lambda$ 바디스($\kappa\lambda$ Bodies) (노브이문 (NovImmune)) 및 CovX-바디(CovX-body)® (CovX/화이자).

[0379] IgG 융합 분자의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 이중 가변 도메인 (DVD)-Ig™ (애보트 (Abbott), [56]), 이중 도메인 이중 헤드 (double head) 항체 (유니레버 (Unilever); 사노피 아벤티스 (Sanofi Aventis), [57]), IgG-유사 이중특이적 (임클론 (ImClone)/일라이 릴리 (Eli Lilly)), Ts2Ab (메드이문 (MedImmune)/AZ) 및 BsAb (자이모제네틱스 (Zymogenetics)), 허큘레스 (HERCULES) (비오젠 이덱 (Biogen Idec), [58]), scFv 융합체 (노파르티스 (Novartis)), scFv 융합체 (창저우 아담 바이오테크 인크, (Changzhou Adam Biotech Inc.) [59]) 및 TvAb (로슈, [59], [60]).

[0380] Fc 융합 분자의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: ScFv/Fc 융합체 (아카데미 인스티튜션 (Academic Institution)), 스콜피온 (SCORPION) (이머전트 바이오솔루션스 (Emergent BioSolutions)/트루비온 (Trubion), 자이모제네틱스/BMS), 이중 친화도 재표적화 기술 (Fc-DART™) (마크로제닉스 (MacroGenics), [62], [63]) 및 Dual(ScFv)2-Fab (내셔널 리써치 센터 포 안티바디 메디슨 - 차이나 (National Research Center for Antibody Medicine - China)).

[0381] Fab 융합 이중특이적 항체의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: F(ab)2 (메다렉스 (Medarex)/암젠), 듀얼-액션 (Dual-Action) 또는 Bis-Fab (제넨테크), 독-앤-록® (DNL) (이뮤노메딕스 (ImmunoMedics), 바이벌런트 비스페시픽 (Bivalent Bispecific) (바이오테크놀 (Biotechnol)) 및 Fab-Fv (UCB-셀테크(Celltech)).

[0382] ScFv-, 디아바디-기반 및 도메인 항체의 예는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 이중특이적 T 세포 인계 이저 (Engager) (BiTE®) (마이크로메트 (Micromet), 탠덤 (Tandem) 디아바디 (탠덱 (Tandab)) (아피메드 (Affimed)), 이중 친화도 재표적화 기술 (DART™) (마크로제닉스), 단일쇄 디아바디 (아카데미), TCR-유사 항체 (AIT, 리셉터로직스 (ReceptorLogics)), 인간 혈청 알부민 ScFv 융합체 (메리맥 (Merrimack)) 및 코바디 (COMBODY) (에피겐 바이오테크 (Epigen Biotech)), 이중 표적화 나노바디스® (아블링스 (Ablynx)), 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체.

[0383] 본원에서 설명되는 검정 조건을 충족하는 임의의 단일특이적 항체는 이중특이적 항체의 기초를 형성할 수 있음이 추가로 고려된다. 즉, 결합 영역의 하나가 CD3에 결합하는 이중특이적 항체는 기능적 검정에서 시험되고 본원에서 언급된 요건을 충족하는 임의의 단일특이적 CD3 항체로부터 유래될 수 있다. 상기 이중특이적 항체는 본원에 참고로 포함되는 문헌 [41]에 기재된 방법에 의해 제공될 수 있다.

[0384] 따라서, 특정 실시양태에서, 각각의 상기 제1 및 제2 중쇄는 적어도 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역을 포함하고,

여기서 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 대응하는 위치의 적어도 하나의 아미노산이 치환되고, 상기 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407, 및 K409로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 대응하는 위치의 적어도 하나의 아미노산이 치환되고, 상기 제1 및 상기 제2 중쇄는 동일한 위치에서 치환되지 않는다. 상기 측면에서, 용어 "치환된"은 특정 아미노산 위치의 아미노산이 또 다른 천연 또는 비-천연 생성 아미노산으로 치환됨을 나타낸다. 따라서, 인간 IgG1 중쇄의 한 위치에 대응하는 위치의 "치환된" 아미노산은 특정 위치의 아미노산이 IgG1 중쇄의 천연 생성 아미노산과 상이함을 의미한다.

- [0385] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 K, L 또는 M이 아니고, 임의로 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 F이고, 상기 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에 대응하는 위치의 적어도 하나의 아미노산은 치환된다.
- [0386] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 K, L 또는 M이 아니고, 상기 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 F가 아니고, 임의로 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 K이다.
- [0387] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 F, R, 및 G가 아니고, 상기 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409로 이루어지는 군으로부터 선택된 위치에 대응하는 위치의 아미노산은 치환된다.
- [0388] 한 실시양태에서, 상기 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 K, L 또는 M이 아니고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 F가 아니다.
- [0389] 추가의 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 상기 제2 중쇄에서 R이거나, 또는 그 반대이다.
- [0390] 따라서, 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 L이다.
- [0391] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 CD3 항체는 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에 상기 실시양태의 임의의 하나에 개시된 하나 이상의 불활성화 치환, 예컨대 L234F, L235E, 및 D265A를 포함하고; 여기서, F405에 대응하는 위치의 아미노산은 F가 아니다. 한 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 CD3 항체는 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에 상기 실시양태의 임의의 하나에 개시된 하나 이상의 불활성화 치환, 예컨대 L234F, L235E, 및 D265A; 및 K409 위치에서의 추가의 치환, 예컨대 K409R을 포함한다. 특히, 한 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 CD3 항체는 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에 상기 실시양태의 임의의 하나에 개시된 하나 이상의 불활성화 치환, 예컨대 L234F, L235E, 및 D265A; 및 F405 위치에서의 치환, 예컨대 F405L을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 CD3 항체는 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에 상기 실시양태의 임의의 하나에 개시된 하나 이상의 불활성화 치환, 예컨대 L234F, L235E, 및 D265A; 및 K409 위치에서의 추가의 치환, 예컨대 K409R을 포함한다. 상기 항체는 이종특이적 항체의 생성을 위해 유용하다.
- [0392] 따라서, 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 R이다.
- [0393] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, N, 및 P이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 R이다.
- [0394] 대체 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 L이다.
- [0395] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, N, 및 P이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 L이다.

- [0396] 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 R이다.
- [0397] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, N, 및 P이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 R이다.
- [0398] 대체 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 L이다.
- [0399] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 L234, L235, D265, N297, 및 P331에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, A, N, 및 P이고, 인간 IgG1 중쇄의 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄의 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 제2 중쇄에서 L이다.
- [0400] 본원에 설명된 바와 같이, 특정 표적 세포, 예컨대 암세포 또는 종양 세포에 대한 T-세포 동원은 표적 세포의 사멸 방법을 제공한다. 본 발명자들은 중쇄 둘 모두에 특이적 아미노산 치환 L234F, L235E, 및 D265A를 포함하는 이중특이적 CD3xHER2 항체가 실시예 5에 설명된 바와 같이 AU565 세포의 사멸을 유도할 수 있음을 밝혀내었다. T-세포 매개 사멸은 제1 결합 영역으로 CD3을, 제2 결합 영역으로 또 다른 표적을 표적화하는 이중특이적 항체에 의해 달성할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 제1 결합 영역은 인간화 또는 키메라 CD3 항체에 대해 본원에 설명된 임의의 실시양태에 따른 것이고, 제2 결합 영역은 제1 결합 영역과 상이한 표적에 결합한다. 항체가 이중특이적 항체일 때, 항체의 적어도 1/2, 즉, 항체의 중쇄 및 경쇄의 쌍의 하나는 본원에서 설명되는 인간화 또는 키메라 항체임이 이해되어야 한다. 따라서, 이중특이적 항체의 1/2은 본 발명에 따른 CD3에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체이고, 나머지 1/2은 제2 표적에 결합하는 인간화된, 키메라, 완전 비-인간 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 중쇄, 제1 및 제2 경쇄를 포함하고, 여기서 상기 제1 중쇄 및 상기 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 상기 제2 중쇄 및 경쇄는 완전 인간 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 상기 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 상기 제2 결합 영역은 상이한 표적에 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 중쇄, 제1 및 제2 경쇄를 포함하고, 여기서 상기 제1 중쇄 및 상기 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 상기 제2 중쇄 및 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 상기 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 상기 제2 결합 영역은 상기 제1 결합 영역과 상이한 CD3의 에피토프에 결합한다.
- [0401] 따라서, 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역; 서열 19에 제시된 VH 서열, 및 서열 20에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고; 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.
- [0402] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역; 서열 29에 제시된 VH 서열, 및 서열 30에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고; 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.
- [0403] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역; 서열 19에 제시된 VH 서열, 및 서열 20에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고; 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.
- [0404] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 8에 제시된 VH 서열, 및 서열 10에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역; 서열 29에 제시된 VH 서열, 및 서열 30에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을

산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.

- [illegible]

제1 결합 영역; 서열 19에 제시된 VH 서열, 및 서열 20에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고; 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.

[0424] 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 서열 9에 제시된 VH 서열, 및 서열 12에 제시된 VL 서열을 포함하는 제1 결합 영역; 서열 29에 제시된 VH 서열, 및 서열 30에 제시된 VL 서열을 포함하는 제2 결합 영역을 포함하고; 여기서 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이고; 제1 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 F405에 대응하는 위치의 아미노산은 L이고, 제2 중쇄에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 K409에 대응하는 위치의 아미노산은 R이다.

[0425] 본원에서 사용되는 용어 "디설피드 가교"는 2개의 시스테인 잔기 사이의 공유 결합을 나타내고, 즉, 상기 상호작용은 Cys-Cys 상호작용으로도 지정될 수 있다.

[0426] 본원에서 사용되는 용어 "표적"은 본 발명에 따른 항체의 결합 영역이 결합하는 분자를 나타낸다. 항체의 결합의 측면에서 설명될 때, 이 용어는 생성된 항체가 그에 대해 작용하는 임의의 항원을 포함한다.

[0427] 한 특정 실시양태에서, 제1 중쇄 및 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 제2 중쇄 및 경쇄는 완전 인간 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 여기서 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 제2 결합 영역은 상이한 표적에 결합하고; 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0428] 한 특정 실시양태에서, 제1 중쇄 및 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 제2 중쇄 및 경쇄는 완전 인간 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 제2 결합 영역은 제1 결합 영역과 상이한 CD3의 에피토프에 결합하고; 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0429] 한 특정 실시양태에서, 제1 중쇄 및 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 제2 중쇄 및 경쇄는 완전 인간 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 제2 결합 영역은 상이한 표적에 결합하고; 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0430] 한 특정 실시양태에서, 제1 중쇄 및 제1 경쇄는 인간화 또는 키메라 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제1 결합 영역을 형성하고; 제2 중쇄 및 경쇄는 완전 인간 체이고, 디설피드 가교를 통해 연결되어 제2 결합 영역을 형성하고, 제1 결합 영역은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 것이고, 제2 결합 영역은 제1 결합 영역과 상이한 CD3의 에피토프에 결합하고; 제1 및 제2 중쇄 둘 모두에서 인간 IgG1 중쇄의 위치 L234, L235, 및 D265에 대응하는 위치의 아미노산은 각각 F, E, 및 A이다.

[0431] 핵산 구축물, 발현 벡터, 및 숙주 세포

[0432] 한 측면에서, 본 발명은 표 1에 제시된 하나 이상의 서열을 코딩하는 핵산 구축물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 및 26에 제시된 임의의 하나의 서열을 코딩하는 핵산 구축물에 관한 것이다.

[0433] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 서열을 코딩하는 핵산 구축물, 본 발명에 따른 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 상기 숙주 세포를 적절한 조건 하에 배양하여 항체를 생산하고, 임의로 회수함으로써 상기 항체를 생산하는 방법에 관한 것이다. 인간화 CD3 항체는 또한 "huCD3"으로 표시될 수 있다.

[0434] 한 실시양태에서, 본 발명은 (i) 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, (ii) 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, 또는 (iii) (i)과 (ii) 둘 모두를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 따라서, 발현 벡터는 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 하나 이상의 핵산 구축물 또는 핵산 서열을 포함한다.

[0435] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 1, 2, 3, 4, 및 5; 및 서열 GTN의 군으로부터 선택되는 하나 이

상의 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

- [0436] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 20, 27, 28, 29, 및 30으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열, 또는 이들의 임의의 조합물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 서열 3에 제시된 VH CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 서열 6, 7, 8, 9, 19, 27, 및 29로부터 선택되는 VH 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 서열 10, 11, 12, 20, 28, 및 30으로부터 선택되는 VL 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 인간 항체 경쇄의, 인간 항체 중쇄의, 또는 둘 모두의 불변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 15, 16, 23, 24, 25, 및 26에 따른 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0437] 특정 실시양태에서, 발현 벡터는 하나 이상의 상기 아미노산 서열의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 변이체는 최대 25개의 아미노산 변형, 예컨대 최대 20, 예컨대 최대 15, 14, 13, 12, 또는 11개의 아미노산 변형, 예컨대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 변형, 예컨대 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예컨대 보존적 또는 비-보존적 치환을 갖거나, 또는 임의의 상기 서열에 대해 적어도 80% 동일성, 예컨대 임의의 상기 언급된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예컨대 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성을 갖는다. 본 발명은 또한 상기 언급된 핵산 서열과 상이하지만 유전자 코드의 변이성 때문에 본 발명의 항체와 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다. 예를 들어, 핵산 서열은 상이할 수 있지만, 본원에서 설명되는 임의의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 생성할 수 있다. 유전자 코드를 기초로 하여 상기 추가의 핵산 서열을 확인하는 방법은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0438] 추가의 실시양태에서, 발현 벡터는 항체, 예를 들어 인간 항체의 경쇄, 중쇄 또는 경쇄와 중쇄 둘 모두의 불변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.
- [0439] 상기 설명된 바와 같은 상기 발현 벡터는 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해 사용될 수 있다.
- [0440] 본 발명의 측면에서 발현 벡터는 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터 (적합한 세트의 발현 제어 요소를 포함하는 핵산 서열)를 포함하는 임의의 적합한 벡터일 수 있다. 상기 벡터의 예는 SV40의 유도체, 박테리아 플라스미드, 파지 DNA, 바큘로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드 및 파지 DNA의 조합물로부터 유래된 벡터, 및 바이러스 핵산 (RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 CD3 항체-코딩 핵산은 예를 들어, 선형 발현 요소를 포함하는 네이키드 (naked) DNA 또는 RNA 벡터 (예를 들어 [64]에 기재된 바와 같은), 밀집된 (compacted) 핵산 벡터 (예를 들어 [65] 및/또는 [66]에 기재된), 플라스미드 벡터, 예컨대 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, "미ջ (midge)" 최소 크기의 핵산 벡터 (예를 들어 [67]에 기재된 바와 같은)에 포함되거나, 또는 침전된 핵산 벡터 구축물, 예컨대 CaPO_4 침전된 구축물 (예를 들어 [68], [69], [70], 및 [71]에 기재된 바와 같은)로서 존재한다. 상기 핵산 벡터 및 그의 용도는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어 [72] 및 [73] 참조).
- [0441] 한 실시양태에서, 벡터는 박테리아 세포에서 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 발현에 적합하다. 상기 벡터의 예는 발현 벡터, 예컨대 블루스크립트(BlueScript) (스트라타진), pIN 벡터 ([74]), pET 벡터 (노바젠 (Novagen), 미국 위스콘신주 매디슨) 등을 포함한다.
- [0442] 발현 벡터는 또한 또는 대안적으로 효모 시스템에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템에서의 발현에 적합한 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 예를 들어 구성적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH를 포함하는 벡터를 포함한다 (문헌 [75] 및 [76]에서 검토됨).
- [0443] 핵산 구축물 및/또는 벡터는 또한 폴리펩티드, 예컨대 신생 폴리펩티드 쇄를 원형질막 주위공간으로 또는 세포 배양 배지 내로 표적화할 수 있는 분비/국제화 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 상기 서열은 관련 기술 분야에 알려져 있고, 관련 기술 분야에 알려진 분비 리더 또는 신호 펩티드, 소기관-표적화 서열 (예를 들어, 핵 국제화 서열, ER 잔류 신호, 미토콘드리아 수송 서열, 엽록체 수송 서열), 막 국제화/앵커 (anchor) 서열 (예를 들어, 이동 종결 (stop transfer) 서열, GPI 앵커 서열) 등을 포함한다.
- [0444] 본 발명의 발현 벡터에서, 인간화 또는 키메라 CD3 항체-코딩 핵산은 임의의 적합한 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현-촉진 요소를 포함하거나 이들과 회합될 수 있다. 상기 요소의 예는 강한 발현 프로모터 (예를 들어, 인간

CMV IE 프로모터/인핸서 및 RSV, SV40, SL3-3, MMTV, 및 HIV LTR 프로모터), 효과적인 폴리 (A) 종결 서열, 이. 콜라이(*E. coli*)에서 플라스미드 생성물에 대한 복제 기점, 선택가능 마커로서 항생제 내성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위 (예를 들어, 폴리링커)를 포함한다. 핵산 구축물 및/또는 벡터는 또한 구성적 프로모터가 아니라 유도성 프로모터, 예컨대 CMV IE를 포함할 수 있다 (통상의 기술자는 상기 용어들이 사실상 특정 조건 하에서 유전자 발현의 정도에 대한 서술어임을 알 것이다).

- [0445] 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 CD3 항체-코딩 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통해 숙주 세포 또는 숙주 동물 내에 위치하고/하거나 이들에게 전달된다.
- [0446] 상기 발현 벡터는 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 재조합 생산을 위해 사용할 수 있다.
- [0447] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0448] 한 측면에서, 본원에 설명된 임의의 측면 또는 실시양태의 인간화 또는 키메라 CD3 항체는 항체를 생산하는 재조합 진핵, 재조합 원핵, 또는 재조합 미생물 숙주 세포를 사용하여 제공된다. 따라서, 본 발명은 본원에서 규정된 인간화 또는 키메라 CD3 항체 또는 이뮤노글로불린을 생산하는 재조합 진핵, 재조합 원핵, 또는 재조합 미생물 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아 및 포유동물 세포, 예컨대 CHO 또는 HEK-293 세포를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에서 설명된 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 발현을 코딩하는 서열을 포함하는 세포 계능 내로 안정적으로 통합된 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에서 설명된 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 발현을 코딩하는 서열을 포함하는 비-통합 핵산 서열, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 또는 선형 발현 요소를 포함한다.
- [0449] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 발현 벡터 또는 핵산 구축물 또는 서열이 도입된 세포를 나타내고자 의도된다. 상기 용어는 특정 대상체 세포뿐만 아니라, 상기 세포의 자손체도 나타내고자 의도됨을 이해하여야 한다. 특정 변형은 돌연변이 또는 환경 영향에 의해 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손체는 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 본원에서 사용되는 재조합 숙주 세포는 예를 들어, 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포, HEK-293 세포, PER.C6, NS0 세포, 및 림프구 세포, 및 원핵 세포, 예컨대 이. 콜라이 및 다른 진핵 숙주, 예컨대 식물 세포 및 진균을 포함한다.
- [0450] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 생산 방법에 관한 것이고, 상기 방법은
- [0451] a) 상기 본원에서 설명된 본 발명의 숙주 세포를 배양하고,
- [0452] b) 배양 배지로부터 본 발명의 항체를 회수 및/또는 정제하는 단계를 포함한다.
- [0453] 추가의 측면에서, 인간화 또는 키메라 CD3 항체의 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 제2 모이어티, 예컨대 치료적 폴리펩티드를 추가로 코딩한다. 예시적인 치료적 폴리펩티드는 본원의 다른 곳에서 설명한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 인간화 또는 키메라 CD3 항체 융합 단백질의 생산 방법에 관한 것이고, 상기 방법은
- [0454] a) 상기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하고,
- [0455] b) 배양 배지로부터 인간화 또는 키메라 CD3 항체 융합 단백질을 회수 및/또는 정제하는 단계를 포함한다.
- [0456] 조성물
- [0457] 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 및 실시양태에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0458] 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 하나의 측면 및 실시양태에서 규정되는 항체 또는 이중특이적 항체, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0459] 제약 조성물은 통상의 기술, 예컨대 문헌 [77]에 개시된 기술에 따라 제약상 허용되는 담체 또는 희석제 및 임의의 다른 알려진 보조제 및 부형제를 사용하여 제제화될 수 있다.
- [0460] 제약상 허용되는 담체 또는 희석제 및 임의의 다른 알려진 보조제 및 부형제는 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체 및 선택된 투여 방식에 적합하여야 한다. 제약 조성물의 담체 및 다른 성분은 대한 적합성은 항원 결합에 대한 본 발명의 선택된 화합물 또는 제약 조성물의 요구되는 생물학적 특성에 대한 유의한 부정적인 영향의 결여 (예를 들어, 실질적인 영향 미만 (10% 이하의 상대적인 억제, 5% 이하의 상대적인 억제 등))를 기초로 하여 결정된다.

- [0461] 본 발명의 제약 조성물은 또한 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제 (예를 들어, 비이온성 세제, 예컨대 트윈 (Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-미함유 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 제약 조성물에 포함되기 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0462] 본 발명의 제약 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성이 아니면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 요구되는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변경될 수 있다. 선택되는 투여 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료의 지속시간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전체적인 건강 및 이전의 병력, 및 의료계에 널리 공지된 다른 인자를 포함하는 다양한 약동학 인자에 따라 결정될 것이다.
- [0463] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 생체 내에서 및 시험관 내에서 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체를 투여하기 적합한 경로는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 선택될 수 있다.
- [0464] 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구 투여된다.
- [0465] 본원에서 사용되는 문구 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"은 대체로 주사에 의한, 장관 및 외용 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 거미막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0466] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.
- [0467] 제약상 허용되는 담체는 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체와 생리학상 적합성인 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산매, 코팅, 항박테리아 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0468] 본 발명의 제약 조성물에서 사용할 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 옥수수유, 땅콩유, 면실유 및 참기름, 카르복시메틸 셀룰로스 콜로이드성 용액, 트라가칸트 겔 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 및/또는 다양한 완충제를 포함한다. 다른 담체는 제약 업계에 널리 공지되어 있다.
- [0469] 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 수분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 성분을 위한 상기 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상의 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 부적합성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용이 고려된다. "활성 화합물"을 칭할 때, 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체를 또한 칭하는 것으로 고려된다.
- [0470] 적합한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0471] 본 발명의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속-킬레이팅제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함할 수 있다.
- [0472] 본 발명의 제약 조성물은 또한 조성물 내에 등장화제, 예컨대 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 포함할 수 있다.
- [0473] 본 발명의 제약 조성물은 또한 제약 조성물의 저장 수명 또는 유효성을 증진시킬 수 있는, 선택된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 보조제, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 완충제를 함유할 수 있다. 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체는 화합물을 급속한 방출에 대해 보호할 담체와 함께, 예컨대, 임플란트 (implant), 경피 패치 (patch), 및 미세캡슐화 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형으로 제조될 수 있다. 상기 담체는 젤라틴, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리-오르토에스테르, 및 폴리락트산을 단독으로 또는 왁스와 함께, 또는 관련 기술 분야에 널리 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다.

그러한 제제의 제조 방법은 통상의 기술자에게 일반적으로 공지되어 있다 (예를 들어, [78] 참조).

- [0474] 한 실시양태에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체는 생체 내에서 적합한 분포를 보장하도록 제제화될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 수분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 성분을 위한 상기 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상의 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 부적합성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 다른 활성 또는 치료 화합물이 또한 조성물 내에 포함될 수 있다.
- [0475] 주사용 제약 조성물은 대개 제조 및 저장의 조건 하에 무균성이고 안정해야 한다. 조성물은 용액, 미세-에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 고차 구조로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트를 함유하는 수성 또는 비수성 용매 또는 분산매일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 내에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예컨대 글리세롤, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능 조성물의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물 내에 포함시킴으로써 일어날 수 있다. 멸균 주사용 용액은 활성 화합물을 요구되는 양으로 적절한 용매 내에, 요구되는 경우에 예를 들어 상기 열거한 것과 같은 성분 중 하나 또는 그의 조합물과 함께 포함시킨 후 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산매 및 예를 들어 상기 열거한 것으로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 포함시킴으로써 제조한다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법의 예는 그의 앞서 멸균-여과시킨 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 요구되는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결 건조)이다.
- [0476] 멸균 주사용 용액은 활성 화합물을 요구되는 양으로 적절한 용매 내에, 요구되는 경우에 예를 들어 상기 열거한 것과 같은 성분 중 하나 또는 그의 조합물과 함께 포함시킨 후 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산매 및 예를 들어 상기 열거한 것으로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 포함시킴으로써 제조한다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법의 예는 그의 앞서 멸균-여과시킨 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 요구되는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결 건조)이다.
- [0477] 치료 용도
- [0478] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 설명된 임의의 측면 또는 실시양태에 규정된 바와 같은 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0479] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료에 사용하기 위한, 본원에 설명된 임의의 측면 또는 실시양태에 규정된 바와 같은 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0480] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체 또는 제약 조성물은 세포독성 T-세포의 이펙터 메카니즘이 요구되는 임의의 암의 치료에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화 또는 키메라 항체는 암, 염증성 또는 자가면역 장애와 같은 장애를 치료하거나 예방하기 위해 배양액 내의 세포에, 예를 들어, 시험관 내에서 또는 생체 외에서, 또는 인간 대상체에게, 예를 들어 생체 내에서 투여될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 용어 "대상체"는 대개 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물에 반응하는 인간이다. 대상체는 예를 들어 표적 기능을 조정함으로써 또는 세포의 사멸을 직접 또는 간접적으로 유도함으로써 치료하거나 개선할 수 있는 장애가 존재하는 인간 환자를 포함할 수 있다.
- [0481] 또 다른 측면에서, 본 발명은 T-세포의 동원이 치료 또는 예방에 기여하는 장애, 예컨대 암의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공하고, 이 방법은 치료 유효량의 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이 방법은 일반적으로 대상체에게 인간화 또는 키메라 항체를 장애를 치료하거나 예방하기 위해 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0482] 하나의 특정 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 및 실시양태에서 규정된 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체 또는 제약 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법에 관한 것이다.

- [0483] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에서 규정되는 용도 또는 방법에 관한 것이고, 여기서 인간화 또는 키메라 항체는 CD3 및 암-특이적 표적, 또는 암에서 과다발현되거나 암과 연관된 표적, 예컨대 HER2, CD19, EpCAM, EGFR, CD66e (또는 CEA, CEACAM5), CD33, EphA2 또는 MCSP (또는 HMW-MAA) 둘 모두에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체이고, 질환은 암, 예컨대 유방암, 전립선암, 비-소세포 폐암, 방광암, 난소암, 위암, 결직장암, 식도암 및 두정부의 편평 상피 세포 암종, 경부암, 췌장암, 정소암, 악성 흑색종, 연조직 암 (예를 들어, 활막 육종), 무통성 또는 침습성 형태의 B-세포 림프종, 만성 림프성 백혈병 또는 급성 림프성 백혈병이다.
- [0484] 인간화 또는 키메라 항체의 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료되는 질환 또는 병태에 따라 결정되고, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.
- [0485] 관련 기술 분야의 통상의 기술을 갖는 의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사는 제약 조성물에 사용된 인간화 또는 키메라 항체의 용량을 요구되는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 수준보다 더 낮은 수준으로 출발하고, 요구되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 용량은 특정 투여 요법에 따라 치료 효과를 생성하기 위해 효과적인 최저 용량인 인간화 또는 키메라 항체의 양일 것이다. 상기 효과적인 용량은 일반적으로 상기 설명한 인자에 따라 결정될 것이다.
- [0486] 예를 들어, 치료 용도를 위한 "유효량"은 질환의 진행을 안정화하는 그의 능력에 의해 측정할 수 있다. 암을 억제하는 화합물의 능력은 예를 들어 인간 종양에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 상기 특성은 통상의 의사에게 알려진 시험관 내 검정에 의해 세포 성장을 억제하거나 세포독성을 유도하는 인간화 또는 키메라 항체의 능력을 검사함으로써 평가할 수 있다. 치료 화합물, 즉, 본 발명에 따른 치료적 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물의 치료 유효량은 종양 크기를 감소시키거나, 또는 대상체의 증상을 개선할 수 있다. 통상의 기술자는 대상체의 크기, 대상체의 증상의 중증도, 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자를 기초로 하여 상기 양을 결정할 수 있을 것이다.
- [0487] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체의 치료 유효량의 예시적인 비-제한적인 범위는 약 0.001-30 mg/kg, 예컨대 약 0.001-20 mg/kg, 예컨대 약 0.001-10 mg/kg, 예컨대 약 0.001-5 mg/kg, 예를 들어 약 0.001-2 mg/kg, 예컨대 약 0.001-1 mg/kg, 예를 들어 약 0.001, 약 0.01, 약 0.1, 약 1, 약 5, 약 8, 약 10, 약 12, 약 15, 약 18 mg/kg이다.
- [0488] 투여는 예를 들어 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 투여될 수 있고, 예를 들어 표적 부위에 근접하게 투여될 수 있다.
- [0489] 상기 치료 방법 및 용도에서 투여 요법은 요구되는 최적 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스 (bolus)가 투여될 수 있거나, 몇몇의 분할된 용량이 일정 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 또는 용량은 치료 상황의 응급성에 따라 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다.
- [0490] 한 실시양태에서, 치료 효율은 요법 동안, 예를 들어 미리 규정된 시점에 모니터링된다.
- [0491] 요구되는 경우에, 제약 조성물의 효과적인 1일 용량은 임의로 단위 투여 형태로, 1일 전체에 걸쳐 적절한 간격으로 분리되어 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 초과 하위-용량으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체, 또는 제약 조성물은 임의의 원치 않는 부작용을 최소화하기 위해 긴 시간, 예컨대 24 시간 초과 시간에 걸친 느린 연속 주입에 의해 투여된다.
- [0492] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체를 단독 투여하는 것이 가능하지만, 인간화 또는 키메라 항체를 상기 설명된 바와 같이 제약 조성물로서 투여하는 것이 바람직하다.
- [0493] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체의 효과적인 용량은 또한 매주, 격주 또는 매3주의 투여 기간을 사용하여 투여될 수 있다. 투여 기간은 예를 들어, 8주, 12주로 또는 임상 진행이 확립될 때까지 제한될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체의 효과적인 용량은 2주, 3주 또는 4주마다 투여될 수 있다.
- [0494] 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체는 mg/m^2 단위로 계산된 매주 투여량으로 주입에 의해 투여될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어 다음에 따라 상기 제시된 mg/kg 투여량을 기초로 하여 결정될 수 있다: 용량 (mg/kg) x 70: 1.8. 상기 투여는 예를 들어 1 내지 8회, 예컨대 3 내지 5회 반복될 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예컨대 2 내지 12시간의 기간에 걸친 연속 주입에 의해 수행할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체는 독성 부작용을 감소시키기 위해 긴 시간, 예컨대 24시간 초과 시간에 걸쳐 느린 연속 주입

에 의해 투여될 수 있다.

- [0495] 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체는 1주 1회 제공될 때 8회 이하, 예컨대 4 내지 6회 동안 고정된 용량으로 계산된 매주 투여량으로 투여될 수 있다. 상기 요법은 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에, 필요한 경우 1회 이상 반복될 수 있다. 상기 고정된 투여량은 예를 들어 체중 추정치 70 kg에서, 상기 제시된 mg/kg 투여량을 기초로 하여 결정될 수 있다. 투여량은 예를 들어 생물학적 샘플을 채취하고 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체의 결합 영역을 표적화하는 항-이디오타입 항체를 사용하여 투여시의 혈액 내의 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체의 양을 측정함으로써 결정되거나 조정될 수 있다.
- [0496] 한 실시양태에서, 인간화 또는 키메라 항체는 6개월 이상의 기간 동안, 예를 들어 1주 1회의 유지 요법에 의해 투여될 수 있다.
- [0497] 인간화 또는 키메라 항체는 또한 암 발생 위험을 감소시키고/시키거나, 암 진행에서 사건의 발생 개시를 지연하고/하거나, 또는 암이 완화될 때 재발 위험을 감소시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다.
- [0498] 비경구 조성물은 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단위 투여 형태로 제제화될 수 있다. 본원에서 사용되는 단위 투여 형태는 치료되는 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 나타내고; 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 함께 요구되는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태의 내역은 (a) 활성 화합물의 특유한 특징 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체의 민감성 문제 해결을 위한 상기 활성 화합물의 배합 기술에 고유한 제한사항에 의해 좌우되고, 이들에 직접적으로 의존한다.
- [0499] 인간화 또는 키메라 항체는 또한 암 발생 위험을 감소시키고/시키거나, 암 진행에서 사건의 발생 개시를 지연하고/하거나, 또는 암이 완화될 때 재발 위험을 감소시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다. 이것은 다른 생물학적 인자에 의해 존재하는 것으로 알려진 종양의 위치를 파악하는 것이 어려운 환자에서 특히 유용할 수 있다.
- [0500] 진단 용도
- [0501] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체는 또한 본원에 설명된 바와 같은 인간화 또는 키메라 항체를 포함하는 조성물을 사용하여 진단 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본원에서 설명된 인간화 또는 키메라 항체를 사용하는 진단 방법 및 조성물을 제공한다. 그러한 방법 및 조성물은 순수하게 진단 목적을 위해, 예컨대 질환을 검출 또는 확인하기 위해, 및 치료적 처치의 진행을 모니터링하고, 질환 진행을 모니터링하고, 치료 후 상태를 평가하고, 질환의 재발을 모니터링하고, 질환 발병의 위험을 평가하는 등을 위해 사용될 수 있다.
- [0502] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체, 본 발명에 따른 조성물 또는 본 발명에 따른 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CD3-발현 세포의 관련 또는 축적을 특징으로 하는 질환의 진단 방법에 관한 것이고, 여기서 임의로 상기 인간화 또는 키메라 항체는 검출가능한 작용제로 표지된다.
- [0503] 한 측면에서, 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체는 생체 외에서 사용되고, 예컨대 환자로부터 취한 샘플 내에서 표적의 수준, 또는 그들의 세포 표면 상에 관심있는 표적을 발현하는 세포의 수준을 검출함으로써 세포가, 인간화 또는 키메라 항체가 결합하고 질환을 표시하거나 병인에 관여되는 관심있는 특이적 표적을 발현하는 질환을 진단하는데 사용된다. 이것은 예를 들어, 시험할 샘플을 임의로 대조군 샘플과 함께, 표적에 대한 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 본 발명에 따른 인간화 또는 키메라 항체와 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 이어서, 복합체 형성을 검출할 수 있다 (예를 들어, ELISA를 이용하여). 대조군 샘플을 시험 샘플과 함께 사용할 때, 인간화 또는 키메라 항체 또는 항체-표적 복합체의 수준을 샘플 둘 모두에서 분석하고, 시험 샘플 내에서 통계상 유의하게 더 높은 수준의 인간화 또는 키메라 항체 또는 항체-표적 복합체는 대조군 샘플에 비해 시험 샘플 내에 더 높은 수준의 표적을 나타낸다.
- [0504] 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체를 사용할 수 있는 통상의 면역검정의 예는 비제한적으로 ELISA, RIA, FACS 검정, 플라스몬 공명 검정, 크로마토그래피 검정, 조직 면역조직화학, 웨스턴 블롯 (Western blot), 및/또는 면역침전을 포함한다.
- [0505] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 항체, 이중특이적 항체, 조성물 또는 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, CD3-발현 세포의 관련 또는 축적을 특징으로 하는 질환의 진단 방법에 관한 것이고, 임의로 여기서 항체는 검출가능 표지로 표지된다.
- [0506] 한 실시양태에서, 본 발명은

- [0507] - 샘플 내의 표적에 대한 인간화 또는 키메라 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 샘플을 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체와 접촉시키고;
- [0508] - 복합체의 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내에서 표적, 또는 표적을 발현하는 세포의 존재를 검출하는 방법에 관한 것이다. 대개, 샘플은 생물학적 샘플이다.
- [0509] 한 실시양태에서, 샘플은 특이적 표적 및/또는 표적을 발현하는 세포를 함유하는 것으로 공지되거나 의심되는 조직 샘플이다. 예를 들어, 표적 발현의 현장 (in situ) 검출은 환자로부터 조직학적 시료를 제거하고, 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체를 상기한 시료에 제공함으로써 달성할 수 있다. 인간화 또는 키메라 항체는 인간화 또는 키메라 항체를 시료에 적용하거나 덮음으로써 제공될 수 있고, 이것은 이어서 적합한 수단을 이용하여 검출된다. 이어서, 표적 또는 표적-발현 세포의 존재뿐만 아니라, 또한 검사한 조직 내에서 표적 또는 표적-발현 세포의 분포를 결정하는 것이 가능하다 (예를 들어, 암세포의 확산을 평가하는 측면에서). 본 발명을 이용하여, 통상의 기술자는 상기 현장 검출을 달성하기 위해 임의의 매우 다양한 조직학적 방법 (예컨대 염색 절차)이 변형될 수 있음을 쉽게 알 것이다.
- [0510] 상기 검정에서, 인간화 또는 키메라 항체는 결합된 항체가 검출되도록 허용하는 검출가능 물질로 표지될 수 있다. 대안적으로, 결합된 (1차) 특이적 인간화 또는 키메라 항체는, 검출가능 물질로 표지되고 1차 특이적 인간화 또는 키메라 항체에 결합하는 항체에 의해 검출될 수 있다. 또한, 상기 검정에서, 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물을 사용할 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다.
- [0511] 샘플 내의 표적의 수준은 또한 검출가능 물질로 표지된 표적 표준물 및 비표지된 조직-특이적 인간화 또는 키메라 항체를 사용하는 경쟁 면역검정에 의해 추정할 수 있다. 상기 유형의 검정에서, 생물학적 샘플, 표지된 표적 표준물(들) 및 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체를 합하고, 비표지된 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 결합된 표지된 표적 표준물의 양을 결정한다. 생물학적 샘플 내의 표적의 양은 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 결합된 표지된 표적 표준물의 양에 반비례한다.
- [0512] 시험관 내 진단 기술에 사용되는 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체, 2차 항체 및/또는 표적 표준물을 위한 적합한 표지는 비제한적으로 다양한 효소, 보결기, 형광 물질, 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제 및 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결기 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 및 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , 및 ^3H 를 포함한다.
- [0513] 한 측면에서, 본 발명의 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체는 종양과 같은 표적-발현 조직의 생체 내 영상화에서 사용된다. 생체 내 방법을 위해, 예를 들어, (Fab')₂, Fab 및 Fab' 단편과 같은 항체 단편이 그들의 빠른 분포 운동학 때문에 특히 유익하다.
- [0514] 생체 내 영상화는 임의의 적합한 기술에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, ^{99}Tc , ^{131}I , ^{111}In 또는 다른 감마-선 방출 동위원소로 표지된 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체 (예를 들어, 항체 또는 단편)는 대개 저-에너지 고해상 콜리메이터 (collimator) 또는 저-에너지 다목적 콜리메이터를 이용하는, 감마 섬광 카메라 (예를 들어, 엘신트 에이펙스 (Elsint Apex) 409ECT 장치)를 사용하여 종양과 같은 표적-발현 조직 내에서 표적-특이적 항체 축적 또는 분포를 영상화하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, ^{89}Zr , ^{76}Br , ^{18}F 또는 다른 양전자-방출 방사성 핵종을 사용한 표지는 양전자 방출 단층촬영(PET)을 이용하여 종양 내에서 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체, 또는 항체 단편 분포를 영상화하기 위해 사용될 수 있다. 상기 기술을 사용하여 얻어진 영상은 예를 들어 암/종양 세포의 존재에 대한 바이오마커로서 표적을 이용하는 측면에서, 환자, 포유동물 또는 조직 내의 표적의 생물분포를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 상기 기술에 대한 변이는 감마 카메라 기술에 비해 영상화를 개선하기 위해 자기 공명 영상 (MRI)의 이용을 포함한다. 통상의 면역노신티그래피 (immunoscintigraphy) 방법 및 원리는 예를 들어, 문헌 [79], [80], 및 [81]에 설명되어 있다. 또한, 상기 영상은 또한 또는 대안적으로, 종양을 제거하기 위한 수술 기술에 대한 기초로서 역할을 할 수 있다. 또한, 그러한 생체 내 영상화 기술은 환자가 종양이 있는 것으로 확인되지만 (다른 바이오마커, 전이 등의 존재 때문에), 전통적인 분석 기술에

의해 종양을 확인할 수 없는 상황에서 종양의 확인 및 위치결정을 허용할 수 있다. 이들 모든 방법은 본 발명의 특징이다.

- [0515] 본 발명에 의해 제공된 생체 내 영상화 및 다른 진단 방법은 인간 환자 (예를 들어, 이전에 암으로 진단받지 않은 환자, 또는 암으로부터 회복/완화 기간에 있는 환자)에서 미세전이의 검출에서 특히 유용하다.
- [0516] 한 실시양태에서, 본 발명은 생체 내 영상화 방법을 제공하고, 여기서 본 발명의 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체는 검출-촉진 방사성 불투과제에 접합되고, 접합된 인간화 또는 키메라 항체는 예컨대 혈류 내로 주사함으로써 숙주에게 투여되고, 숙주 내의 표지된 인간화 또는 키메라 항체의 존재 및 위치가 검정된다. 본원에 제공된 상기 기술 및 임의의 다른 진단 방법을 통해, 본 발명은 인간 환자, 또는 인간 환자로부터 취한 생물학적 샘플 내에서 질환-관련 세포의 존재를 스크리닝하는 방법, 및/또는 표적-특이적 ADC 요법에 앞서 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체의 분포를 평가하기 위한 방법을 제공한다.
- [0517] 진단적 영상화를 위해, 동위원소는 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 직접적으로 또는 중재 기능기를 사용하여 간접적으로 결합될 수 있다. 유용한 중재 기능기는 킬레이터, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 및 디에틸렌트리아민헨타아세트산을 포함한다 (예를 들어 [82] 참조).
- [0518] 방사성 동위원소 및 방사성 불투과제에 추가로, 진단 방법은 자기 공명 영상 (MRI)을 위한 염료 (예컨대 비오틴-스트렙타비딘 복합체), 조영제, 형광 화합물 또는 분자 및 형광 증강제 (예를 들어, 상자성 이온)에 접합된 표적-특이적 항체를 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, MRI 기술 및 MRI 증강제에 접합된 항체의 제조를 설명하는 문헌 [83] 참조). 상기 진단제/검출제는 MRI에 사용하기 위한 작용제, 및 형광 화합물로부터 선택될 수 있다. 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 방사성 금속 또는 상자성 이온을 로딩하기 위해, 이것을 이온을 결합시키기 위해 다수의 킬레이팅기가 그에 부착되는 긴 꼬리를 갖는 시약과 반응시키는 것이 필요할 수 있다. 그러한 꼬리는 중합체, 예컨대 폴리리신, 다당체, 또는 예를 들어, 폴피린, 폴리아민, 크라운 에테르 (crown ether), 비스티오세미카르바존, 폴리옥심 및 상기 목적을 위해 유용한 것으로 공지된 유사한 기와 같은, 킬레이팅기에 결합될 수 있는 펜던트 (pendant) 기를 갖는 다른 유도체화된 또는 유도체화가능한 쇠일 수 있다. 킬레이트는 표준 화학을 이용하여 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 결합될 수 있다.
- [0519] 따라서, 본 발명은 진단적 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체를 제공하고, 여기서 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체는 조영제 (예컨대 자기 공명 영상, 컴퓨터 단층촬영, 또는 초음파 조영-증강제), 또는 방사성 핵종 (예를 들어 감마-, 베타-, 알파-, 오제 (Auger) 전자-, 또는 양전자-방출 동위원소일 수 있는)에 접합된다.
- [0520] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체를 포함하는 진단 조성물에 관한 것이다.
- [0521] 추가의 측면에서, 본 발명은
- [0522] - 본 발명의 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체; 및
- [0523] - 키트의 사용 설명서를 포함하는, 샘플 내에서 표적 항원 또는 항원을 발현하는 세포의 존재를 검출하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0524] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 a) 항체 또는 이중특이적 항체와 CD3 사이의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에, 샘플을 본 발명에 따른 항체 또는 이중특이적 항체와 접촉시키고, b) 복합체의 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 샘플 내에서 CD3 항원, 또는 CD3을 발현하는 세포의 존재를 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [0525] 한 실시양태에서, 본 발명은 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체, 및 표적에 대한 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체의 결합을 검출하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 용기를 포함하는, 암의 진단을 위한 키트를 제공한다. 시약은 예를 들어, 형광 태그, 효소 태그, 또는 다른 검출가능 태그를 포함할 수 있다. 시약은 또한 효소 반응을 위한 2차 또는 3차 항체 또는 시약을 포함할 수 있고, 여기서 효소 반응은 가시화될 수 있는 생성물을 생산한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 적합한 용기(들) 내에 표지된 또는 비표지된 형태의 본 발명의 하나 이상의 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체, 간접 검정을 위한 인큐베이션을 위한 시약, 및 표지의 성질에 따라 그러한 검정에서 검출을 위한 기질 또는 유도체화제를 포함하는 진단 키트를 제공한다. 대조군 시약(들) 및 사용 설명서가 또한 포함될 수 있다.
- [0526] 진단 키트는 또한 조직 샘플 또는 숙주 내에서 표적의 존재의 검출을 위해, 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체, 예컨대 표지된 표적-특이적 항체와 함께 사용하기 위해 제공될 수 있다. 그러한 진단 키트에서 및 본원에서 다른 곳에서 설명한 치료 용도를 위한 키트에서, 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체는 대개 단독으로 또는 표적 세포 또는 펩티드에 특이적인 추가의 항체와 함께 용기 내에 동결건조된 형태로 제공될 수 있다.

대개, 제약상 허용되는 담체 (예를 들어, 불활성 희석제) 및/또는 그의 성분, 예컨대 트리스, 포스페이트, 또는 카르보네이트 완충제, 안정화제, 보존제, 살생물제, 불활성 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민 등 (대개 혼합을 위해 별개의 용기 내에) 및 추가의 시약 (또한 대개 별개의 용기(들) 내에)이 또한 포함된다. 특정 키트에서, 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체에 결합할 수 있는 2차 항체 (이것은 대개 별개의 용기 내에 존재한다)가 또한 포함된다. 제2 항체는 대개 표지에 접합되고, 본 발명의 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체와 유사한 방식으로 제제화된다. 상기 및 본원에서 다른 곳에서 설명된 방법을 이용하여, 표적-특이적 인간화 또는 키메라 항체는 암/종양 세포의 하위집단을 규정하고 상기 세포 및 관련 종양 조직을 특정화하기 위해 사용될 수 있다.

[0527] 항-이디오타입 항체

[0528] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에 설명된 바와 같이 본 발명의 인간화 또는 키메라 항체에 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

[0529] 항-이디오타입 (Id) 항체는 항체의 항원-결합 부위와 일반적으로 연관된 특유한 결정인자 (determinant)를 인지하는 항체이다. 항-Id 항체는 CD3 모노클로날 항체의 공급원과 동일한 종 및 유전자형의 동물을 그에 대한 항-Id가 생성되는 모노클로날 항체로 면역화시킴으로써 제조할 수 있다. 면역화된 동물은 대개 이들 이디오타입 결정인자에 대한 항체 (항-Id 항체)를 생산함으로써 면역화 항체의 이디오타입 결정인자를 인지하고 반응할 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어 US 4,699,880에 설명되어 있다. 상기 항체는 본 발명의 추가의 특색이다.

[0530] 항-Id 항체는 또한 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하여 소위 항-항-Id 항체를 생산하기 위해 "면역원"으로서 사용될 수 있다. 항-항-Id 항체는 본래의 모노클로날 항체와 에피토프가 동일할 수 있고, 이것은 항-Id 항체를 유도하였다. 따라서, 모노클로날 항체의 이디오타입 결정인자에 대한 항체를 사용함으로써, 동일한 특이성의 항체를 발현하는 다른 클론을 확인할 수 있다. 항-Id 항체는 임의의 적합한 기술, 예컨대 본 발명의 CD3-특이적 항체에 관하여 본원의 다른 곳에 설명된 기술에 의해 변이되고/되거나 (그에 의해 항-Id 항체 변이체를 생성한다) 및/또는 유도체화될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항-Id 항체는 키홀 림프 헤모시아닌 (KLH)과 같은 담체에 결합되고 BALB/c 마우스를 면역화시키기 위해 사용될 수 있다. 이들 마우스로부터 혈청은 일반적으로 동일하지 않더라도 본래의/모 CD3 항체와 유사한 결합 특성을 갖는 항-항-Id 항체를 함유한다.

[0531] 서열

표 1

서열 번호:	클론 명칭	서열
서열 :1	huCD3 VH CDR1	GFTFNTYA
서열 :2	huCD3 VH CDR2	IRSKYNNYAT
서열 :3	huCD3 VH CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
서열 :4	huCD3 VL CDR1	TGAVTTSNY
	huCD3 VL CDR2	GTN
서열 :5	huCD3 VL CDR3	ALWYSNLWV
서열 :6	huCD3 VH1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSS
서열 :7	huCD3 VH2	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSS

[0532]

		VTVSS
서열 :8	huCD3 VH3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVAR <u>IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL</u> YMQMNSLKTEDTAMYYC <u>VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT</u> LTVSS
서열 :9	huCD3 VH4	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVAR <u>IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL</u> YMQMNSLKTEDTAMYYC <u>VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT</u> LTVSS
서열 :10	huCD3 VL1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIG <u>GTN</u> KRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
서열 :11	huCD3 VL2	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIG <u>GTN</u> KRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
서열 :12	huCD3 VL3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIG <u>GTN</u> KRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
서열 :13	성숙 인간 CD3ε (엡실론)	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHN DKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPN PDYEPIRKQQRDLYSGLNQRR
서열 :14	인간 CD3δ (델타)	FKPIELEDREVFNVCNTSITWVEGTVGTLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA GIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
서열 :15	IgG1m(f) 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
서열 :16	IgG1m(f)-LFLEDA 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVV <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
서열 :17	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYGMFWVRQAPGKGLE WVATISRYSYIYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRPLYGSSPDYWGQGTLVTVSS

[0533]

서열:18	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTVVHWYQQKPGQAPRLIIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCFQGSQGYPLTFGS GTKLEMR
서열:19	VH HER2 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGISWVRQAPGQGLE WMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDIVVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
서열:20	VL HER2 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPRT FGQGTKVEIK
서열:21	성숙 시노물거스 CD3ε (엡실론)	QDGNEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCQHLGSEAQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMATIVIVDICITLGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPVPNPDPYPIRKGGQDLYSGLNQRRRI
서열:22	성숙 레저스 CD3ε (엡실론)	QDGNEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCQHLGSEVQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMATIVIVDICITLGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPVPNPDPYPIRKGGQDLYSGLNQRRRI
서열:23	IgG1m(f)-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
서열:24	IgG1m(f)-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
서열:25	IgG1m(f)-LFLEDA- F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K
서열:26	IgG1m(f)-LFLEDA- K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K
서열:27	모 류린 VH	EVKLLESGGLVQPKGSLKLS AASGFTFTNTYAMNWWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYADSV KDRFTISRDDSQSILYLQMNLL

[0534]

서열:28	모 류린 VL	KTEDTAMYYCVRHGNGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSA QAVVTQESALTTPGETVLTLC RSSIGAVTISNYANWVQEKPDH LFTGLIGGNTKRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
서열:29	VH CD20 - 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRLRLSCAASGFTFHDIYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRADETALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTITVTVSS
서열:30	VL CD20 - 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLIIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTREIK

[0535]

[0536]

[0537]

[0538]

[0539]

실시예

실시예 1 - 인간화 CD3 항체 및 비-활성화 항체 변이체의 생성

CD3 항체의 인간화

류린 CD3 항체 (US 8,236,308, IgG1-CD3으로서 본원에 설명됨)의 인간화는 배선 인간화 (CDR-이식) 기술 (EP 0 629 240)의 개선된 버전을 이용하여 안티토프 (Antitope) (영국 캠브리지)에 의해 수행되었다. 상기 기술을 이

용하여, 4가지 상이한 VH 쇠 (서열 6, 7, 8, 및 9) 및 3가지 상이한 VL 쇠 (서열 10, 11, 및 12)를 설계하였다. 이들 4가지 VH를 3가지 VL 쇠와 조합함으로써, 12가지 상이한 항체를 생성하였다. 인간화 변이체는 본원에서 huCD3으로서 설명한다. 따라서, 본 발명에 따른 VH 및 VL을 포함하는 인간화 변이체를 예를 들어, IgG1-huCD3-H1L1로서 설명하고, 이것은 상기 특이적 변이체가 IgG1 이소형의 것이고, 인간화 CD3이고, 서열 6에 따라 규정되는 "H1"로 명명한 VH 아미노산 서열, 및 서열 10에 따라 규정되는 "L1"로 명명한 VL 아미노산 서열을 포함하는 것을 의미한다. 따라서, H1은 가변 중쇄 영역 VH1을 나타내고, L1은 가변 경쇄 영역 VL1을 나타내고 이하 같은 방식이다.

[0540] 특히, 변이체 IgG1-huCD3-H1L1 (서열 6에 제시된 VH1 서열 및 서열 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H1L2 (서열 6에 제시된 VH1 서열 및 서열 11에 제시된 VL2 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H1L3 (서열 6에 제시된 VH1 서열 및 서열 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L3 (서열 8에 제시된 VH3 서열 및 서열 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H4L1 (서열 9에 제시된 VH4 서열 및 서열 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L1 (서열 8에 제시된 VH3 서열 및 서열 10에 제시된 VL1 서열을 포함하는 인간화 CD3), IgG1-huCD3-H3L3 (서열 8에 제시된 VH3 서열 및 서열 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3), 및 IgG1-huCD3-H4L3 (서열 9에 제시된 VH4 서열 및 서열 12에 제시된 VL3 서열을 포함하는 인간화 CD3)을 본원에 설명되는 실시예에서 생성하고 시험하였다.

[0541] 일부 예에서, huCLB-T3/4의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 (각각 서열 17 및 18)을 포함하는 항체를 Fc 영역 내의 상이한 비-활성화 돌연변이 조합을 입증하기 위해 (실시예 8 내지 10 참조) 및 대조군 항체로서 사용하였다 (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50). huCBL-T3/4는 무린 CD3 항체 CLB-T3/4의 인간화 버전이다 (Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9): 749-63). 두 서열 (서열 17 및 18)을 모두 관련 pcDNA3.3 (인비트로젠) 발현 벡터 내로 클로닝하고, HEK293F 세포 내의 동시형질감염에 의해 발현시켰다. 생성되는 대조군 항체를 IgG1-huCLB-T3/4로서 설명한다.

[0542] 일부 예에서, CD20 항체 7D8의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 (서열 29는 VH 서열에 대응하고, 서열 30은 VL 서열에 대응한다)을 포함하는 항체를 양성 대조군으로서 사용하였다. 양성 대조군의 측면에서 사용할 때 이것을 "IgG1-CD20"으로 칭한다.

[0543] 이들 IgG1-CD3 (즉, 키메라, 모 CD3 항체), IgG1-huCD3 및 IgG1-huCLB-T3/4 항체를 단일특이적 및 이중특이적 형식으로 사용하였고, 여기서 이중특이적 항체는 아래 설명된 바와 같이 생성하였다.

[0544] HER2 항체

[0545] 일부 예에서, HER2에 대한 항체를 사용하였다. 상기 HER2-특이적 항체에 대한 VH 및 VL 서열 (항체 169, 각각 서열 19 및 20)은 이전에 설명되었다 (WO2012/143524 [젠맵]; [Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50]). 항체를 단일특이적 및 이중특이적 형식으로 모두 사용하였고, "IgG1-HER2"로 칭한다.

[0546] b12 항체

[0547] 일부 예에서, gp120 특이적 항체인 항체 b12 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3): 812-23)를 음성 대조군으로서 사용하였고, "IgG1-b12"로 칭한다.

[0548] 발현

[0549] 항체는 아래 설명된 방법에 의해 이중특이적 항체의 생성을 가능하게 하는 CH3 도메인 내의 돌연변이를 갖고 아래 설명된 비-활성화 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 IgG1, κ 또는 IgG1, λ 로서 발현시켰다: IgG1-HER2-K409R, IgG1-b12-K409R, IgG1-CD3-F405L. 항체의 중쇄 및 경쇄를 모두 코딩하는 플라스미드 DNA 혼합물을 본질적으로 제조자가 설명한 바와 같이 293fectin (인비트로젠, 미국)을 이용하여 프리스타일 (Freestyle) HEK293F 세포 (인비트로젠, 미국)로 일시적으로 형질감염시켰다.

[0550] 항체의 정제

[0551] 배양 상청액을 0.2 μ m 전량 여과 필터 (dead-end filter) 상에서 여과하고, 5 mL MabSelect SuRe 컬럼 (지이 헬스케어 (GE Healthcare)) 상에 로딩하고, 0.1 M 시트르산나트륨-NaOH (pH 3)로 용리시켰다. 용리액을 2M 트리스-HCl (pH 9)로 즉시 중화시키고, 12.6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl (pH 7.4) (비.브라운 (B.Braun))로 철야 투석하였다. 대안적으로, 정제 후에, 용리액을 HiPrep 탈염 컬럼 상에 로딩하고, 항체를 12.6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl (pH 7.4) (비.브라운) 완충제 내로 교환하였다. 투석 또는 완충제의 교환 후에, 샘플을 0.2 μ m 전량

여과 필터 위로 멸균 여과하였다. 순도는 SDS-PAGE에 의해 결정하고, 농도는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정하였다. 정제된 항체를 2-8℃에서 저장하였다.

[0552] 이종특이적 항체의 생성

[0553] 이종특이적 항체는 듀오바디® 플랫폼 기술, 즉, WO 2011/147986 및 문헌 [Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50]; [Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962-973]에 설명된 바와 같이 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환을 이용하여 시험관 내에서 생성하였다. 본 방법에 의한 이종특이적 항체의 생산을 가능하게 하기 위해, CH3 도메인 내에 단일 돌연변이를 보유하는 IgG1 분자를 생성하였다: 하나의 모 IgG1 항체 내에 F405L 돌연변이 (즉, IgG1-CD3 항체), 다른 모 IgG1 항체 내에 K409R 돌연변이 (즉, HER2 또는 b12 항체). 이종특이적 항체를 생성하기 위해, 이들 2개의 모 항체 (각각의 항체는 0.5 mg/mL의 최종 농도에서)를 25 또는 75 mM 2-머캅토에틸아민-HCl (2-MEA)과 함께 500 μ l TE의 총 부피 내에서 31℃에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 25 mL PBS로 평형화시킨 PD-10 컬럼 (지이-헬스케어, 제품 #17-0851-01)을 사용하여 환원제 2-MEA를 제거할 때 환원 반응이 중지되었다. 탈염에 앞서, 2 mL PBS (비.브라운, 제품 #3623140)를 샘플에 첨가하여 부피를 2.5 mL로 조정하였다. 용리는 3.5 mL PBS 내에서 이루어졌다. 샘플을 아미콘 (Amicon) 울트라 원심분리 유닛 (30 kD MWCO, 밀리포어 (Millipore), 제품 #UFC803096) 내에 수집하고, 3000x g에서 8 min 원심분리하여 농축시켰다. PBS로 부피를 500 μ l로 조정하고 (필요할 때), 샘플을 0.2 μ m 필터 (밀렉스-지브이 (Millex-GV), 제품 #SLGV004SL) 위로 멸균 여과하였다. 이종특이적 생성물을 2-8℃에서 저장하였다.

[0554] 동일한 이종특이적 항체를 얻는 별도의 방식에서, 이종특이적 항체를 생성하기 위해, 100 μ g의 2가지 모 항체를 혼합하고, 75 mM 2-머캅토에틸아민-HCl (2-MEA)와 함께 400 μ l PBS (비.브라운, 제품 #3623140)의 총 부피 내에서 31℃에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 아미콘 울트라 0.5 ml 원심분리 유닛 (10 kD MWCO, 밀리포어, 제품 #UFC501096)를 사용하고 13000x g에서 10 min 원심분리함으로써 400 μ l PBS로 4x 세척함으로써 환원제 2-MEA를 제거할 때 환원 반응이 중지되었다. 필터를 뒤집고 1000 g에서 2 min 원심분리하여 샘플을 새로운 튜브에 수집하였다. PBS로 부피를 200 μ l로 조정하였다 (필요할 때). 이종특이적 생성물의 280 nm의 흡광도 (A280)를 측정하여 최종 농도를 결정하였다. HPLC 양이온 교환 크로마토그래피 (HPLC-CEX) (WO 2013/060867에 설명됨)를 수행하여 이종특이적 생성물의 양을 결정하였다. 샘플을 2-8℃에서 저장하였다.

[0555] 생성된 이종특이적 항체를 이하에서 "K409R IgG1 백본" 및 "F405L IgG1 백본"으로서 설명한다.

[0556] 비-활성화 돌연변이

[0557] Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 몇몇 항체 변이체를 생성하였다. 비-활성화 Fc 영역은 항체가 혈액 세포, 예컨대 단핵구 상에 존재하는 Fc-수용체와, 또는 고전적 보체 경로를 활성화시키도록 C1q와 상호작용하는 것을 방지한다. Fc 활성의 감소를, Fc 영역 내에 상이한 조합의 아미노산 치환을 함유하는 항체 변이체에서 시험하였다. 최대로, 5개의 아미노산 치환을 도입하였고, 이것은 돌연변이 N297Q, L234A, L235A, L234F, L235E, D265A, 및 P331S를 포함한다. 이들 5개의 아미노산 위치 중 하나 이상에서 치환을 K409R 및/또는 F405L IgG1 백본 내에 도입하였다. huCLB-T3/4 항체의 다음 Fc 영역 변이체가 생성되었다: N297Q (N297Q 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-N297Q로 칭함), LFLE (L234F/L235E 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LFLE로 칭함), LALA (L234A/L235A 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LALA로 칭함), LFLENQ (L234F/L235E/N297Q 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ로 칭함), LFLEDA (L234F/L235E/D265A 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA로 칭함), DA (D265A 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-DA로 칭함), DAPS (D265A/P331S 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-DAPS로 칭함), DANQ (D265A/N297Q 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-DANQ로 칭함), LFLEPS (L234F/L235E/P331S 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS로 칭함), 및 LFLEDANQPS (L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S 치환을 나타냄, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS로 칭함).

[0558] 특히, IgG1-huCD3 항체 변이체에서, 3개의 아미노산 치환의 조합 (돌연변이 L234F, L235E 및 D265A를 포함하고 LFLEDA로서 칭함)을 K409R 및 F405L IgG1 백본 내에 도입하여 비-활성화 Fc 영역을 갖는 항체를 생성하였다. 생성되는 비-활성화 항체 변이체를 접미어 "-LFLEDA"를 사용하여 명명한다.

[0559] 실시예 2 - CD3을 발현하는 인간 및 시노물거스 T-세포주에 대한 인간화 CD3 항체 및 그의 비-활성화 변이체의 결합

[0560] 인간 T-세포주 Jurkat (클론 E6-1, ATCC® TIB-152™, 엘지씨 스탠다즈 게엠베하 (LGC Standards GmbH, 독일 베젤)) 또는 시노물거스 T-세포주 HSC-F (cat.no. JCRB1164; 헬스 사이언스 리서치 리소스 बैं크 (Health Science Research Resources Bank, 일본 오사카))에 대한 인간화 CD3 (huCD3) 항체 및 Fc 영역 내에 LFLEDA 돌

연변이를 갖거나 갖지 않는 이중특이적 (bs)IgG1-huCD3 x HER2 분자 (실시에 1 참조)의 정제된 변이체의 결합을 FACS 분석에 의해 분석하였다. 비-활성화 돌연변이, LFLEDA에 추가로, 항체 변이체는 실시에 1에 설명된 바와 같이 F405L 또는 K409R 돌연변이를 함유하였다.

[0561] 세포 (1×10^5 개 세포/웰)을 폴리스티렌 96-웰 둥근-바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원 (Greiner bio-one) 650101) 내에서 항체 제제의 연속 희석액 (3배 희석으로 5 내지 10,000 ng/mL 범위)과 함께 100 μ L PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에서 4°C에서 30 min 동안 인큐베이션하였다.

[0562] PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드로 2회 세척한 후에, 세포를 2차 항체와 함께 4°C에서 30 min 동안 100 μ L 내에서 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 1/100 희석시킨 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')₂ (109-116-098, 잭슨 면역노리서치 래보러토리스, 인크. (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 미국 펜실베이니아주 웨스트그로브))를 모든 실험을 위해 사용하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에서 2회 세척하고, 150 μ L PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 재현탁하고, FACS Cantoll (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences)) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 (GraphPad) 프리즘 (Prism) V5.04 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어 (GraphPad Software), 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여, 비선형 회귀 분석 (변수 기울기를 갖는 s자형 용량-반응 곡선)을 이용하여 분석하였다.

[0563] 도 1a는 야생형 Fc 영역을 갖는 IgG1 λ -huCD3 변이체 IgG1-huCD3-H1L1 (각각 서열 6 및 10), IgG1-huCD3-H1L2 (각각 서열 6 및 11), IgG1-huCD3-H1L3 (각각 서열 6 및 12), IgG1-huCD3-H3L3 (각각 서열 8 및 12), 및 IgG1-huCD3-H4L1 (각각 서열 9 및 10)의 Jurkat 세포에 대한 결합이 모든 변이체에 대해 관찰되었고, IgG1-CD3-LFLEDA (비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 실시에 1에 설명된 바와 같은 모 CD3 항체) 및 비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA의 결합 능력이 야생형 Fc 영역을 갖는 huCD3 변이체와 유사하였음을 보여준다. 양성 대조군으로서 포함된 IgG1-huCLB-T3/4의 Jurkat 세포에 대한 결합은 IgG1-huCD3 변이체에 비해 강하였다. 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[0564] 도 6a는 IgG1-CD3-LFLEDA (비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 실시에 1에 설명된 바와 같은 모 CD3 항체), 비-활성화 LFLEDA 돌연변이를 갖는 IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, 및 IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA의 Jurkat 세포에 대한 결합이 야생형 Fc 영역을 갖는 huCD3 변이체에 대한 결합 능력과 유사하였음을 보여준다. 양성 대조군으로서 포함된 IgG1-huCLB-T3/4의 Jurkat 세포에 대한 결합은 IgG1-huCD3 변이체에 비해 낮은 항체 농도에서 더 강하였지만, 보다 높은 항체 농도에서 유사하였다. 종합하면, 인간화 CD3 변이체는 IgG1-CD3 항체와 같이 CD3에 대한 결합 능력을 유지하였다. 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[0565] 도 1b는 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 CD3 x HER2, bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA, 및 bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA가 또한 Jurkat 세포에 결합함을 보여준다. 이들 이중특이적 항체에 대한 최대 결합 값은 단일특이적 항체의 최대 결합 값보다 더 높다. 이중특이적 항체의 EC50 농도는 6 내지 10배 더 높았다. 다시, 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[0566] 도 6b는 이중특이적 비-활성화 Fc 항체 변이체 bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA가 또한 Jurkat 세포에 결합함을 보여준다. 이들 이중특이적 항체에 대한 최대 결합 값은 단일특이적 항체의 최대 결합 값보다 더 높다. 이중특이적 항체의 EC50 농도는 4 내지 10배 더 높았다. 1가 결합은 보다 많은 항체가 세포 표면 상에 축적하도록 허용하고, 따라서, 이중특이적 항체에 대한 보다 높은 결합 값을 허용한다. 다시, 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[0567] 도 2a는 시노몰거스 T-세포주 HSC-F에 대한 야생형 Fc 영역을 갖는 IgG1-huCD3 변이체 IgG1-huCD3-H1L1, IgG1-huCD3-H1L2, IgG1-huCD3-H1L3, IgG1-huCD3-H3L3 및 IgG1-huCD3-H4L1, 및 IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA의 결합이 유사하였음을 보여준다. 시노몰거스 CD3과 교차-반응하지 않는 대조군 항체 huCLB-T3/4, 및 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[0568] 도 7a는 시노몰거스 T-세포주 HSC-F에 대한 IgG1-huCD3 변이체 IgG1-CD3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, 및 IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA의 결합이 유사하였음을 보여준다. 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

- [0569] 도 2b는 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 CD3 x HER2 및 bsIgG1 huCD3-H3L1-LFLEDA가 또한 HSC-F 세포에 결합함을 보여준다. 이들 이중특이적 항체에 대한 최대 결합 값은 단일특이적 항-CD3 변이체의 최대 결합 값보다 더 높다. 이중특이적 항체의 EC50 농도는 단일특이적 항-CD3 항체보다 10 내지 12배 더 높았다. 다시, 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.
- [0570] 도 7b는 이중특이적 비-활성화 Fc 항체 변이체 bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA가 또한 HSC-F 세포에 결합함을 보여준다. 이들 이중특이적 항체에 대한 최대 결합 값은 단일특이적 항-CD3 변이체의 최대 결합 값보다 더 높다. 이중특이적 항체의 EC50 농도는 단일특이적 항-huCD3 항체보다 3 내지 6배 더 높았다. 다시, 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 대한 결합은 관찰되지 않았다.
- [0571] 실시예 3 - 인간화 CD3 항체 변이체에 의한 T-세포 활성화
- [0572] CD69 발현은 T-세포 활성화의 초기 마커이다. CD3 항체는 항체의 Fc 영역, 예컨대 IgG1 Fc 영역에 의해 면역 세포에 의해 발현된 Fc 수용체 및 T-세포에 의해 발현된 CD3의 결합을 통해 T-세포와 면역 세포의 가교를 매개할 수 있다. 이것은 T-세포 활성화 및 CD69의 유도를 일으킬 수 있다. 비-활성화 Fc 영역 (LFLEDA 돌연변이)를 함유하는 항체 변이체는 Fc 수용체에 결합하지 않는다. 따라서, 비-활성화 Fc 영역은 Fc 수용체 발현 면역 세포에 결합하지 않고 따라서 T-세포 및 면역세포를 가교시킬 수 없으므로, 비-활성화 CD3 항체는 T-세포 활성화 및 CD69 발현을 유도하지 않는 것으로 예상되었다.
- [0573] Fc 영역 내에 LFLEDA 돌연변이를 갖는 및 갖지 않는 인간화 CD3 (huCD3) 변이체와 함께 인큐베이션한 후 T-세포의 초기 활성화를 결정하기 위해, FACS 분석에 의해 T-세포 상의 CD69 발현을 평가하였다. 비-활성화 돌연변이에 추가로, LFLEDA 변이체는 실시예 1에 설명된 바와 같이 F405L 또는 K409R 돌연변이를 함유하였다.
- [0574] PBMC를 류코셉 (Leucosep) 튜브 (#227290; 그라이너 바이오-원, 네덜란드 알펜안덴린)를 사용하는 밀도 구배 분리에 의해 전체 혈액 또는 버피 코트 (buffy coat)로부터 분리하고, PBS로 세척하고, 배양 배지 내에 재현탁하였다.
- [0575] huCD3 항체 변이체, 음성 대조군 (IgG1-b12) 및 양성 대조군 (IgE-huCD3 및 모 IgG1-CD3)의 용량 반응 연속 희석액을 배양 배지 내에 제조하고 (10배 희석으로 0.1 내지 1,000 ng/mL 범위), 인간 또는 시노물거스 PBMC를 함유하는 96-웰 둥근-바닥 플레이트의 웰에 첨가하였다. 16-24시간 인큐베이션 후에, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 상청액 (시토카인을 함유함)을 모으고 -20℃에서 저장하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드로 세척하고, 30분 동안 4℃에서 각각 시노물거스 CD28 및 CD69와 교차반응성인 마우스-항-인간 CD28-PE (854.222.010; 생킨 (Sanquin, 네덜란드 암스테르담); T-세포 마커) 및 마우스-항-인간 CD69-APC 항체 (340560; 비디 바이오사이언시즈, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)로 염색하였다. PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드로 2회 세척함으로써 비결합된 항체를 제거하였다. 세포를 150 μ l/웰로 재현탁하고, CD28 양성 세포 상에서 CD69-발현을 FACS Canto II (비디 바이오사이언시즈) 상에서 측정하였다.
- [0576] 도 3은 야생형 IgG1 Fc 영역을 갖는 IgG1-CD3 (실시예 1에 설명된 바와 같이) 및 인간화 IgG1-huCD3 변이체가 인간 (도 3a) 및 시노물거스 (도 3b) 기원으로부터의 T-세포 상에서 유사한 수준의 CD69 발현을 유도하였음을 보여준다. 비-활성화 (LFLEDA) IgG1-CD3-LFLEDA 및 IgG1-huCD3-H3L1 변이체는 인간 T-세포에서 낮은 수준의 CD69 발현을 유도하였다. 시노물거스 T-세포에서 비-활성화 IgG1-huCD3 변이체에 의해 CD69의 발현은 유도되지 않았다. 대조군 항체 IgG1-b12는 또한 인간 또는 시노물거스 T-세포에서 CD69의 발현을 유도하지 않았다.
- [0577] 도 8은 비-활성화 (LFLEDA) IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA, IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA, IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA, 및 IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA 변이체가 인간 T-세포에서 낮은 수준의 CD69 발현을 유도하였음을 보여준다. 도 8a 및 8b는 시노물거스 원숭이로부터 T-세포 상에서 CD69 발현의 유도를 보여준다. 관찰된 비-활성화 변이체에 의한 근소한 활성화는 CD3 항체의 2가 결합을 통한 CD3 분자의 가교 때문일 수 있다. 상기 설명은 최고 농도에서 활성화가 감소된다는 관찰에 의해 지지되고, 여기서 항체 결합은 1가이다. 대조군 항체 IgG1-b12는 또한 인간 또는 시노물거스 T-세포에서 CD69의 발현을 유도하지 않았다.
- [0578] 도 8c 및 8d는 비-활성화 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1-huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA가 인간 (도 8c) 또는 시노물거스 원숭이 (도 8d)로부터 T-

세포 내에서 CD69의 발현을 유도하지 않았음을 보여준다. 그러나, 보다 높은 항체 농도에서, CD69 발현의 일부 유도가 관찰되었다.

[0579] **실시예 4 - 인간화 CD3 항체 변이체에 의해 유도된 T-세포 증식.**

[0580] 인간 및 시노물거스 T-세포의 증식에 대한 인간화 CD3 (huCD3) 항체 변이체 (실시예 1에 설명된)의 효과를 제조자의 지시에 따라 수행한 로슈 어플라이드 사이언스 (Roche Applied Science)의 세포 증식 ELISA 키트에 의해 평가하였다 (세포 증식 ELISA, BrdU 키트, #11647229001; 로슈 어플라이드 사이언스, 독일 만하임).

[0581] 전체 혈액 또는 버피 코트로부터 단리한 인간 또는 시노물거스 PBMC를, IgG1 huCD3 항체 변이체의 연속 희석액 (10배 희석으로 0.1 내지 1,000 ng/mL 범위)과 함께 96-웰 배양 플레이트 내에서 인큐베이션하였다. IgE-CD3 및 IgG1-huCLB-T3/4를 양성 대조군으로서 포함시키고, IgG1-b12를 음성 대조군으로서 포함시켰다. 항체와 함께 3일 인큐베이션 후에, BrdU (로슈 어플라이드 사이언스, 독일 만하임)를 배지에 첨가하고, 플레이트를 5시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 상청액을 모으고 -20℃에서 저장하였다. 플레이트를 건조시키고, ELISA를 수행할 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0582] DNA 내의 BrdU 혼입을 제조자의 지시 (로슈 어플라이드 사이언스)에 따라 ELISA에 의해 결정하였다. 세포를 플레이트에 고정시키고, 여기서 플레이트를 퍼옥시다제와 접합된 항-BrdU 항체와 함께 90분 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 세척하고, ABTS 완충제 (키트에 제공된 TMB 용액 대신에)를 사용하여 결합을 검출하였다. 30 min 후에 2% 옥살산을 웰에 첨가함으로써 발색을 중지시켰다. 이어서, OD405 nm를 EL808 ELISA-판독기 상에서 측정하였다.

[0583] 도 4는 야생형 IgG1 Fc 영역을 갖는 모 IgG1-CD3 및 인간화 IgG1-huCD3 변이체와 함께 PBMC의 인큐베이션이 심지어 매우 낮은 항체 농도에서도 인간 (도 4a) 및 시노물거스 (도 4b) T-세포의 강한 증식을 유도하였음을 보여준다. IgG1-huCD3 항체의 비-활성화 LFLEDA 변이체와의 인큐베이션은 인간 T-세포 (도 4a 및 9a) 또는 시노물거스 T-세포 (도 4b 및 9b)의 증식을 유도하지 않았다. 따라서, IgG1-huCD3 항체의 비-활성화 변이체는 인간 T-세포에서 낮은 수준의 CD69 발현을 유도하였지만 (실시예 3에 제시된 바와 같이), 인간 T-세포의 증식은 이들 비-활성화 IgG1-huCD3 변이체에 의해 유도되지 않았다.

[0584] 도 9c 및 9d는 비-활성화 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1-huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA는 인간 (도 9c) 또는 시노물거스 원숭이 (도 9d)로부터 단리한 T-세포의 증식을 유도하지 않음을 보여준다.

[0585] **실시예 5 - 인간화 CD3 항체 변이체에 의해 유도된 시험관 내 T-세포-매개 세포독성**

[0586] 종양-특이적 T-세포 세포독성은 하나의 아암은 CD3에 결합하고 다른 아암은 종양-특이적 표적, 예컨대 HER2에 결합하는 이중특이적 항체에 의해 매개될 수 있다. T-세포 및 종양 세포 모두에 대한 이중특이적 항체의 동시 결합은 T-세포 활성화 및 종양 세포 특이적 세포독성을 일으킬 것이다. 본 실시예에서, CD3 (인간화 변이체) 및 HER2에 대한 이중특이적 항체를 사용하여, HER2-양성 종양 세포에 대한 T-세포 매개 세포독성을 평가하였다.

[0587] 따라서, AU565 (인간 유방 암종) 세포를 10% (vol/vol) 열 불활성화 CCS, 1.5 g/L 중탄산나트륨 (론자 (Lonza)), 1 mM 피루브산나트륨, 4.5 g/L 글루코스 (시그마 (Sigma)), 50 IU/mL 페니실린, 및 50 µg/mL 스트렙토마이신을 보충한 RPMI 1640 내에서 배양하였다. 세포주를 37℃에서 5% (vol/vol) CO₂ 가습 인큐베이터 내에 유지하였다. AU565 세포를 거의 전면성장까지 배양하고, 그 후 세포를 트립신 처리하고, 배양 배지 내에 재현탁하고, 세포 스트레이너 (strainer)를 통해 통과시켜 단일 세포 현탁액을 얻었다. 5x10⁴개의 세포를 96-웰 배양 플레이트의 각각의 웰 내에 접종하고, 세포를 플레이트에 부착하도록 적어도 3 hr 동안 37℃, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.

[0588] 인간 또는 시노물거스 PBMC를 전체 혈액 또는 버피 코트로부터 단리하였다. 단리된 PBMC를 PBS로 세척하고, 배양 배지 내에 재현탁하고, 96-웰 플레이트 내에서 AU565 종양 세포에 1:1 비로 첨가하였다. PBMC 내에 존재하는 T-세포의 백분율을, 시노물거스 CD3과 교차반응성인 마우스 항-인간 CD3-PerCP (비디, #345766) 항체 (T-세포를 염색하기 위해)를 이용하여 FACS-분석에 의해 측정하였다. 사용된 PBMC의 집단 내의 T-세포 함유율은 대개 50 내지 60%이었다.

[0589] 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 CD3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA, bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-

LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA의 연속 희석액 (0.001 내지 10,000 ng/mL의 최종 농도 범위)을 배양 배지 내에 제조하고, 플레이트에 첨가하였다. IgG1-HER2-LFLEDA 및 IgG1-b12를 대조군으로서 포함시켰다. 비-활성화 돌연변이에 추가로, LFLEDA 항체 변이체는 이중특이적 형식으로 제조하기 위한 F405L 또는 K409R 돌연변이를 함유한다 (실시예 1 참조). 플레이트를 3일 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 1 μ M 스타우로스포린 (#S6942-200, 시그마)과 함께 세포의 인큐베이션을 100% 중앙 세포 사멸에 대한 참조물질로서 이용하였다. 플레이트를 PBS로 2회 세척하고, 10% 알라마르 블루 (Alamar blue)를 함유하는 150 μ l 배양 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 590 nm에서 흡광도를 측정하였다 (엔비전 (Envision), 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer), 미국 매사추세츠주 월섬).

[0590] 이중특이적 CD3xHER2-LFLEDA 항체 변이체 (bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA 및 bsIgG1-CD3xHER2-LFLEDA)는 인간 이펙터 세포 (도 5a) 또는 시노물거스 이펙터 세포 (도 5b)를 이용하여 낮은 농도에서 AU565 세포의 사멸을 유도하였다. 시노물거스 CD3과 교차반응성을 보이지 않는 CD3 이중특이적 대조군 항체 huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA는 인간 PBMC가 사용될 때 유일하게 AU565 세포의 사멸을 유도하였다 (도 5a). 따라서, 시노물거스 이펙터 세포가 검정에 사용될 때 표적 세포의 사멸은 관찰되지 않았다 (도 5b). 단일특이적 IgG1-b12 또는 IgG1-HER2-LFLEDA 또는 bsIgG1-CD3xb12-LFLEDA 항체와 함께 인큐베이션은 표적 세포의 비특이적 사멸을 유도하지 않았다.

[0591] 이중특이적 항체 변이체 bsIgG1 huCD3-H3L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H3L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L1 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H1L3 x HER2-LFLEDA, bsIgG1-huCD3-H4L1 x HER2-LFLEDA, 및 bsIgG1-huCD3-H4L3 x HER2-LFLEDA는 인간 이펙터 세포 (도 10a) 또는 시노물거스 이펙터 세포 (도 10b)를 이용하여 낮은 농도에서 AU565 세포의 사멸을 유도하였다. 단일특이적 IgG1-b12 또는 IgG1-HER2-LFLEDA 항체와 함께 인큐베이션은 비특이적 표적 세포 사멸을 유도하지 않았다 (도 10a 및 b). 따라서, 비-활성화 Fc 영역을 포함하는 인간화 CD3 변이체는 비특이적 표적 세포 사멸을 유도하지 않았고, 이것은 비-활성화 Fc 영역을 포함하는 변이체가 표적화된 T-세포 활성화를 보장하고 따라서 비-표적화된 T-세포 활성화를 피하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0592] 실시예 6 - 인간화 CD3 항체 변이체에 의한 레서스 T-세포 활성화

[0593] 야생형 IgG1 Fc 영역을 갖는 인간화 CD3 (huCD3) 항체 변이체와 함께 인큐베이션한 후 T-세포의 초기 활성화를 결정하기 위해 레서스 T-세포 상에서 CD69 발현을 평가하였다. 레서스 PBMC의 단리 및 유동 세포측정법에 의한 CD69 발현의 평가를 실시예 3에 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0594] 도 11은 인간화 CD3 항체 변이체 IgG1-huCD3-H1L1, IgG1-huCD3-H1L2, IgG1-huCD3-H1L3, IgG1-huCD3-H3L3, 및 IgG1-huCD3-H4L1이 IgG1-CD3과 유사한 수준으로 레서스 기원으로부터의 T-세포 상에서 CD69 발현을 유도하였음을 보여준다 (실시예 1에 설명된 바와 같이). 음성 대조군 항체 IgG1-b12는 레서스 T-세포에서 CD69의 발현을 유도하지 않았다. 따라서, 본 발명에 따른 huCD3 변이체는 레서스 원숭이 CD3을 포함한 실험에서 사용될 수 있다. huCD3 변이체는 레서스 원숭이 CD3과 교차반응성이다.

[0595] 실시예 7 - huCLB-T3/4의 비-활성화 변이체에 의한 T-세포 활성화

[0596] Fc 영역 내에 돌연변이를 갖는 IgG1-huCLB-T3/4 변이체 (실시예 1 참조)와 함께 인큐베이션 후에 T-세포의 초기 활성화를 결정하기 위해 FACS 분석에 의해 T-세포 상의 CD69 발현을 평가하였다.

[0597] PBMC를 류코셉 튜브 (#227290; 그라이너 바이오-원, 네덜란드 알펜안덴린)를 사용하는 밀도 구배 분리에 의해 전체 혈액 또는 버피 코트로부터 단리하고, PBS로 세척하고, 배양 배지 내에 재현탁하였다.

[0598] IgG1-huCLB-T3/4 변이체, 음성 대조군 (IgG1-huCLB-T3/4-Fab) 및 양성 대조군 (IgE-huCLB-T3/4)의 용량 반응 연속 희석액을 배양 배지 내에 제조하고 (3배 희석으로 1 내지 1000 ng/mL 범위), PBMC를 함유하는 96-웰 등근-바닥 플레이트의 웰에 첨가하였다. 16-24시간 인큐베이션 후에, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 상청액 (시토카인을 함유함)을 모으고 -20°C에서 저장하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드로 세척하고, 30분 동안 4°C에서 마우스-항-인간 CD28-PE (854.222.010; 생킨, 네덜란드 암스테르담; T-세포 마커) 및 마우스-항-인간 CD69-APC 항체 (340560; 비디 바이오사이언시즈, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)로 염색하였다. PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드로 2회 세척함으로써 비결합된 항체를 제거하였다. 세포를 150 μ l/웰로 재현탁하고, CD28 양성 세포 상에서 CD69-발현을 FACS Canto II (비디 바이오사이언시즈) 상에서 측정하였다.

- [0599] 도 12a는 IgE-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4-DA 및 IgG1-huCLB-T3/4-DAPS와 함께 인큐베이션한 세포 상에서 CD69 발현이 높았음을 보여준다. IgG1-huCLB-T3/4-N297Q와 함께 인큐베이션은 야생형 IgG1-huCLB-T3/4에 비해 다소 더 낮은 발현 수준의 CD69를 유도하였고, IgG1-huCLB-T3/4-LFLE 및 IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS와 함께 인큐베이션은 더 낮은 정도로 CD69를 유도하였다. IgG1-CD3 Fab, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA, IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ, IgG1-huCLB-T3/4-DANQ 및 IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS 항체와 함께 PBMC의 인큐베이션은 T-세포 상에서 임의의 CD69 발현을 유도하지 않았다.
- [0600] 도 12b는 IgE-huCLB-T3/4 및 IgG1-huCLB-T3/4와 함께 인큐베이션한 세포 상에서 CD69 발현이 높았음을 보여준다. IgG1-huCLB-T3/4-LALA와 함께 인큐베이션은 야생형 IgG1-huCLB-T3/4에 비해 다소 더 낮은 발현 수준의 CD69를 유도하였고, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA 및 IgG1-b12 (음성 대조군)와 함께 인큐베이션은 T-세포 상에서 임의의 CD69 발현을 유도하지 않았다.
- [0601] 실시예 8 - huCLB-T3/4의 비-활성화 변이체에 의한 T-세포 증식
- [0602] T-세포의 증식에 대한 huCLB-T3/4 변이체 (실시예 1에 설명된)의 효과를 제조자의 지시에 따라 수행한 로슈 어플라이드 사이언스의 세포 증식 ELISA 키트 (세포 증식 ELISA, BrdU 키트, #11647229001; 로슈 어플라이드 사이언스, 독일 만하임)에 의해 평가하였다.
- [0603] 전체 혈액 또는 비피 코트로부터 분리된 PBMC를 IgG1-CD3 변이체의 연속 희석액 (0.1 내지 1000 ng/mL 범위)과 함께 96-웰 배양 플레이트 내에서 인큐베이션하였다. IgE-CD3 및 IgG1-CD3을 양성 대조군으로서 포함시키고, IgG1-b12 (이중특이적 항체의 생성을 위한 K409R 돌연변이를 갖는)를 음성 대조군으로서 포함시켰다. 항체와 함께 3일 인큐베이션 후에, BrdU (로슈 어플라이드 사이언스, 독일 만하임)를 배지에 첨가하고, 플레이트를 5시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 상청액을 모으고 -20℃에서 저장하였다. 플레이트를 건조시키고, ELISA를 수행할 때까지 4℃에서 저장하였다.
- [0604] DNA 내의 BrdU 혼입을 제조자의 지시 (세포 증식 ELISA, BrdU 키트, #11647229001; 로슈 어플라이드 사이언스)에 따라 ELISA에 의해 결정하였다. 세포를 플레이트에 고정시키고, 여기서 플레이트를 퍼옥시다제와 접합된 항-BrdU 항체와 함께 90분 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 세척하고, ABTS 완충제 (키트에 제공된 TMB 용액 대신에)를 사용하여 결합을 검출하였다. 30 min 후에 2% 옥살산을 웰에 첨가함으로써 발색을 중지시켰다. 이어서, OD405 nm를 EL808 ELISA-판독기 상에서 측정하였다.
- [0605] 도 13a는 IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-huCLB-T3/4-DA 및 IgG1-huCLB-T3/4-DAPS와 함께 PBMC의 인큐베이션이 심지어 매우 낮은 항체 농도에서도 T-세포의 강한 증식을 유도하였음을 보여준다. IgG1-huCLB-T3/4-N297Q와 함께 인큐베이션은 용량-의존성 증식을 유도하였고, 이것은 IgE-huCLB-T3/4 양성 대조군과 대등하였다. IgG1-huCLB-T3/4-Fab, IgG1-b12-N297Q, IgG1-huCLB-T3/4-LFLE, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA, IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ, IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS, IgG1-huCLB-T3/4-DANQ 및 IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS 항체와 함께 PBMC의 인큐베이션은 T-세포의 증식을 유도하지 않았다.
- [0606] 도 13b는 IgG1-huCLB-T3/4와 함께 PBMC의 인큐베이션이 심지어 매우 낮은 항체 농도에서도 T-세포의 강한 증식을 유도하였음을 보여준다. IgE-huCLB-T3/4 (양성 대조군) 및 IgG1-huCLB-T3/4-LALA와 함께 인큐베이션은 용량-의존성 증식을 유도하였다. IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA와 함께 PBMC의 인큐베이션은 T-세포의 증식을 유도하지 않았다.
- [0607] 실시예 7 및 8의 결과에 기초하여, 최소 활성화인 것으로 간주된 돌연변이체의 하위세트를 추가로 분석하였다.
- [0608] 실시예 9 - 비-활성화 항체 변이체 huCLB-T3/4에 의해 유도된 시험관 내 T-세포-매개 세포독성
- [0609] AU565 (인간 유방 암종) 세포를 10% (vol/vol) 열 불활성화 CCS, 1.5 g/L 중탄산나트륨 (론자), 1 mM 피루브산 나트륨, 4.5 g/L 글루코스 (시그마), 50 IU/mL 페니실린, 및 50 µg/mL 스트렙토마이신을 보충한 RPMI 1640 내에서 배양하였다. 세포주를 37℃에서 5% (vol/vol) CO₂ 가습 인큐베이터 내에서 유지하였다. AU565 세포를 거의 합류로 배양하였다. 세포를 트립신 처리하고, 배양 배지 내에 재현탁하고, 세포 스트레이너를 통해 통과시켜 단일 세포 현탁액을 얻었다. 5x10⁴ 개의 세포를 96-웰 배양 플레이트의 각각의 웰 내에 접종하고, 세포를 플레이트에 부착하도록 적어도 3 hr 동안 37℃, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.
- [0610] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 제조자의 프로토콜 (그라이너 바이오-원)에 따라 류코셉 30 mL 튜브를 사용하여 건강한 지원자의 혈액으로부터 분리하였다. 분리된 PBMC를 PBS로 세척하고, 배양 배지 내에 재현탁하고, 96-웰

플레이트 내에서 AU565 종양 세포에 1:1 비로 첨가하였다. PBMC 내에 존재하는 T-세포의 백분율을, 마우스 항-인간 CD3-PerCP (비디, #345766) 항체 (T-세포를 염색하기 위해)를 이용하여 FACS-분석에 의해 측정하였다. 사용된 PBMC의 집단 내의 T-세포 함유율은 대개 50 내지 60%이었다.

[0611] 상이한 Fc-변이체로서 발현된 IgG1-b12, IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-HER2, 및 이중특이적 huCLB-T3/4xb12 및 huCLB-T3/4xHER2 항체, 야생형, N297Q, LFLE, LALA, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, 및 LFLEDENQPS의 연속 희석액 (0.004 내지 1000 ng/mL의 최종 농도 범위)을 배양 배지 내에 제조하고, 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 3 일 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 1 μM 스타우로스포린 (#S6942-200, 시그마)과 함께 세포의 인큐베이션을 100% 종양 세포 사멸에 대한 참조물질로서 이용하였다. 인큐베이션 후에, 상청액을 제거하고 -20°C에서 저장하였다. 플레이트를 PBS로 2회 세척하고, 10% 알라마르 블루를 함유하는 150 μl 배양 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 590 nm에서 흡광도를 측정하였다 (엔비전, 퍼킨 엘머, 미국 매사추세츠주 윌섬).

[0612] 상이한 공여자로부터 PBMC를 사용하여 2가지 실험을 수행하였다. 제1 실험에서 Fc-변이체 N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, 및 LFLEDANQPS를 시험하였다 (도 14a-g). 제2 실험에서 Fc-변이체 LFLEDA 및 LALA를 시험하였다 (도 15a-c). 야생형 Fc-도메인을 갖는 항체를 참조용으로 실험 둘 모두에 포함시켰다. 야생형 단일특이적 IgG1-huCLB-T3/4 또는 이중특이적 huCLB-T3/4xb12 항체와 함께 인큐베이션은 표적 세포의 비특이적 사멸을 유도하였다 (도 14a-g 및 15a-c). 단일특이적 IgG1-huCLB-T3/4 및 bsIgG1-huCLB-T3/4xb12 변이체 N297Q (도 14a-g) 및 LALA (도 15a-c)는 동일한 실험에서 시험한 야생형 항체보다 더 적은 정도이지만, 여전히 일부 비특이적 표적 세포 사멸을 유도하였다. 비특이적 표적 세포 사멸은 비-활성화 돌연변이를 갖는 임의의 다른 시험한 IgG1-huCLB-T3/4 또는 bsIgG1-huCLB-T3/4xb12 항체에 의해 유도되지 않았다 (도 14a-g 및 15a-c).

[0613] 모든 이중특이적 huCLB-T3/4xHER2 항체는 비-활성화 돌연변이가 없는 야생형 이중특이적 huCLB-T3/4xHER2 항체에 비해 적어도 대등한 효능으로, AU565 세포의 용량-의존성 사멸을 유도하였다 (도 14a-g 및 15a-c). 최대 사멸은 매우 낮은 농도에서 일어났다.

[0614] 단일특이적 b12 또는 HER2 항체의 야생형 또는 비-활성화 변이체에 의해 세포독성이 유도되지 않았고 (도 14a-g 및 15a-c), 이것은 예상된 것과 같았다.

[0615] 실시예 10 - huCLB-T3/4의 비-활성화 항체 변이체에 대한 C1q의 결합의 평가

[0616] 표적 세포에 결합된 항체와 C1q의 상호작용은 보체 활성화의 고전적 경로에서 제1 단계이다. 야생형 IgG1은 C1q에 대한 상호작용 부위를 보유하므로, ELISA에 의해 이들 비-활성화 IgG1 변이체에 대한 C1q의 상호작용을 평가하였다.

[0617] IgG1-huCLB-T3/4, bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 및 IgG1-CD20 (양성 대조군), 및 실시예 1에서 상기 설명된 바와 같은 그의 비-활성화 항체 변이체의 연속 희석액 (4배 희석으로 7-30,000 ng/mL 범위)을 96-웰 마이크로론 (Microton) ELISA 플레이트 (그라이너, 독일) 상에 4°C에서 철야 코팅하였다. 플레이트를 세척하고, 0.025% 트윈 20 및 0.1% 젤라틴을 보충한 PBS로 차단하였다. 인큐베이션 사이에 세척하면서, 플레이트를 37°C에서 1 h 동안 3% 모은 인간 혈청 (생킨, 제품# M0008)과 함께, RT에서 1 h 동안 100 μl/웰 토끼 항-인간 C1q (DAKO, 제품# A0136, 1/4,000)와 함께, 및 RT에서 1 h 동안 검출 항체로서 100 μl/웰 돼지 항-토끼 IgG-HRP (DAKO, P0399, 1:10,000)와 함께 순차적으로 인큐베이션하였다. 검출은 약 30 min 동안 1 mg/mL 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)을 첨가하여 수행하였다. 100 μl 2% 옥살산을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 판독기 (바이오텍 (Biotek, 미국 버몬트주 위누스키)) 내에서 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 로그 (Log) 변환 데이터는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 s자형 용량-반응 곡선을 변수 기율기와 피팅(fitting)함으로써 분석하였다.

[0618] 도 16a는 야생형 IgG1 Fc 영역, IgG1-CD20 및 IgG1-huCLB-T3/4를 갖는 항체가 C1q 결합을 보였음을 보여준다. 비-활성화 돌연변이를 갖는 모든 평가된 항체 변이체 (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA) 상에서 C1q의 결합은 검출되지 않았다.

[0619] 도 16b는 야생형 IgG1 Fc 영역 bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2를 갖는 항체가 C1q 결합을 보였음을 보여준다. 비-활성화 돌연변이를 갖는 모든 평가된 항체 변이체 (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA) 상에서 C1q의 결합은 검출되지 않았다.

[0620] 도 16c 및 도 16d는 야생형 IgG1 Fc 영역, IgG1-CD20, IgG1-huCLB-T3/4, 및 bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2를 갖는 항

체가 C1q 결합을 보였음을 보여준다. 비-활성화 돌연변이를 갖는 항체 변이체 (LFLEDA 및 LALA) 상에서 C1q의 결합은 검출되지 않았다.

[0621] **실시예 11 - 비-활성화 항체 변이체의 약동학 (PK) 분석**

[0622] 본 연구에서 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (Central Laboratory Animal Facility, 네덜란드 위트레흐트)의 장벽 유닛 (barrier unit)에 수용하고, 물 및 음식을 자유롭게 먹도록 제공한 필터-탑 (filter-top) 케이지 내에 유지하였다. 모든 실험은 위트레흐트 대학 (Utrecht University) 동물 윤리 위원회의 승인을 받았다. 7-10주령 C.B-17 SCID 마우스 (C.B-17/Icr-Prkdc^{Scid}/IcrIcoCr1, 찰스-리버 (Charles-River))에게 군 당 3마리 마우스를 이용하여 100 µg 야생형 항체 (IgG1-huCLB-T3/4, IgG1-HER2, 또는 bsIgG-huCLB-T3/4xHER2) 또는 그의 비-활성화 변이체 (LALA, LFLEDA, LFLENQ, DANQ 또는 LFLEDANQPS)를 정맥내 주사하였다. 50 µl의 혈액 샘플을 항체 투여 후 10분, 4시간, 1일, 2일, 7일, 14일 및 21일에 복제 정맥으로부터 수집하였다. 혈액을 헤파린이 담긴 바이알 내에 수집하고, 5분 동안 10,000 x g에서 원심분리하였다. 항체 농도를 결정할 때까지 혈장을 -20 °C에서 저장하였다.

[0623] 인간 IgG 농도는 총 hIgG 샌드위치 (sandwich) ELISA를 이용하여 결정하였다. 본 검정을 위해, 96-웰 마이크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 2 µg/mL의 농도로 코팅한 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (#M1268, CLB 생켄, 네덜란드)를 포획 항체로서 사용하였다. 0.2% 소 혈청 알부민을 보충한 PBS로 플레이트를 차단한 후, 샘플을 첨가하고, ELISA 완충제 (0.05% 트윈 20 및 0.2% 소 혈청 알부민을 보충한 PBS)로 연속 희석하고, 플레이트 진탕기 상에서 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 후속적으로 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (#109-035-098, 잭슨, 미국 펜실베이니아주 웨스트그로브)과 함께 인큐베이션하고, 2,2'-아지노-비스 (3-에틸헨조티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)로 발색시켰다. 30 min 후에 2% 옥살산을 웰에 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 판독기 (바이오텍, 미국 버몬트주 위누스키) 내에서 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0624] 혈장 클리어런스율 (mL/일/kg)은 다음 식에 따라 곡선하 면적 (AUC)에 기반하여 계산하였다:

[0625]
$$\text{혈장 클리어런스} = \frac{\text{용량 } (\mu\text{g/kg})}{\text{AUC } (\mu\text{g/mL/일})}$$

[0626] 데이터 분석은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0627] **도 17a**는 혈장 인간 IgG 농도가 야생형 항체에 비해 항체 변이체 N297Q, DANQ, LFLENQ, 및 LFLEDANQPS에 대해 더 낮았음을 보여주고, 이것은 보다 빠른 클리어런스율을 제안한다. 항체 변이체 LFLEDA 및 LALA에 대한 혈장 내 인간 IgG 농도는 야생형 항체와 유사하였다.

[0628] **도 17b**는 항체 변이체 N297Q, DANQ 및 LFLENQ의 클리어런스율이 야생형 항체보다 2 내지 3배 더 높았음을 보여준다. 항체 변이체 LFLEDANQPS의 클리어런스율은 야생형 항체보다 3-5배 더 높았다. 항체 변이체 LFLEDA 및 LALA의 혈장 클리어런스율은 야생형 항체와 유사하였다.

[0629] **실시예 12 - IgG1-LFLEDA 백본의 시험관 내 면역원성 평가**

[0630] IgG1-LFLEDA-K409R 백본의 임상 면역원성에 대한 가능성을 결정하기 위해, 안티토프의 EpiScreen™ 플랫폼을 IgG1-HER2-LFLEDA에 적용하였다. 짧게 설명하면, 유럽 및 북미 인구 집단을 대표하는 50명의 HLA-형 건강한 공여자의 코호트 (cohort)로부터 PBMC를 분리하였다. CD8+ T-세포 고갈 후에, PBMC 제제를 개별적으로 동결하고 저장하였다. 해동시킨 PBMC를 후속적으로 배양하고, IgG1-HER2-LFLEDA-K409R 또는 대조군 샘플 (IgG1-HER2 또는 IgG1-HER2-LFLE-K409R) 중 하나와 함께 5 내지 8일 동안 인큐베이션하였다. CD4+ T-세포 반응을 유도하는 샘플의 능력을 세포 증식 (^3H -티미딘 혼입) 및 IL-2 생산 (ELISpot 검정)을 측정함으로써 평가하였다. 검정들 모두에서 자극 지수 (SI; 신호/기준선 신호) ≥ 1.9 인, 반응을 보이는 공여자를 양성으로 간주하였다.

[0631] EpiScreen™ 분석은 IgG1-HER2-LFLEDA에 대해 4명의 공여자 (8%)가 양성 CD4+ T-세포 반응을 보였고, 이것은 IgG1-HER2 및 IgG1-HER2-LFLE에 대한 각각 4 (8%) 및 3 (6%) 양성 반응에 대등하였음을 보여주었다 (도 18). 따라서, IgG1-HER2-LFLEDA-K409R (및 IgG1-HER2 및 IgG1-HER2-LFLE-K409R)은 반응의 빈도가 10% 미만으로, 면역원성에 대한 낮은 가능성을 보여주었다. 진찰실에서 높은 수준의 면역원성을 보이고 EpiScreen 검정에서 일 상적으로 20-30% T-세포 반응을 유도하는, 양성 대조군 인간화 A33 (예를 들어 [84])을 임상 벤치마크 대조군 항체로서 사용하였다.

[0632] 참고문헌의 목록

- [1] Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26
- [2] Herold *et al.*, 2005, Diabetes, 54(6):1763-9
- [3] Staerz, *et.al.*, 1985, Nature 314:628-631
- [4] Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24: 89-98
- [5] Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25: 365-379
- [6] Linke *et al.*, 2010, MAbs 2: 129-136
- [7] Ruf *et al.*, 2010, Br J Clin Pharmacol 69: 617-625
- [8] Bokemeyer *et al.*, 2009, J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 3036
- [9] Heiss *et al.*, 2010, Int J Cancer 127: 2209-2221
- [10] Jones *et al.*, 2009, Lancet Oncol 10:1179-1187
- [11] Kiewe *et al.*, 2006, Clin Cancer Res 12:3085-3091
- [12] WO 2012/162067
- [13] WO 2008/119567
- [14] Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
- [15] Lefranc MP, *et al.*, 2003, Dev Comp Immunol. Jan;27(1):55-77
- [16] Brochet, X. *et al.*, 2008, Nucl.Acids Res. 36, W503-508
- [17] Giudicelli, V., Brochet, X, Lefranc, M.-P., 2011, Cold Spring Harb Protoc. Jun 1;2011(6)
- [18] Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15
- [19] WO92/22653
- [20] EP 0 629 240
- [21] E. Meyers and W. Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17
- [22] Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 444-453
- [23] Clustal W algorithm, Thompson, 1994
- [24] T cell Epitope Database from e.g. <http://www.iedb.org/>
- [25] Perry *et al.*, 2008 Drugs R D 9 (6):385-396

[0633]

- [26] Bryson *et al.*, 2010, Biodrugs 24 (1):1-8
- [27] Kabat, E.A. *et al.*, 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689
- [28] Oganessian *et al.*, 2008, Acta Cryst. (D64):700-4
- [29] Canfield *et al.*, 1991, J. Exp.Med. (173):1483-91
- [30] Duncan *et al.*, 1988, Nature (332):738-40
- [31] Shields *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604
- [32] Idusogie EE, *et al.*, 2000, J Immunol. 164: 4178-84
- [33] Leabman *et al.*, 2013, MAbs; 5(6):896-903
- [34] Parren *et al.*, 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546
- [35] Bruhns *et al.*, 2009, Blood 113: 3716-3725
- [36] WO 2011/066501
- [37] Lightle, S., *et al.*, 2010, Protein Science (19):753-62
- [38] Brekke *et al.*, 2006, J Immunol 177:1129-1138
- [39] Dall'Acqua WF, *et al.*, 2006, J Immunol 177:1129-1138
- [40] Wu *et al.*, 2010, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg
- [41] WO 2011/131746
- [42] WO 2002/020039
- [43] WO 98/050431
- [44] WO 2011/117329
- [45] EP 1 870 459
- [46] WO 2009/089004
- [47] US 2010 00155133
- [48] WO 2010/129304
- [49] WO 2007/110205
- [50] WO 2010/015792
- [51] WO 2011/143545
- [52] WO 2012/058768
- [53] WO 2011/028952
- [54] WO 2008/003116
- [55] US 7,262,028
- [56] US 7,612,181
- [57] WO 2010/0226923
- [58] US 7,951,918

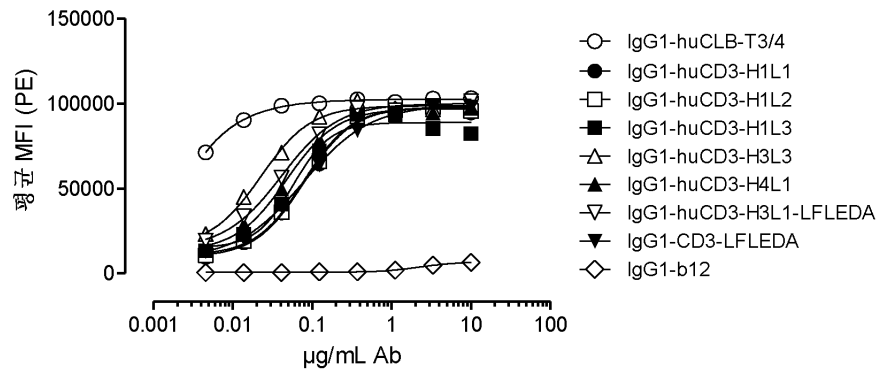
[0634]

- [59] CN 102250246
- [60] WO 2012/025525
- [61] WO 2012/025530
- [62] WO 2008/157379
- [63] WO 2010/080538
- [64] Sykes and Johnston, 1997, Nat Biotech 17, 355-59
- [65] US 6,077,835
- [66] WO 2000/70087
- [67] Schakowski *et al.*, 2001, Mol Ther 3, 793-800
- [68] WO 2000/46147
- [69] Benvenisty and Reshef, 1986, PNAS USA 83, 9551-55
- [70] Wigler *et al.*, 1978, Cell 14, 725
- [71] Coraro and Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7, 603
- [72] US 5,589,466
- [73] US 5,973,972
- [74] Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264, 5503-5509
- [75] F. Ausubel *et al.*, 1987, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York
- [76] Grant *et al.*, 1987, Methods in Enzymol 153, 516-544
- [77] Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
- [78] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- [79] Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy, Plenum Press 1988
- [80] Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652, Mack Publishing Co., 1990
- [81] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.), Chapman & Hall 1993
- [82] US 5,057,313
- [83] US 6,331,175
- [84] Ritter G, *et al.*; 2001, Cancer Res., 61:6851-9

[0635]

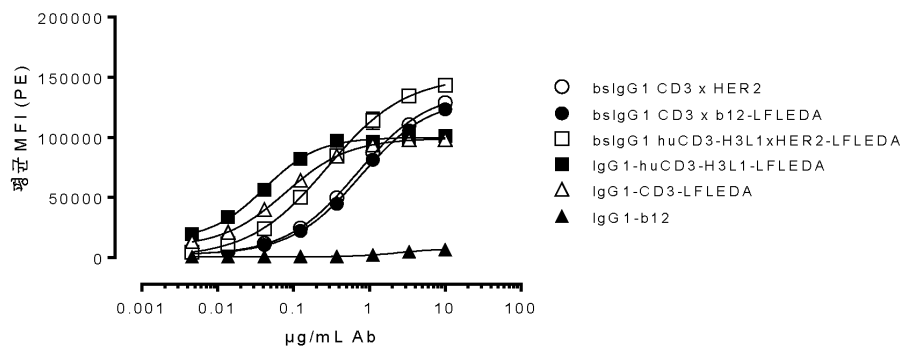
도면

도면1a



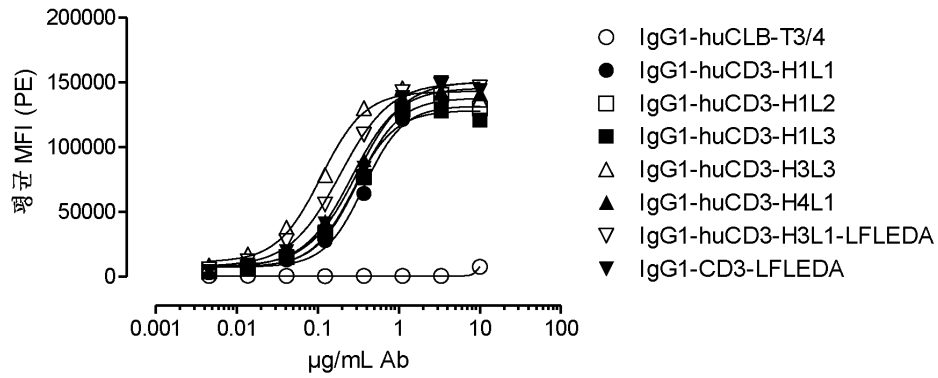
항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
IgG1-huCD3-H1L1	0.07
IgG1-huCD3-H1L2	0.08
IgG1-huCD3-H1L3	0.06
IgG1-huCD3-H3L3	0.02
IgG1-huCD3-H4L1	0.05
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.08

도면1b



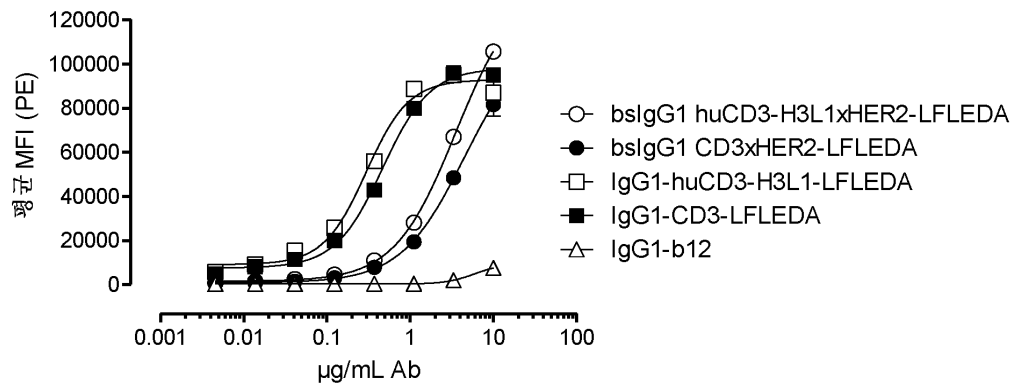
항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
bsIgG1 CD3 x HER2	0.68
bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0.75
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.07

도면2a



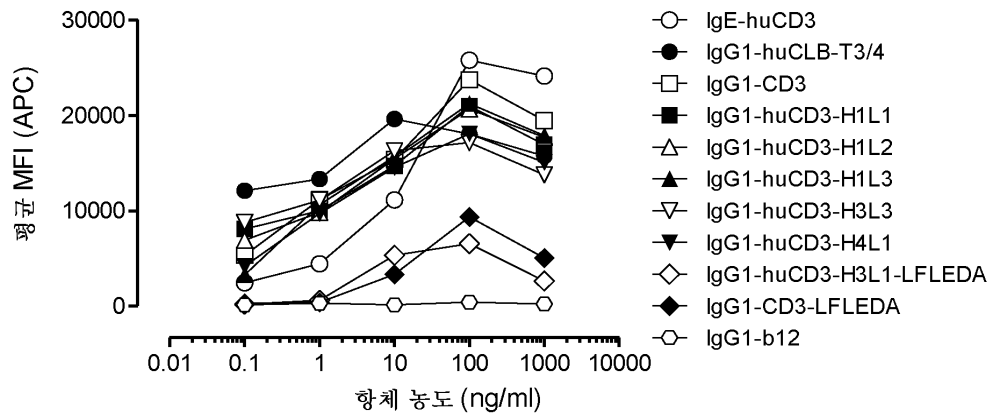
항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
IgG1-huCD3-H1L1	0.37
IgG1-huCD3-H1L2	0.31
IgG1-huCD3-H1L3	0.28
IgG1-huCD3-H3L3	0.11
IgG1-huCD3-H4L1	0.26
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.19
IgG1-CD3-LFLEDA	0.30

도면2b

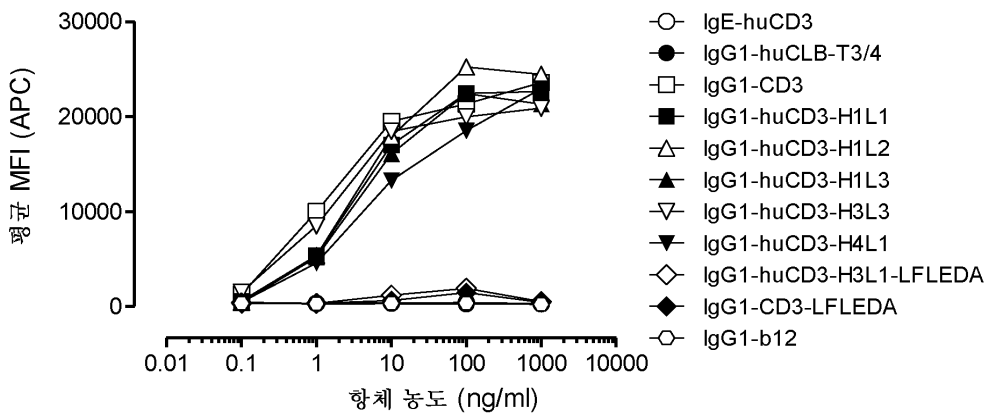


항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
bsIgG1 CD3xHER2-LFLEDA	4.46
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	3.54
IgG1-CD3-LFLEDA	0.47
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.30

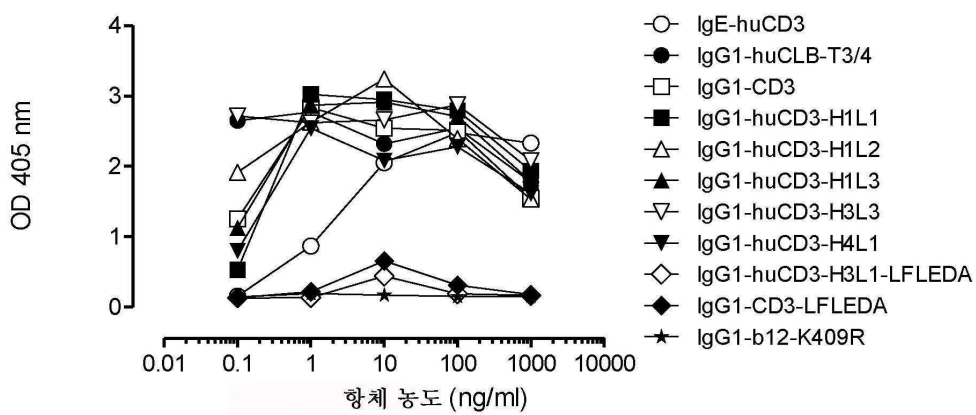
도면3a



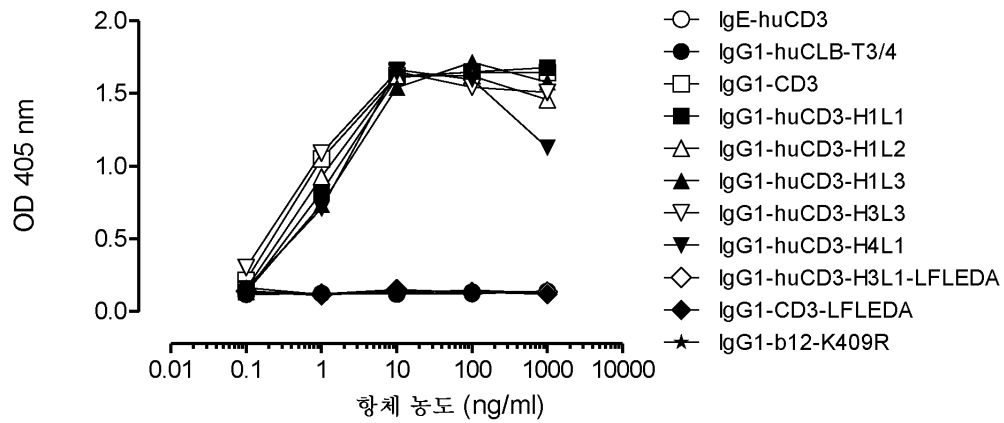
도면3b



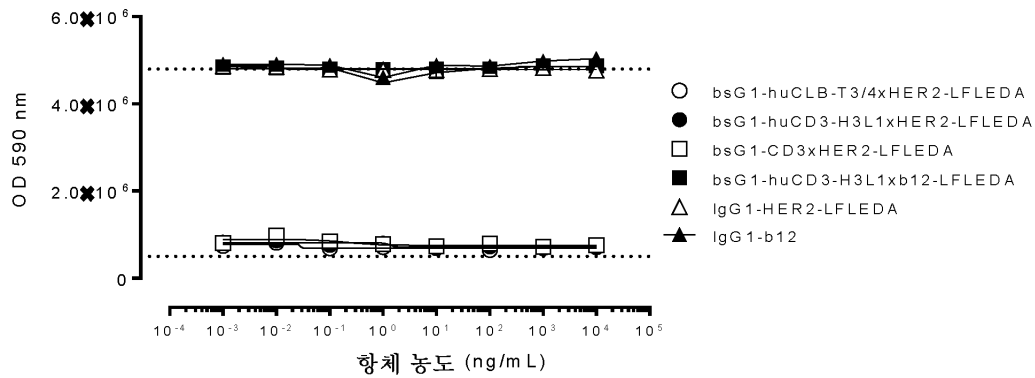
도면4a



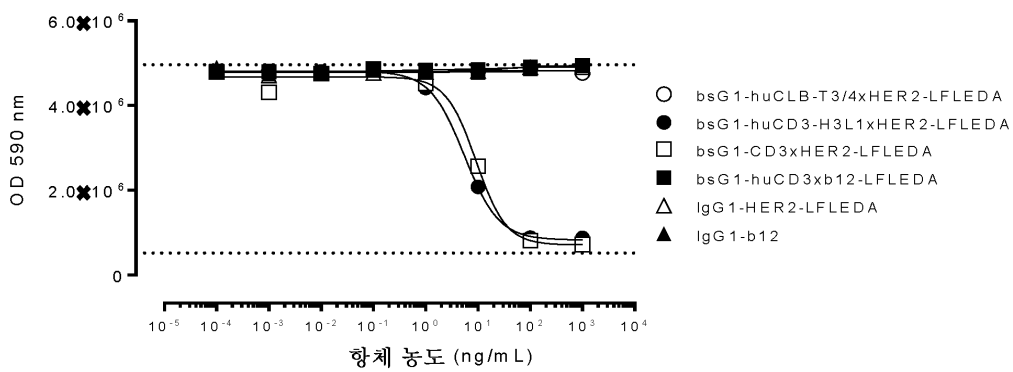
도면4b



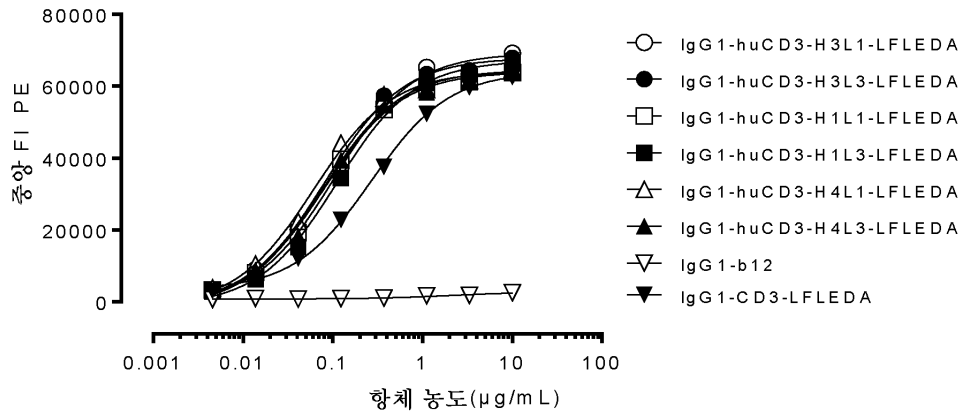
도면5a



도면5b

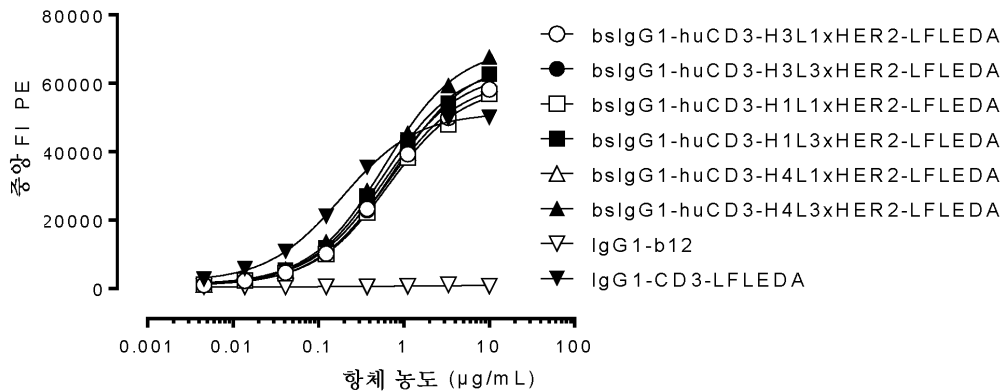


도면6a



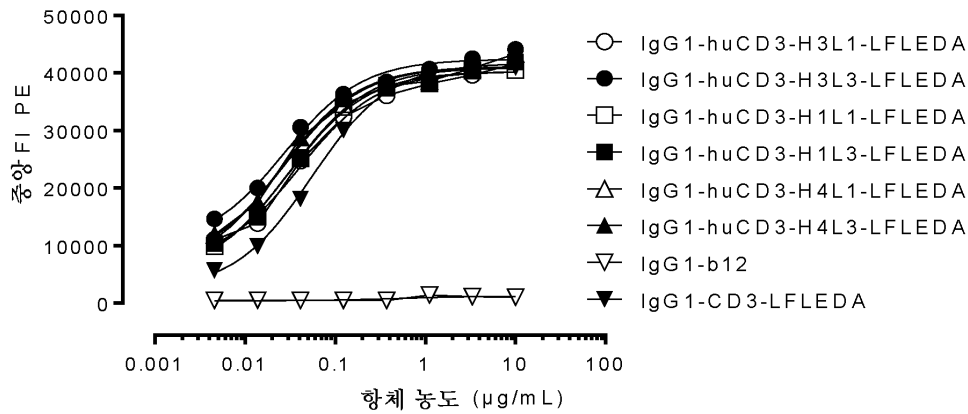
항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.10
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.08
IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA	0.08
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.11
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.06
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.08
IgG1-CD3-LFLEDA	0.27

도면6b



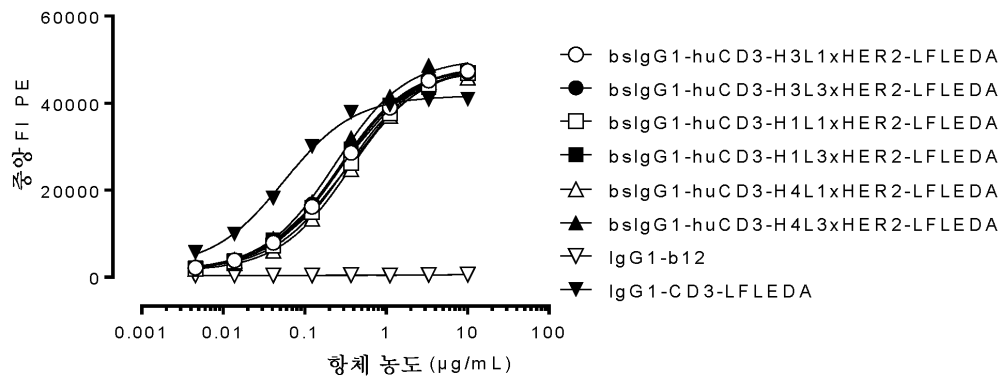
항체	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)
bIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.64
bIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.74
bIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.66
bIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.58
bIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.62
bIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.59
IgG1-CD3-LFLEDA	0.18

도면7a



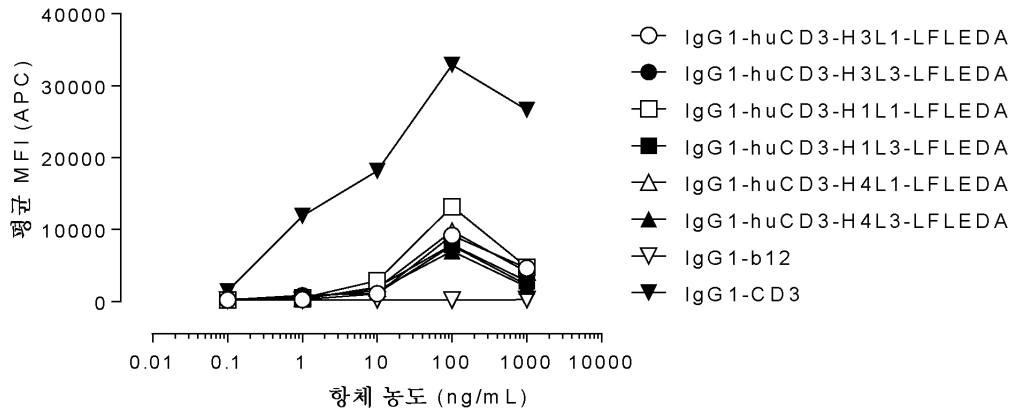
항체	EC50 (μg/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.02
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

도면7b

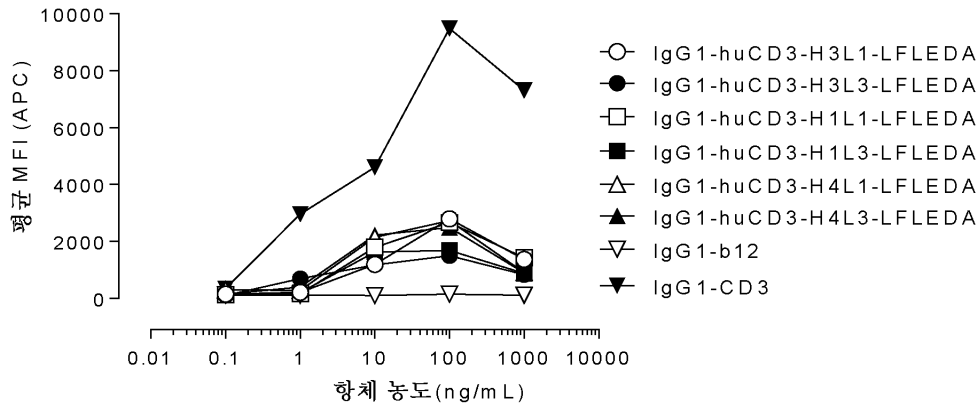


항체	EC50 (μg/mL)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.26
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.32
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.25
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.36
bsIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.24
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

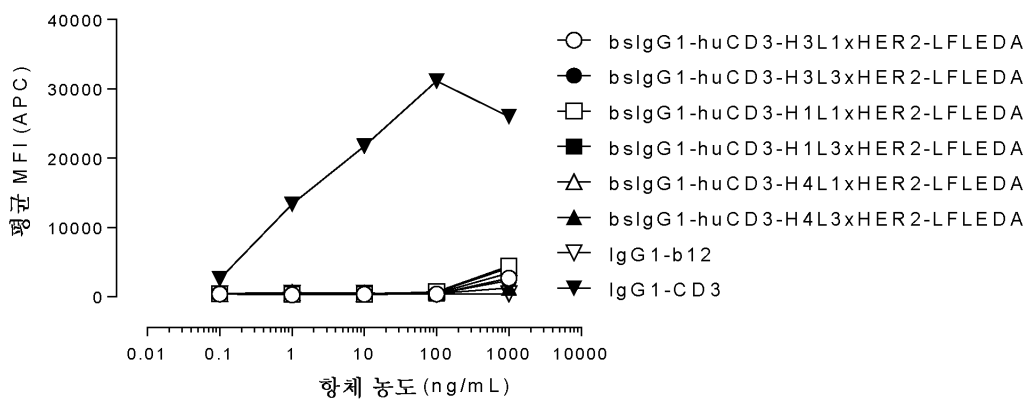
도면8a



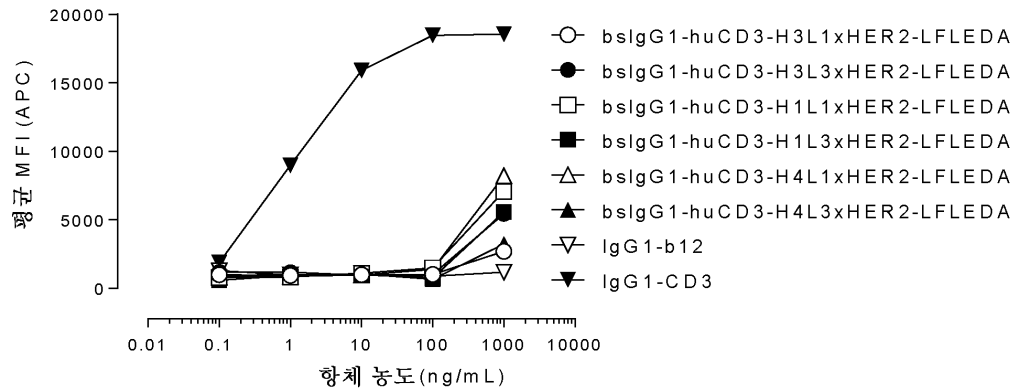
도면8b



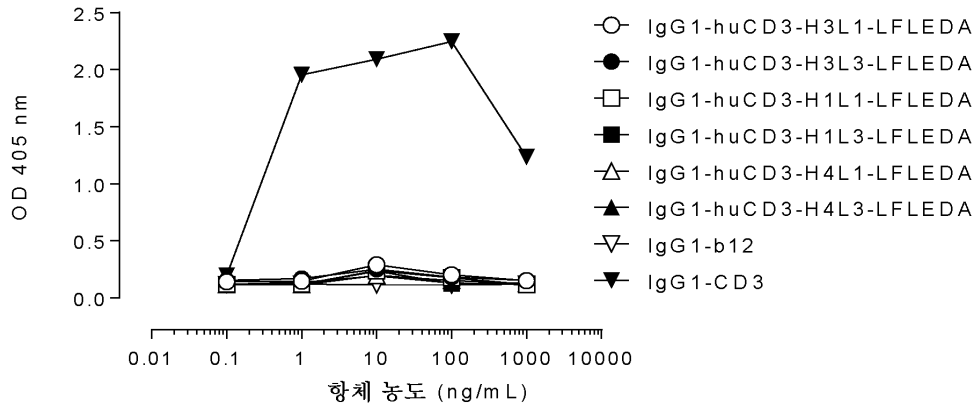
도면8c



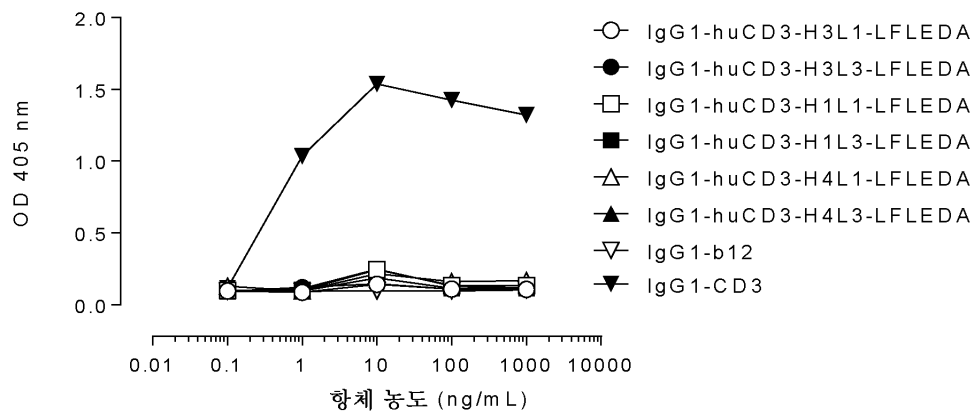
도면8d



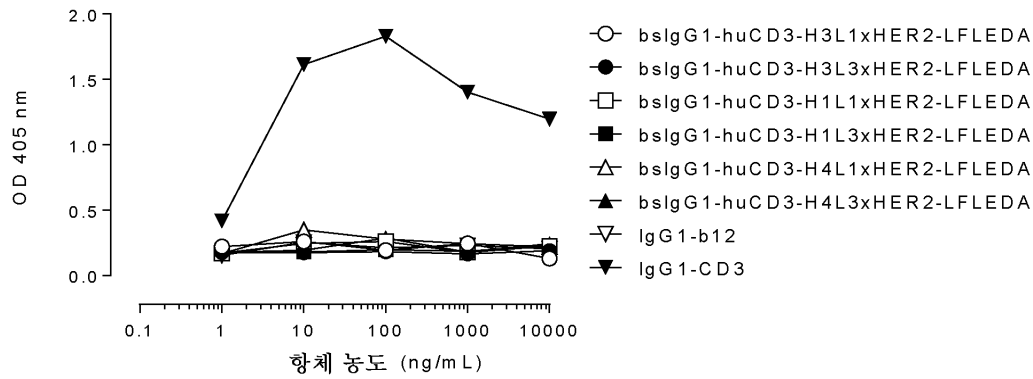
도면9a



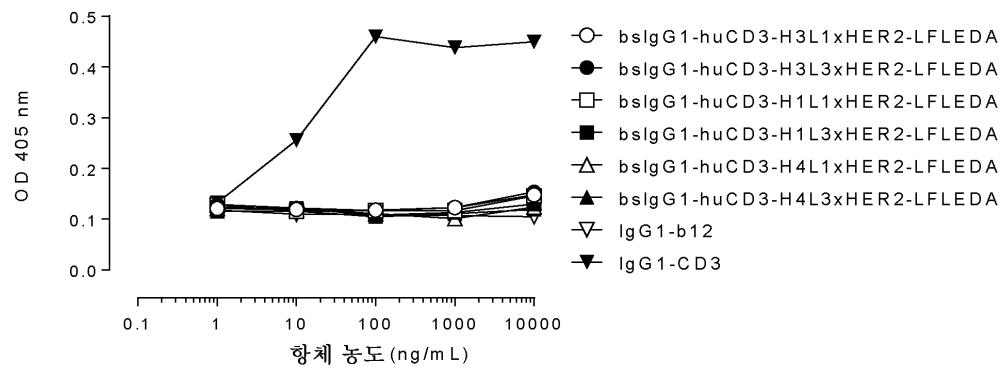
도면9b



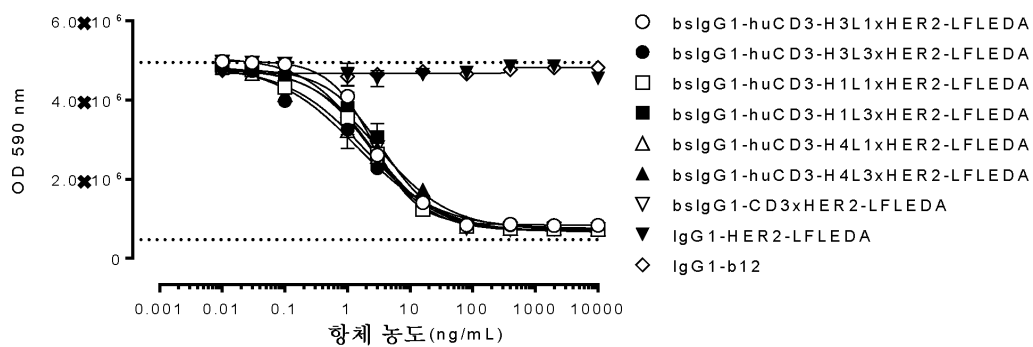
도면9c



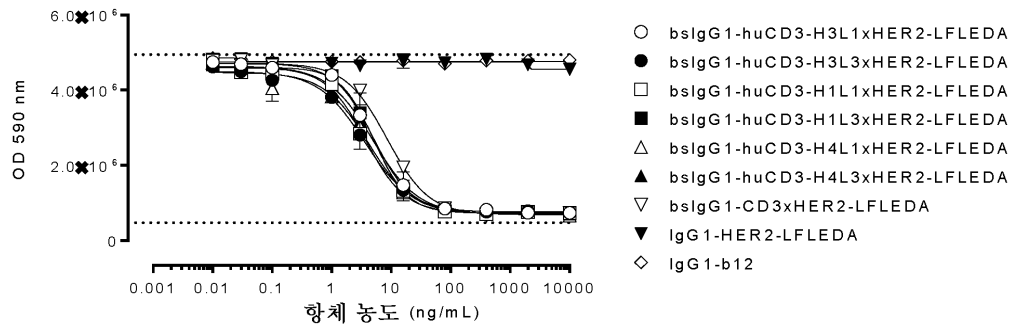
도면9d



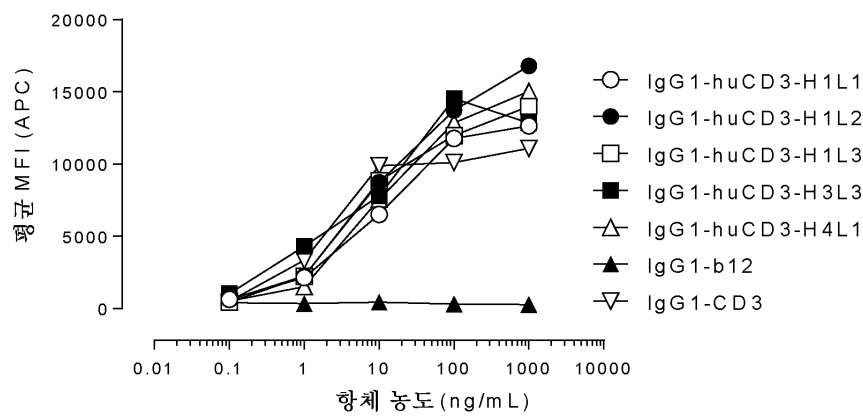
도면10a



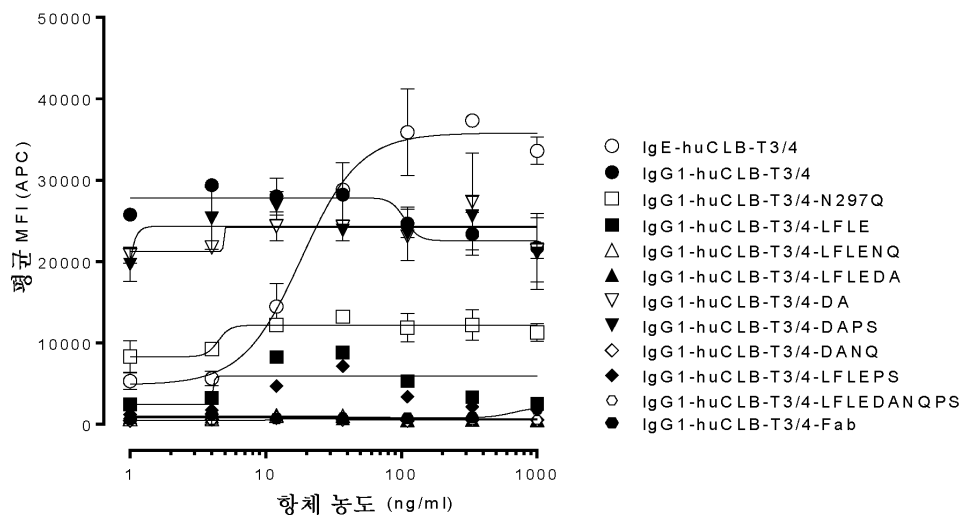
도면10b



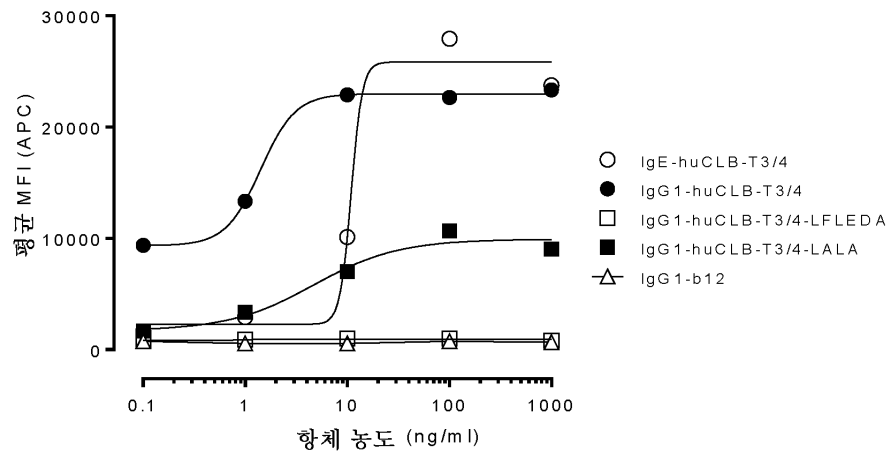
도면11



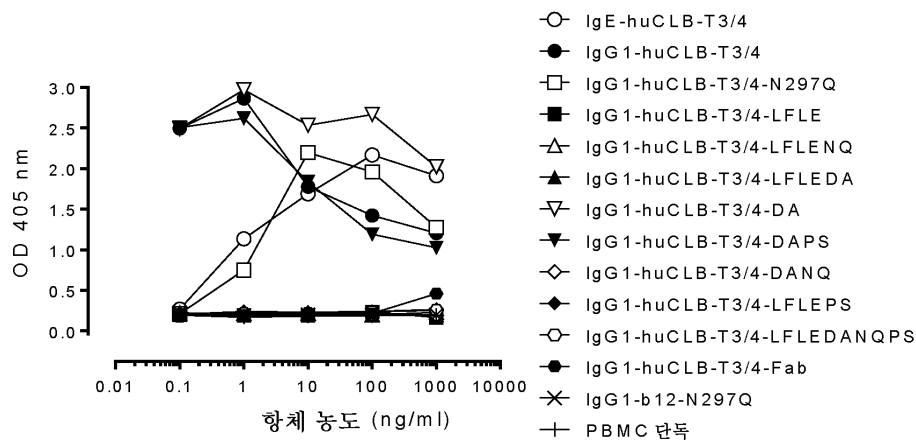
도면12a



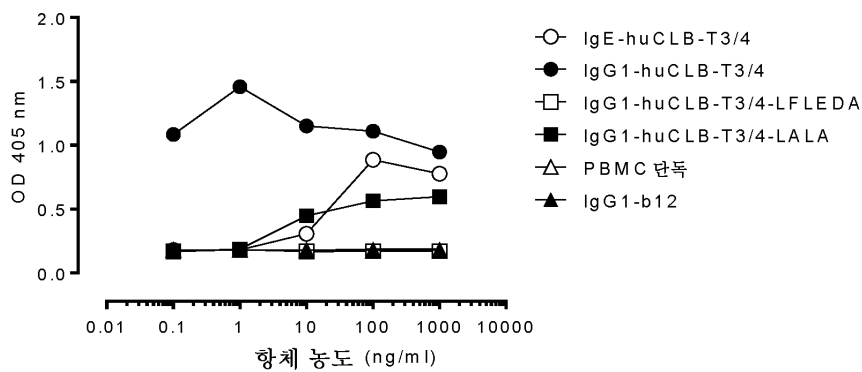
도면12b



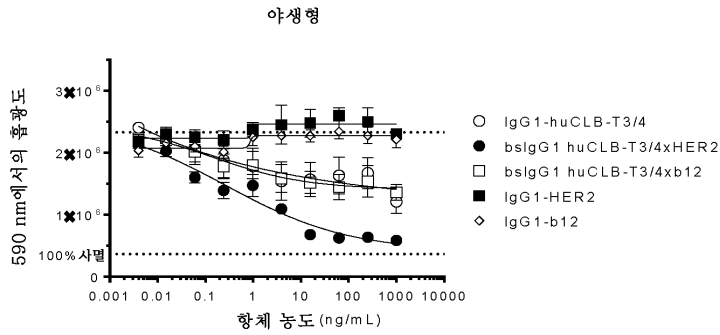
도면13a



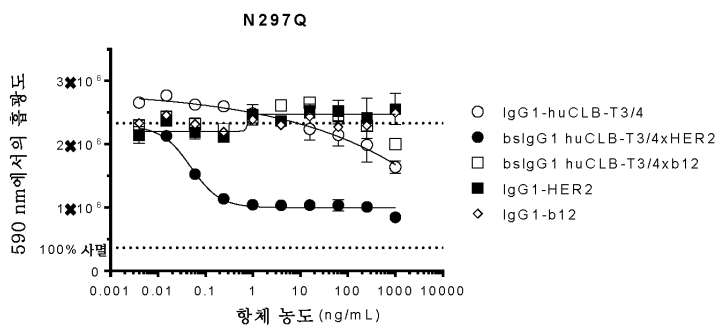
도면13b



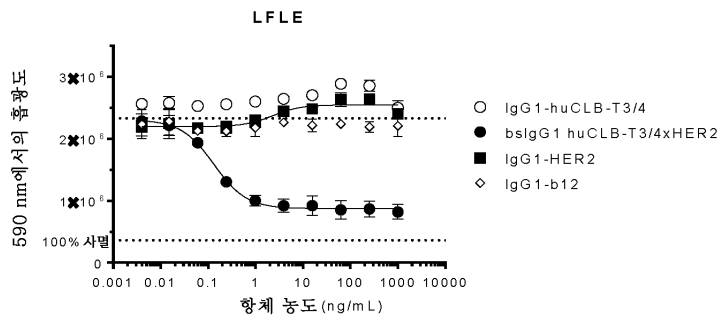
도면14a



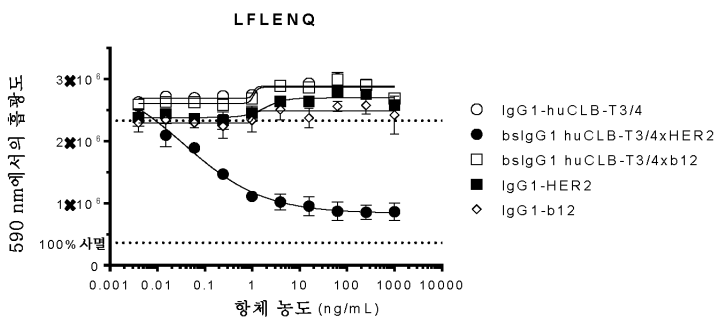
도면14b



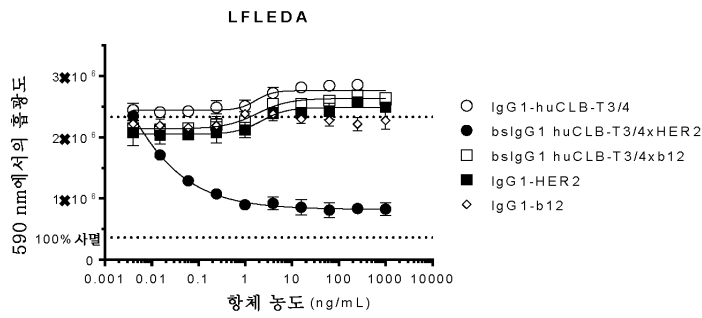
도면14c



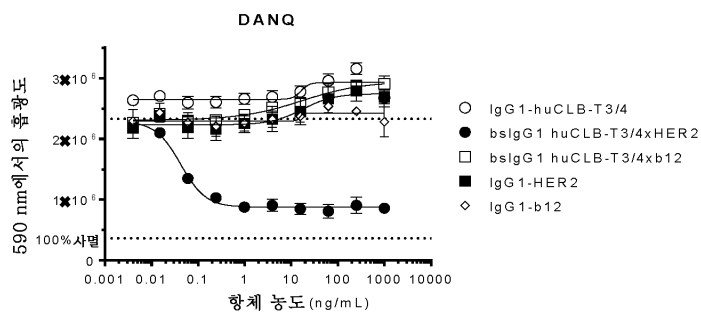
도면14d



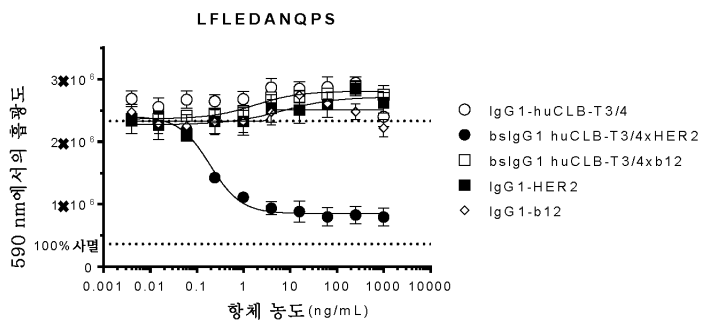
도면14e



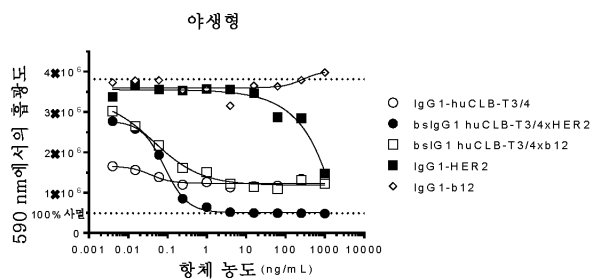
도면14f



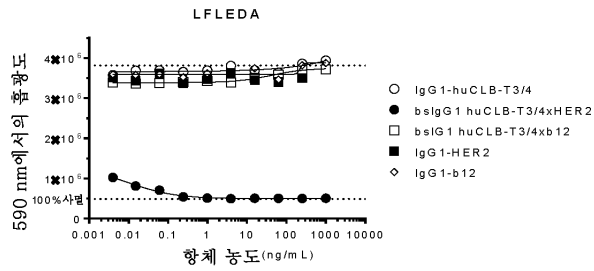
도면14g



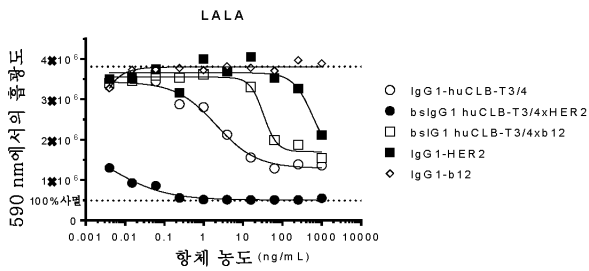
도면15a



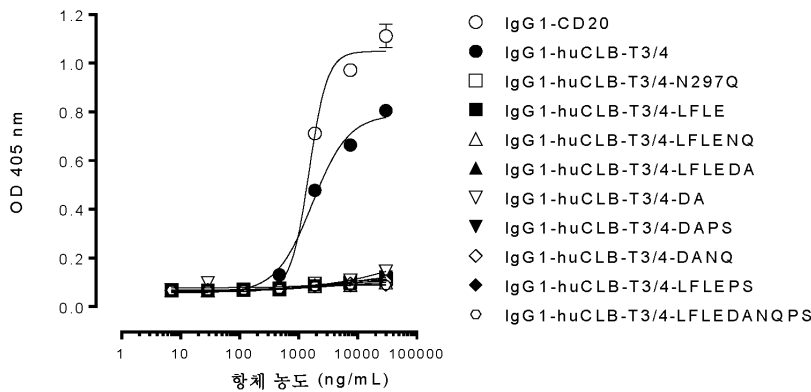
도면15b



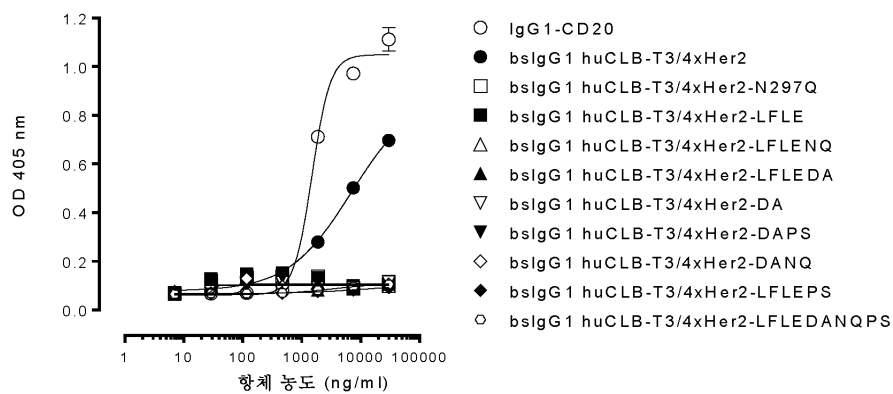
도면15c



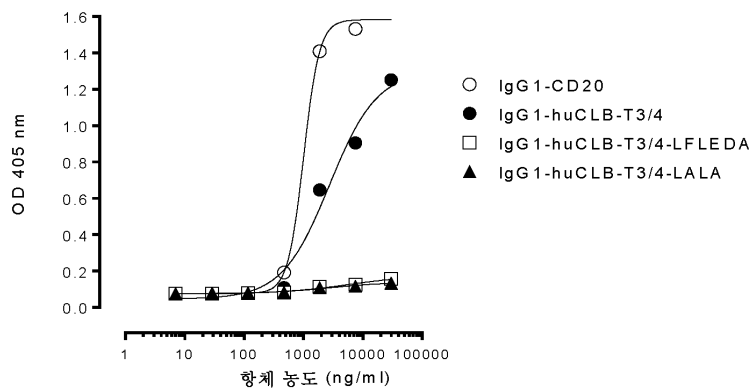
도면16a



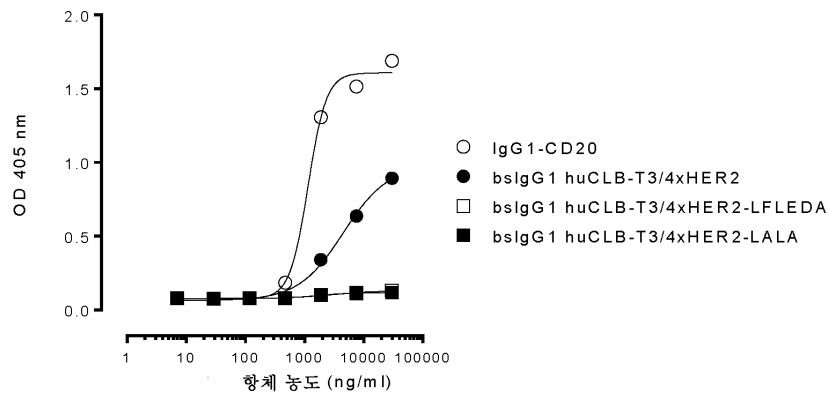
도면16b



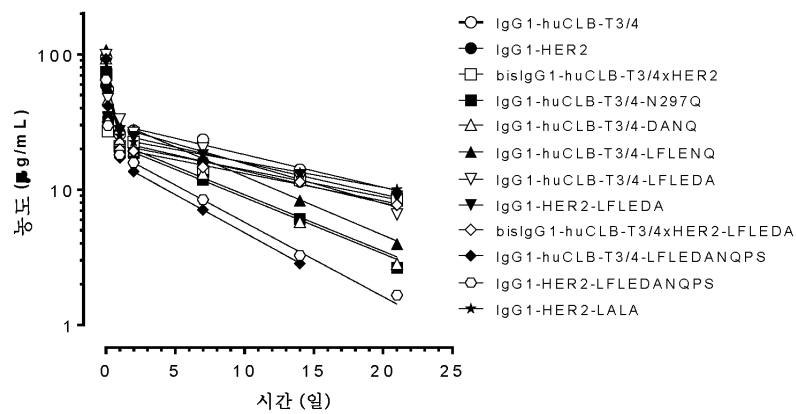
도면16c



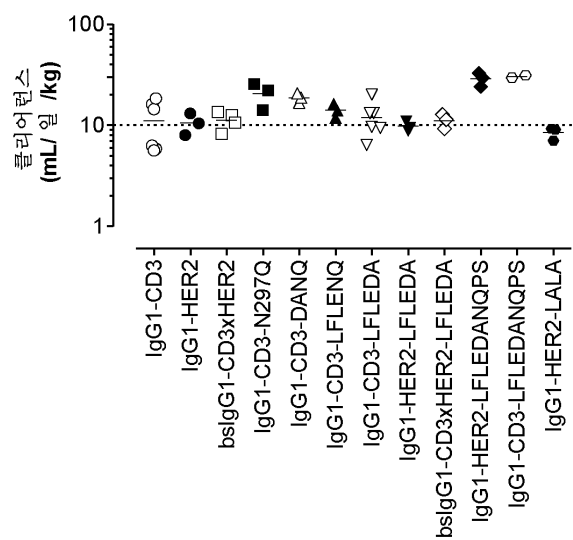
도면16d



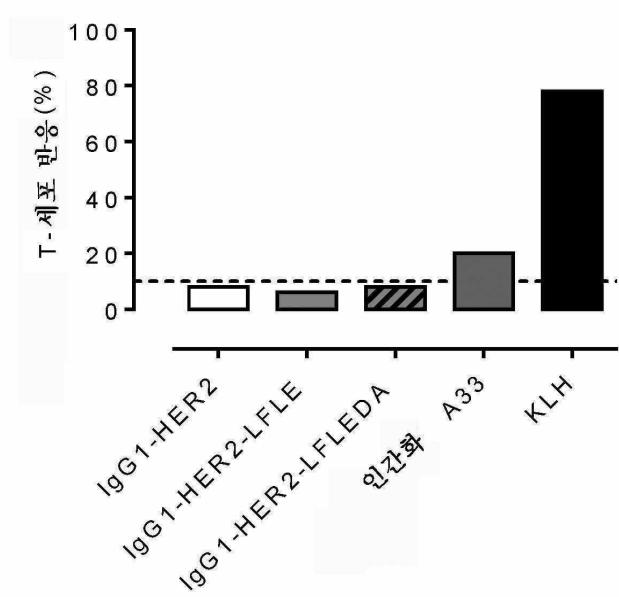
도면17a



도면17b



도면18



도면19

VH	
VH3	EVKLVSGGGLVPGRSILRLSCAAGFTNTYANNVFPQAPKGLQEMVAHIRSKYNNATYYADSVKDRFTISRDDSKSLIYLQNSLKTEDTPANTYCVRHGNFGNSYVMEFAVWQGLLYTVSS
VH2	-----N-----
VH4	-----M-----
VH1	Q-G-----S-N-----97%
VL	
VL1	QAVVTQEPESHVSPPGTVTLTCSRSTGAVTTSNVAWVQQTPOAFKRLIGGTVNRAPGVPAPEGGSLIGPKALITTGQAQDESIYFCALWYSNLMVFGGKLTVL
VL2	-----TL-N-----97%
VL3	-----TL-N-----D-Y-----95%

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Genmab B.V.
- <120> Humanized or chimeric CD3 antibodies
- <130> P/0082-W0
- <160> 30
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

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

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

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

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

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

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

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

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

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

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

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

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

100 105

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

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

100 105

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 13

<211> 186

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
 1 5 10 15
 Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro

20 25 30
 Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
 35 40 45
 Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
 50 55 60
 Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
 65 70 75 80
 Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg

85 90 95
 Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
 100 105 110
 Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr

115 120 125
Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
130 135 140
Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro

145 150 155 160
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp

165 170 175
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

180 185

<210> 14

<211> 150

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys

1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser

20 25 30
Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly

35 40 45
Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr

50 55 60
Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro

65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu

85 90 95
Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu

100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr

115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly

130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys

145 150

<210> 15

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 16
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 16

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

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

65						70						75						80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
					85					90					95				
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
					100					105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
					115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
					130					135					140				
Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
					165					170					175				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
					180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
					195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
					210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu				
					225					230					235				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
					245					250					255				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
					260					265					270				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
					275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
					290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305					310					315					320				

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20

25

30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg
 100 105

<210> 19
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 19

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

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

100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 177

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln

1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu

20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly

50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His

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

 115 120 125
Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly
 130 135 140
Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro
145 150 155 160
Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg
 165 170 175
Ile

<210> 22
<211> 177
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

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

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His
65 70 75 80
His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp
 85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu
 100 105 110
 Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys
 115 120 125

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

<210> 23

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

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

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

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

115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu

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

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 26
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330
<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 27
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120 125
 <210> 28
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 28

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

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

<210> 29
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His 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 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

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

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

85 90 95
Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

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

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105