



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0077271  
(43) 공개일자 2018년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)

(52) CPC특허분류  
*C07K 16/2809* (2013.01)  
*A61K 39/395* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7015756

(22) 출원일자(국제) 2016년11월02일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년06월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/060087

(87) 국제공개번호 WO 2017/079272  
국제공개일자 2017년05월11일

(30) 우선권주장  
62/250,451 2015년11월03일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

(71) 출원인  
암브룩스, 인코포레이티드  
미국 캘리포니아주 92037 라호야 노스 터레이 파  
인스 로드 10975 수트 100

(72) 발명자  
하룬 라시드  
미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파  
인스 로드 10975 암브룩스 인코포레이티드 내  
티안 평  
미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파  
인스 로드 10975 암브룩스 인코포레이티드 내  
김노파울로스 마르코  
미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파  
인스 로드 10975 암브룩스 인코포레이티드 내

(74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 항-CD3-플레이트 컨쥬케이트 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 플레이트에 컨쥬케이션된 신규 항-CD3 항체를 기재하고 있으며, 이러한 컨쥬케이트로부터 이득을 얻게 될 질병 또는 질환의 치료에서 이의 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/6803* (2017.08)

*A61K 47/6849* (2017.08)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

*C07K 2317/732* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

*C07K 2317/94* (2013.01)

*C07K 2319/55* (2013.01)

(30) 우선권주장

62/267,086 2015년12월14일 미국(US)

62/374,693 2016년08월12일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열 번호 1-15 중 적어도 하나를 포함하는 항-CD3 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 1-15 중 2개를 포함하는 항-CD3 항체.

#### 청구항 3

i) 제1 결합 도메인 및 ii) 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 결합 분자로서, 제2 결합 도메인은 서열 번호 1-15로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이중특이적 결합 분자.

#### 청구항 4

서열 번호 1-15 중 하나 이상으로 표시된 아미노산 서열을 포함하는, 세포독성적으로 활성인 CD3 특이적 결합 구축물.

#### 청구항 5

항-CD3 항체로서, (a) 서열 번호 1-3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및 (b) 서열 번호 4-6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 결합 도메인을 포함하는 항-CD3 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 하나 이상의 변역 후 변형을 포함하는 것인 항-CD3 항체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결되어 있는 것인 항-CD3 항체.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 생물학적 활성 분자가 폴레이트인 항-CD3 항체.

#### 청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 2작용성 중합체, 2작용성 링커 또는 적어도 하나의 항체 폴리펩타이드에 연결되어 있는 것인 항-CD3 항체.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 폴레이트에 컨쥬게이션된(conjugated) 항-CD3 항체 및 이의 단편에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 천연 생성된 항체(Ab)는 2개의 동일한 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄로 구성된 사량체 구조이다. Ab의 중쇄 및 경쇄는 상이한 도메인들로 구성된다. 각각의 경쇄는 1개의 가변 도메인(VL) 및 1개의 불변 도메인(CL)을 가지는 한편, 각각의 중쇄는 1개의 가변 도메인(VH) 및 3개 내지 4개의 불변 도메인(CH)을 가진다. 약 110개 아미노산 잔기로 구성된 각각의 도메인은, 서로에 대해 패킹된(packed) 2개의  $\beta$ -시트로부터 형성된 특징적인  $\beta$ -샌드위치 구조인 면역글로불린 폴드로 접힌다. VL 도메인은 각각 3개의 상보성 결정 영역(CDR1 내지 CDR3)을 가지고, VH 도메인은 각각 4개 이하의 상보성 결정 영역(CDR1 내지 CDR4)을 가지며, 이들 상보성 결정

영역은 도메인의 하나의 말단에서  $\beta$ -가닥들을 연결하는 루프 또는 턴이다. 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 일반적으로, 항원 특이성에 기여하지만, 특이성에 대한 개개의 사슬의 기여도는 본질적으로 동일하지 않다. 항체 분자는 랜덤화된(randomized) CDR 루프를 사용함으로써 다수의 분자들에 결합하도록 발달해 왔다.

[0003] Ab의 기능적인 하위구조는 단백질분해 및 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 이들 하위구조는, 단일 사슬간 이황화 결합에 의해 연결된 중쇄의 VH-CH1 도메인 및 경쇄의 VL-CL1 도메인을 포함하는 Fab 단편, VH 도메인 및 VL 도메인만 포함하는 Fv 단편, 및 분자의 비-항원 결합 영역을 포함하는 Fc 부위를 포함한다. 일부 경우, 단일 VH 도메인은 항원에 대한 유의한 친화성을 보유한다(문헌[Ward et al., 1989, Nature 341, 554-546]). 또한, 소정의 단량체성 κ 경쇄가 이의 항원에 특이적으로 결합할 것으로 나타나 있다(문헌[L. Masat et al., 1994, PNAS 91:893-896]). 분리된 경쇄 또는 중쇄가 이따금, 어느 정도의 항원-결합 활성을 마찬가지로 보유하고 있는 것으로 확인되었다(문헌[Ward et al., 1989, Nature 341, 554-546]).

[0004] 또 다른 기능적인 하위구조는 웨타이드 링커에 의해 공유 연결된, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들로 구성된 단일 사슬 Fv(scFv)이다(문헌[S-z Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061]). 이들 저분자량 (small)(Mr 25,000) 단백질은 일반적으로, 단일 폴리웨타이드에서 항원에 대한 특이성 및 친화성을 보유하고, 더 큰 항원-특이적인 분자에 대해 편리한 빌딩 블록(building block)을 제공할 수 있다. 순환 시 scFv의 짧은 반감기는 많은 경우들에서 이러한 scFv의 치료적 유용성을 제한한다.

[0005] "미니바디(minibody)"로 지칭되는 저분자량 단백질 스캐폴드는 Ig VH 도메인의 일부를 주형으로서 사용하여 디자인되었다(문헌[Pessi et al., 1993, Nature 362, 367-369]). 인터루킨-6에 대해 높은 친화성(해리 상수( $K_d$ )가 약  $10^{-7}$  M임)을 가진 미니바디는 VH의 CDR1 및 CDR2에 상응하는 루프들을 랜덤화한 다음, 파지 디스플레이 방법을 사용하여 돌연변이체들을 선별함으로써 식별되었다(identified)(문헌[Martin et al., 1994, EMBO J. 13, 5303-5309]).

[0006] 카멜(camel)은 종종, 이의 혈청 유래의 IgG-유사 물질을 분석한 경우 가변 경쇄 도메인이 결여되어 있으며, 이는, 충분한 항체 특이성 및 친화성이 VH 도메인(3개 내지 4개의 CDR 루프) 단독으로부터 유래될 수 있음을 제시한다. 높은 친화성을 가진 "카멜화된(camelized)" VH 도메인이 제조되어 왔으며, 높은 특이성은 CDR3만 랜덤화해도 생성될 수 있다.

[0007] "미니바디"에 대한 대안은 "다이아바디(diabody)"이다. 다이아바디는 2개의 항원-결합 부위를 가진 작은 2가의 이중특이적인 항체 단편이다. 이러한 단편은 동일한 폴리웨타이드 사슬( $V_H-V_L$ ) 상에서 경쇄 가변 도메인( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인( $V_H$ )을 포함한다. 다이아바디의 크기는 Fab 단편과 유사하다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에서 페어링(pairing)을 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 어쩔 수 없이 또 다른 사슬의 상보적인 도메인과 쌍(pair)을 이루게 되고, 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 이들 이량체성 항체 단편 또는 "다이아바디"는 2가이고 이중특이적이다. 문헌[P. Holliger et al., PNAS 90:6444-6448 (1993)]을 참조한다.

[0008] CDR 웨타이드 및 유기 CDR 모방체가 제조되었다(문헌[Dougall et al., 1994, Trends Biotechnol. 12, 372-379]). CDR 웨타이드는 짧고, 전형적으로 환형인 웨타이드로서, 항체의 CDR 루프의 아미노산 서열에 상응한다. CDR 루프는 항체-항원 상호작용에 책임이 있다. CDR 웨타이드 및 유기 CDR 모방체는 어느 정도의 결합 친화성을 보유하는 것으로 나타나 있다(문헌[Smyth & von Itzstein, 1994, J. Am. Chem. Soc. 116, 2725-2733]). 마우스 CDR은 친화성의 상실 없이 인간 Ig 프레임워크(framework) 상으로 그래프팅되었다(문헌[Jones et al., 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann et al., 1988]).

[0009] 신체에서, 특이적인 Ab가 큰 라이브러리(large library)로부터 선별되고, 증폭된다(친화성 성숙(affinity maturation)). 이러한 과정은 시험관내에서 조합화학 라이브러리(combinatorial library) 기술을 사용하여 재현될 수 있다. 박테리오파지의 표면 상에서의 Ab 단편의 성공적인 디스플레이 덕택에, 상당히 많은 수의 CDR 돌연변이들을 생성하고 스크리닝할 수 있게 되었다(문헌[McCafferty et al., 1990, Nature 348, 552-554; Barbas et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,7978-7982; Winter et al., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455]). 증가하는 수의 Fab 및 Fv(및 이들의 유도체)가 이 기술에 의해 생성된다. 조합화학 기술은 Ab 모방 (Ab mimic)과 조합될 수 있다.

[0010] 잠재적으로 단백질 스캐폴드로서 역할을 할 수 있는 많은 단백질 도메인들은 파지 캡시드 단백질과의 융합으로서 발현되어 왔다. 문헌[Clackson & Wells, Trends Biotechnol. 12:173-184 (1994)]을 참조한다. 이들 단백질

도메인 중 몇몇은 이미, 소 체장 트립신 저해제(문헌[Roberts et al., PNAS 89:2429-2433 (1992)]), 인간 성장 호르몬(문헌[Lowman et al., Biochemistry 30:10832-10838 (1991); Venturini et al., Protein Peptide Letters 1:70-75 (1994)]) 및 스트렙토콕커스(*Streptococcus*)의 IgG 결합 도메인(문헌[O'Neil et al., Techniques in Protein Chemistry V(Crabb, L., ed.) pp. 517-524, Academic Press, San Diego (1994)])을 포함하여 랜덤 웹타이드 서열을 디스플레이하기 위한 스캐폴드로서 사용되어 왔다. 이들 스캐폴드는 단일 랜덤화된 루프 또는 영역을 디스플레이하였다. 텐다미스탯(tendamistat)은 사상 과지(filamentous phage) M13 상에서 제시 스캐폴드로서 사용되어 왔다(문헌[McConnell and Hoess, 1995, J. Mol. Biol. 250:460-470]).

[0011] 친수성 중합체 폴리(에틸렌 글리콜), 축약하여 PEG의 공유 부착은 단백질, 웹타이드, 특히 소수성 분자를 포함하여 많은 생물학적 활성 분자들의 수용성 및 생체이용률을 증가시키거나, 혈청 반감기를 증가시키거나, 치료 반감기를 증가시키거나, 면역원성을 조정하거나, 생물학적 활성을 조정하거나, 순환 시간을 연장시키는 방법이다. PEG는 생체적합성, 독성의 결여 및 면역원성의 결여가 중요한 약제학, 인공 임플란트 및 다른 적용들에서 광범위하게 사용되어 왔다. PEG의 요망되는 특성을 최대화하기 위해, 생물학적 활성 분자에 부착되는 PEG 중합체 또는 중합체들의 총 분자량 및 수화 상태가, 부모(parent) 분자의 대생물활성(bioactivity)에 부작용을 주지 않으면서도 PEG 중합체 부착과 전형적으로 연관된 유리한 특징들, 예컨대 증가된 수용성 및 순환 반감기를 부여하기에 충분히 높아야 한다.

[0012] PEG 유도체는 빈번하게는, 반응성 화학적 작용기, 예컨대 라이신, 시스테인 및 히스티딘 잔기, N-말단 및 탄수화물 모이어티를 통해 생물학적 활성 분자에 연결된다. 단백질 및 다른 분자는 종종, 중합체 부착에 이용 가능한 반응성 부위를 제한된 수로 가진다. 종종, 중합체 부착을 통한 변형에 가장 적합한 부위는 수용체 결합에 유의한 역할을 하고, 분자의 생물학적 활성의 보유에 필수적이다. 그 결과, 생물학적 활성 분자 상의 이러한 반응성 부위에 대한 중합체 사슬의 분별없는 부착은 종종, 중합체-변형된 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키거나 심지어 완전히 상실시킨다(문헌[R. Clark et al., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271:21969-21977]). 표적 분자에 요망되는 이점을 부여하고자 충분한 중합체 분자량을 가진 컨쥬게이트를 형성하기 위해, 선행 기술의 접근법들은 전형적으로, 수많은 중합체 암(arm)들을 분자에 랜덤 부착시키는 것에 관여하였으며, 이로 인해 부모 분자의 대생물활성의 감소 또는 심지어 완전한 상실의 위험성이 증가되었다.

[0013] 비-유전학적으로 인코딩된 아미노산을 단백질 내에 혼입시키는 능력은, 천연-발생 작용기, 예컨대 라이신의 엡실론  $-\text{NH}_2$ , 시스테인의 설피드릴  $-\text{SH}$ , 히스티딘의 아미노기 등에 대한 중요한 대안을 제공할 수 있을 화학적 작용기의 도입을 허용한다. 소정의 화학적 작용기는, 20개의 보편적인, 유전적으로-인코딩된 아미노산에서 확인되는 작용기에 대해 불활성이지만, 안정한 연결을 형성하기 위해 명료하고 효율적으로 반응하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 아자이드기 및 아세틸렌기가 촉매량의 구리의 존재 하에 수성 조건에서 휘쓰겐(Huisgen)[3+2] 고리 첨가 반응을 수행하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Tornoe, et al., (2002) *Org. Chem.* 67:3057-3064; 및 Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599]을 참조한다. 예를 들어 아자이드 모이어티를 단백질 구조 내에 도입함으로써, 당업자는, 단백질에서 확인되는 아민기, 설피드릴기, 카르복실산기, 하이드록실기에 대해서는 화학적으로 불활성이지만 아세틸렌 모이어티와 매끄럽고 효율적으로 반응하여 고리첨가 생성물을 형성하는 작용기를 혼입시킬 수 있다. 중요하게는, 아세틸렌 모이어티의 부재 시, 아자이드는 다른 단백질 측쇄의 존재 하에, 생리학적 조건 하에 화학적으로 불활성이고 비반응성인 채로 남아 있다.

[0014] 본 발명은 특히, 항원-결합 폴리펩타이드 및 이의 단편, 특히 폴리펩타이드 저분자 컨쥬게이트의 활성 및 생성과 연관된 문제점을 해결하고, 또한, 개선된 생물학적 또는 약물학적 특성, 예컨대 개선된 치료 반감기를 가진 항원-결합 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 저분자 컨쥬게이트의 생성을 해결한다.

### 발명의 내용

[0015] 본 발명은 폴레이트에 컨쥬게이션된 항-CD3 항체 및 이의 컨쥬게이트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 신규 항-CD3 항체는 하나 이상의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 완전(complete) 항체 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 완전 항체 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 항체 경쇄의 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 항체 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 항체 경쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 항-CD3 항체의 항체 중쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 경쇄의 적어도 하나의 CDR 및 중쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 Fab를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 2개 이상의 Fab를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 2개 이상의 scFv를 포함한다. 일부 실

시형태에서, 항-CD3 항체는 미니바디를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 2개 이상의 미니바디를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 다이아바디를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 2개 이상의 다이아바디를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 완전 경쇄 및 완전 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 하나 이상의 Fc 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 상기 실시형태들의 임의의 실시형태들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 상기 실시형태들의 임의의 실시형태의 호모이량체, 혼테로이량체, 호모다량체 또는 혼테로다량체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 결합 파트너에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서, 결합 파트너는 항원, 폴리펩타이드, 핵산 분자, 중합체, 또는 다른 분자 또는 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 비-항체 스캐폴드 분자 또는 성분과 연관되어 있다.

[0016] 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 2작용성 중합체, 2작용성 링커 또는 적어도 하나의 추가 항-CD3 항체에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 이러한 항-CD3 항체가 아닌 폴리펩타이드에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드는, 마찬가지로 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함할 수 있는 하나 이상의 추가 항원-결합 폴리펩타이드에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드는, 마찬가지로 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드 저분자 컨쥬게이트에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체는, 마찬가지로 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함할 수 있는 하나 이상의 추가 항원-결합 폴리펩타이드에 연결되어 있다.

[0017] 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 2작용성 중합체이다. 일부 실시형태에서, 2작용성 중합체는 제2 폴리펩타이드에 연결되어 있다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드는 항원-결합 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩타이드는 항-CD3 항체이다.

[0018] 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체에서 아미노산 치환은 천연 발생 또는 비-천연 발생 아미노산에 의한 치환일 수 있되, 단, 적어도 하나의 치환은 비-천연적으로 인코딩된 아미노산에 의한 치환이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산은 카르보닐기, 아세틸기, 아미노옥시기, 하이드라진기, 하이드라자이드기, 세미카르바자이드기, 아자이드기 또는 알카인기를 포함한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자의 분자량은 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa이다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자의 분자량은 0.1 kDa 내지 50 kDa이다.

[0021] 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 중합체이다. 일부 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지의 분자량은 1 kDa 내지 100 kDa, 또는 1 kDa 내지 50 kDa이다.

[0022] 본 발명은 또한, 하나 이상의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산에 부착된 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 항-CD3 항체 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서, 상기 비-천연적으로 인코딩된 아미노산은 사전-선별된(pre-selected) 부위에서 폴리펩타이드 내로 리보솜적으로(ribosomally) 흔입된다.

### 도면의 간단한 설명

[0023] 도 1 - 항-CD3 Fab-폴레이트에 의한 표적 세포의 T 세포 연관성(engagement) 및 용량-의존적인 독성을 보여준다. 도 1 (A)는 활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)의 존재 하에 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 KB(FR+), OV-90(FR+) 및 CAKI-1(FR-) 세포에서 용량-의존적인 T 세포-매개 세포독성의 그래프이다. 증가하는 농도의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 비컨쥬게이션된 항-CD3 Fab를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 표적 세포와 함께 12시간 내지 24시간 동안 인큐베이션하였다. 용해된 세포로부터 방출된 LDH 수준을 제조업체의 프로토콜(Cytotox 96 비방사성 세포독성 검정법, Promega)에 따라 측정함으로써 세포독성을 정량화하였다. 도 1 (B)는, 10% FBS가 보충된 폴레이트-무함유 RPMI-1640 배지에서 적어도 3회의 계대배양 동안 유지된 SKOV-3 세포를 보여주며, 이러한 계대배양 이후에 세포를 48-웰 세포 배양 폴레이트에 접종하고 폴레이트에 부착시킨 다음, 활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)를 첨가하였다. 항-CD3 Fab 또는 항-CD3 Fab-폴레이트를 폴레이트-무함유 배지에 희석시키고, 지시된 농도로 첨가하였으며, 공동-배양물을 16시간 동안 인큐

베이션하였다. 25x 대물렌즈 현미경(objective microscope)을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

도 2 - 항-CD3 Fab-폴레이트 이중특이적인 제제(bispecific agent)의 생체내 효능을, 암컷 NOD-SCID 마우스를 사용하는 이종 이식 모델에서 평가하였다. 이중특이적인 제제와 경쟁하게 될 폴레이트의 순환중 혈청 수준을 감소시키기 위해, 동물을 저-폴레이트 식이요법으로 유지시켰다. KB(FR+) 또는 A549(FR-) 세포는 비-활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 100임) 또는 활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)와 혼합되고 마우스에게 피하 주사된 경우, 종양을 형성할 수 있었다. 활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)와 혼합된 KB 세포를 마우스에게 이식한 다음, 1.5 mg/kg의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS를 종양 세포 이식과 동일한 일자에 출발하여 10일 동안 매일 마우스에게 정맥내 주사하였다. 도 2 (A)는 이 실험의 종양 부피를 보여준다. 종양 부피는 PBS-처리 마우스에서 급속한 증가를 보여주었으며, 배가 시간(doubling time)은 대략 5일이었다. 이와는 대조적으로, 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 마우스에서 종양은 연구 기간 전체에 걸쳐 거의 검출 가능하지 않았다. 병행 연구에서, 마우스에게 비활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 100임)와 혼합된 KB 세포를 이식하고, 1.5 mg/kg의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS를 종양 세포 이식과 동일한 일자에 출발하여 10일 동안 매일 정맥내 처리하였다. 도 2 (B)는 1 : 100의 표적 세포 : 효과기 세포 실험의 종양 부피를 보여준다. 종양의 감소 속도는 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 마우스에서 더 높았다. 연구 제35일 후, PBS-처리 마우스의 종양은 부피가 꾸준하게 증가한 한편, 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 마우스에서 종양은 거의 검출 불가능할 수준까지 감소되었으며, 이는, 심지어 활성화된 T 세포의 부재 하에 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬게이트에 의한 종양의 제거에 대한 세포독성 T 세포의 연관성을 가리킨다. 도 2 (C)는 2개의 치료군의 마우스에서 체중 변화의 그래프 대표도를 보여준다. 도 2 (D)는 3개의 시험군에서 시간 경과에 따른 래트의 혈청 농도를 보여준다: 1 mg/kg 항-CD3Fab-폴레이트를 주사한 시험군; 5 mg/kg 항-CD3Fab-폴레이트를 주사한 시험군; 및 1 mg/kg 항-CD3Fab를 주사한 시험군. 혈청을 규칙적인 간격으로 수합하고, ELISA에 의해 분석하였다. 혈청 농도는 항-CD3 Fab-폴레이트 및 상응하는 비컨쥬게이션된 돌연변이체 항-CD3 Fab 둘 다에 대해 60분의 혈청 반감기와 동일한 속도로 저하되었다.

도 3 - 폴레이트 컨쥬게이트가 FR 및 CD3에 결합하는 것을 보여준다. 도 3 (A)는 유리(free) 폴레이트와의 경쟁에 의해 분석된, A549 세포(FR-)가 아니라 KB 세포(FR+)와 폴레이트-CF488의 결합을 보여주는 그래프 대표도이다. 세포를 증가하는 농도의 컨쥬게이트 및 100 nM 폴레이트를 함유하는 배지와 4°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 세포에 결합된 형광을 유세포분석에 의해 분석하였다. 도 3 (B)는 KB 세포(CD3-)가 아니라 Jurkat 세포(CD3+)와 항-CD3 Fab-CF488의 결합을 보여주는 그래프 대표도이다. 세포를 증가하는 농도의 컨쥬게이트와 4°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 결합을 유세포분석에 의해 분석하였다.

도 4 - 2개의 독립적인 세포독성을 검정법에 의한, 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬게이트의 T 세포-매개 독성을 보여준다. 용량-의존적인 T 세포-매개 세포독성은, 비-활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)의 존재 하에 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 A549 세포(FR-)가 아니라 KB 세포(FR+)에서 관찰되었다. 증가하는 농도의 항-CD3 Fab-폴레이트를 표적 세포와 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 12시간 내지 24시간 동안 인큐베이션하였다. 도 4 (A)에서, 세포를 DIO(녹색 원형질막 염색)로 표지하고, 프로피디움 요오다이드를 1 µg/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 세포독성을 유세포분석에 의해 측정하였다. 도 4 (B)는 24시간 후에 세척된 PBMC의 그래프 대표도를 보여주며, KB 세포의 ATP 함량을 Cell Titer Glo(Promega)를 사용하여 측정하였다.

도 5 - 폴레이트-무함유 배지를 이용한 검정법에서, 인간화된 SP34 Fab 및 SKOV-3에의 컨쥬게이트의 신규 서열 서열 번호 1-15의 결합을 보여준다.

도 6 - 50 nM SFA 배지를 이용한 검정법에서, 인간화된 SP34 Fab 및 SKOV-3에의 컨쥬게이트의 신규 서열 서열 번호 1-15의 결합을 보여준다.

도 7 (A) - 키메라 SP34 폴레이트 투약에 의해 유도된 CD69 발현을 보여준다.

도 7 (B) - 도 7 (A)와 동일한 혈청 시료로 처리된 HPB-ALL 세포의 세포 생존력을 보여준다.

도 8 - 도 6의 50 nM SFA 조건을 반복하여, 인간 PBMC에서 세포독성 퍼센트를 보여주는 사멸화 검정법(killing assay)이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 발명은 본원에 기재된 특정한 방법, 프로토콜, 세포주, 구축물 및 시약으로 제한되지 않으며, 변할 수 있음

을 이해해야 한다. 또한, 본원에 기재된 용어는 특정한 실시형태를 설명하려는 목적일 뿐이고, 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0026] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수형("a," "an" 및 "the")은 문맥상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "폴리펩타이드 저분자 컨쥬게이트" 또는 "항-CD3 항체"에 대한 지칭은 하나 이상의 이러한 단백질을 지칭하며, 당업자에게 공지된 이의 등가물 등을 포함한다.

[0027] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 당업자가 보편적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 바람직한 방법, 장치 및 물질이 현재 기재되어 있다.

[0028] 본원에서 언급된 모든 공개문헌 및 특허는, 예를 들어 공개문헌에 기재되어 있으며 본원에 기재된 발명과 함께 사용될 구축물 및 방법을 기재하고 개시하려는 목적으로 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 본원에서 고찰된 공개문헌들은 본 출원의 출원일 이전에 이들의 개시내용에 대해서만 전적으로 제공된다. 본 발명자들이 이러한 개시내용을 선행 발명 또는 임의의 다른 이유로 여기지 않는다는 것을 인정하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0029] 용어 "실질적으로 정제된"은, 단백질의 천연 발생 환경, 즉 본래의(native) 세포, 또는 재조합적으로 생성되는 항-CD3 항체의 경우 숙주 세포에서 확인되는 단백질을 통상적으로 관여하거나 상호작용하는 구성성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있는 항-CD3 항체를 지칭한다. 세포성 물질이 실질적으로 없을 수 있는 항-CD3 항체는 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1%(건조 중량에 의함) 미만의 오염성 단백질을 가진 단백질 조제물을 포함한다. 항-CD3 항체 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생성되는 경우, 단백질은 세포의 건조 중량을 기준으로, 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1% 이하로 존재할 수 있다. 항-CD3 항체 또는 이의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합적으로 생성되는 경우, 단백질은 배양 배지 내에 세포의 건조 중량을 기준으로, 약 5 g/L, 약 4 g/L, 약 3 g/L, 약 2 g/L, 약 1 g/L, 약 750 mg/L, 약 500 mg/L, 약 250 mg/L, 약 100 mg/L, 약 50 mg/L, 약 10 mg/L 또는 약 1 mg/L 이하로 존재할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 바와 같이 "실질적으로 정제된" 항-CD3 항체는 적절한 방법, 예컨대 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동에 의해 확인되는 바와 같이, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 보다 구체적으로 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99% 이상의 순도 수준을 가질 수 있다.

[0030] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는, 재조합 숙주 세포를 재조하기 위해 삽입에 사용되는 방법, 예를 들어 직접 취득(direct uptake), 형질도입, f-메이팅(f-mating) 또는 당업계에 공지된 다른 방법과는 상관없이, 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 지칭한다. 외인성 폴리뉴클레오타이드는 비통합된(nonintegrated) 백터, 예를 들어 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 대안적으로 숙주 세포 내로 통합될 수 있다.

[0031] 항체는 특이적인 항원에 대해 결합 특이성을 나타내는 단백질이다. 본래의 항체는 통상, 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된 약 150,000 달톤의 혼태로사량체성 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되어 있는 한편, 이황화 연결의 수는 상이한 면역글로불린 아이소타입(isotyp e)들의 중쇄들 사이에 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한, 규칙적으로 이격된(spaced) 사슬간 이황화 가교를 가진다. 각각의 중쇄는 1개의 말단에 가변 도메인( $V_H$ )을 가지고, 뒤이어 다수의 불변 도메인들을 가진다. 각각의 경쇄는 1개의 말단에 가변 도메인( $V_L$ )을 가지고, 나머지 말단에 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되어 있으며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬되어 있다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에서 계면(interface)을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0032] 용어 "가변"은, 가변 도메인의 소정의 부위의 서열이 항체들 사이에서 광범위하게 상이하고, 각각의 특정 항체가 이의 특정 항원에 결합하는 결합 특이성에 책임이 있다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인을 통해 균일하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 3개의 절편들에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부위는 프레임워크 영역(FR)이라고 한다. 본래의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인들은 각각, 대체로  $\beta$ -시트 배치를 취하며 3개 또는 4개의 CDR에 의해 연결된 4개의 FR 영역들을 포함하며, 이들은 루프 연결을 형성하고, 일부 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성한다. 각각의 사슬의 CDR들은 FR 영역에 의해 함께 근접하게 유지되어 있고, 다른 사슬

유래의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조).

[0033] 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 데에 직접적으로 관여하지 않지만, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 항체 또는 면역글로불린은 이들의 종쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 상이한 부류(class)들로 지정될 수 있다. 면역글로불린에는 5개의 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류(아이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 더 분류될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 종쇄 불변 영역은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 라고 한다. 다양한 인간 면역글로불린 부류들 중에서, 오로지 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgM만 보체를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다.

[0034] 항체의 생체내 친화성 성숙은, 주로 체세포 초돌연변이형성(somatic hypermutation)에 의해 제조된 고 친화성 항체 변이체의 항원 선별에 의해 구동된다. 2차 또는 3차 반응의 우세한 생식선 유전자(germline gene)가 1차 또는 2차 반응의 것과 상이하게 나타나는 "레퍼토리 시프트(repertoire shift)"가 또한 종종 발생한다.

[0035] 면역계의 친화성 성숙 과정은, 시험관내에서 돌연변이를 항체 유전자 내에 도입하고, 친화성 선별을 사용하여, 개선된 친화성을 가진 돌연변이체를 단리함으로써 모사(replicate)될 수 있다. 이러한 돌연변이체 항체는 사상 박테리오파지 또는 미생물, 예컨대 효모의 표면 상에 디스플레이될 수 있고, 항체는 항원에 대한 이의 친화성, 또는 항원으로부터의 해리 동역학(kinetics of dissociation)(오프-속도(off-rate))에 의해 선별될 수 있다(문헌[Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]). CDR 워킹 돌연변이형성(walking mutagenesis)은, 인간 면역결핍 바이러스 유형 1(HIV-1)의 인간 외피 당단백질 gp120에 결합하는 인간 항체(문헌[Barbas III et al. PNAS (USA) 91: 3809-3813 (1994); 및 Yang et al. J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995)]); 및 항-c-erbB-2 단일 사슬 Fv 단편(문헌[Schier et al. J. Mol. Biol. 263:551567 (1996)])를 친화성 성숙시키는 데 이용되어 왔다. 항체 사슬 셔플링(chain shuffling) 및 CDR 돌연변이형성이 HIV의 제3 초가변 루프에 대한 고 친화성 인간 항체를 친화성 성숙시키는 데 사용되었다(Thompson et al. J. Mol. Biol. 256:77-88 (1996)). 문헌[Balint and Larrick Gene 137:109-118 (1993)]은 컴퓨터-보조 올리고데옥시리보뉴클레오타이드-지향성(directed) 스캐닝 돌연변이형성을 기재하고 있으며, 이로 인해, 가변 영역 유전자의 모든 CDR들은 개선된 변이체인지 동시에 그리고 철저히 검색된다.  $\alpha$  v  $\beta$  3-특이적인 인간화된 항체는 초기의 제한된 돌연변이형성 전략을 사용하여 친화성 성숙되었으며, 이 전략에서, 6개의 모든 CDR들의 모든 위치가 돌연변이된 다음, 최고 친화성 돌연변이체를 포함하는 조합화학 라이브러리의 발현 및 스크리닝이 수행되었다(문헌[Wu et al. PNAS (USA) 95: 6037-6-42 (1998)]). 파지 디스플레이된 항체는 문헌[Chiswell and McCafferty TIBTECH 10:80-84 (1992); 및 Rader and Barbas III Current Opinion in Biotech. 8:503-508 (1997)]에 리뷰되어 있다. 부모 항체와 비교하여 개선된 친화성을 가진 돌연변이체 항체가 상기 참조문헌에 기록되어 있는 각각의 경우, 돌연변이체 항체는 CDR에 아미노산 치환을 가진다.

[0036] 본원에서 "친화성 성숙"이란, 항원에 대한 항체의 친화성을 증강시키는 과정을 의미한다. 친화성 성숙 방법으로는, 컴퓨터 스크리닝(computational screening) 방법 및 실험 방법이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본원에서 "항체"란, 항체 유전자의 모두 또는 일부에 의해 실질적으로 인코딩된 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성된 단백질을 의미한다. 면역글로불린 유전자로는, 카파, 람다, 알파, 감마(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), 엘타, 앤실론 및 뮤(mu) 불변 영역 유전자, 뿐만 아니라 미리아드(myriad) 면역글로불린 가변 영역 유전자 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본원에서 항체는 전장 항체 및 항체 단편을 포함하고, 임의의 유기체 내에서 천연적으로 존재하거나 조작된 항체(예를 들어 변이체임)를 포함하는 것을 의미한다.

[0038] "항체 단편"은 전장 형태 이외의 임의의 형태의 항체를 의미한다. 본원에서 항체 단편은, 전장 항체 내에 존재하는 더 작은 구성성분인 항체, 및 조작된 항체를 포함한다. 항체 단편으로는, Fv, Fc, Fab 및 (Fab')<sub>2</sub>, 단일 사슬 Fv(scFv), 다이아바디, 트리바디, 테트라바디, 2작용성 하이브리드 항체, CDR1, CDR2, CDR3, CDR들의 조합, 가변 영역, 프레임워크 영역, 불변 영역 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다(문헌[Maynard & Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402]).

[0039] 본원에서 "컴퓨터 스크리닝 방법"이란, 단백질 내에 하나 이상의 돌연변이를 디자인하기 위한 임의의 방법을 의미하고, 여기서, 상기 방법은 서로 및/또는 단백질의 나머지에 의한 잠재적인 아미노산 측쇄 치환들의 상호작용 에너지를 평가하기 위해 컴퓨터를 이용한다.

[0040] 본원에서 "Fc"란, 면역글로불린 도메인 C $\gamma$ 2 및 C $\gamma$ 3(C $\gamma$ 2 및 C $\gamma$ 3)로 구성된 항체 부위를 의미한다. Fc는

또한, C<sub>γ</sub>2와 C<sub>γ</sub>1(C<sub>γ</sub>1) 사이의 N-말단 힌지(hinge)에 존재하는 임의의 잔기를 포함할 수 있다. Fc는 이러한 영역을 단리하여 지칭하거나, 이러한 영역을 항체 또는 항체 단편의 맥락에서 지칭할 수 있다. Fc는 또한 비제한적으로, 본래의 단량체, 본래의 이량체(이항화 결합에 의해 연결됨), 변형된 이량체(이항화 및/또는 비공유 연결됨) 및 변형된 단량체(즉, 유도체) 등을 포함하여 임의의 변형된 형태의 Fc를 포함한다.

[0041] 본원에서 "전장 항체"란, 항체 H 사슬 및/또는 L 사슬의 천연 생물학적 형태를 구성하는 구조를 의미한다. 인간 및 마우스를 포함한 대부분의 포유류에서, 이러한 형태는 사량체이고, 2개의 면역글로불린 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 가지고, 각각의 경쇄는 면역글로불린 도메인 V<sub>L</sub> 및 C<sub>L</sub>을 포함하며, 각각의 중쇄는 면역글로불린 도메인 V<sub>H</sub>, C<sub>γ</sub>1, C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3를 포함한다. 각각의 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역(V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub>)은 함께 항원 결합에 책임이 있고, 불변 영역(C<sub>L</sub>, C<sub>γ</sub>1, C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3, 특히 C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3)은 항체 효과기 기능에 책임이 있다. 일부 포유류, 예를 들어 낙타 및 리마에서, 전장 항체는 오로지 2개의 중쇄로만 구성될 수 있으며, 각각의 중쇄는 면역글로불린 도메인 V<sub>H</sub>, C<sub>γ</sub>2 및 C<sub>γ</sub>3를 포함한다.

[0042] 본원에서 "면역글로불린(Ig)"이란, 면역글로불린 유전자에 의해 실질적으로 인코딩된 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성된 단백질을 의미한다. 면역글로불린으로는 항체가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 면역글로불린은 비제한적으로 전장 항체, 항체 단편 및 개별 면역글로불린 도메인을 포함하여 다수의 구조적 형태들, 예컨대 비제한적으로 비제한적으로 V<sub>H</sub>, C<sub>γ</sub>1, C<sub>γ</sub>2, C<sub>γ</sub>3, V<sub>L</sub> 및 C<sub>L</sub>을 가질 수 있다.

[0043] 본원에서 "면역글로불린(Ig) 도메인"이란, 면역글로불린 유전자에 의해 실질적으로 인코딩된 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성된 단백질 도메인을 의미한다. Ig 도메인으로는, 도 1에 도시된 바와 같이 V<sub>H</sub>, C<sub>γ</sub>1, C<sub>γ</sub>2, C<sub>γ</sub>3, V<sub>L</sub> 및 C<sub>L</sub> 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본원에서 "변이체 단백질 서열"이란, 아미노산 동일성의 측면에서 또 다른 유사한 단백질 서열과 상이한 하나 이상의 잔기를 가진 단백질 서열을 의미한다. 상기 유사한 단백질 서열은 천연 야생형 단백질 서열, 또는 야생형 서열의 또 다른 변이체일 수 있다. 일반적으로, 출발 서열은 "부모" 서열로 지칭되고, 야생형 또는 변이체 서열일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 바람직한 실시형태는 인간화된 부모 서열을 이용할 수 있으며, 이러한 부모 서열 상에서 변이체 제조를 위해 컴퓨터 분석이 수행된다.

[0045] 본원에서 항체의 "가변 영역"이란, 도 1에 도시된 바와 같이 V<sub>H</sub> 면역글로불린 도메인, V<sub>L</sub> 면역글로불린 도메인, 또는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 면역글로불린 도메인으로 구성된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들(변이체를 포함함)을 의미한다. 가변 영역은 이러한 폴리펩타이드 또는 이들 폴리펩타이드를, 단리된 것, Fv 단편, scFv 단편, 더 큰 항체 단편의 맥락에서 이러한 영역, 또는 전장 항체 또는 대안적인 비-항체 스캐폴드 분자의 맥락에서 이러한 영역으로서 지칭할 수 있다.

[0046] 본 발명은 광범위한 공급원으로부터 수득된 항체에 적용될 수 있다. 항체는 실질적으로 인간, 마우스, 래트, 토끼, 낙타, 리마, 단봉 낙타, 원숭이, 특히 포유류, 특히 인간, 특히 마우스 및 래트를 포함하는 임의의 유기체 유래의 항체 유전자 또는 항체 유전자들에 의해 인코딩될 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 예를 들어 트랜스제닉(transgenic) 마우스 또는 다른 동물(문헌[Bruggemann & Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-458]) 또는 선별 방법과 커플링된 인간 항체 라이브러리(문헌[Griffiths & Duncan, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:102-108])를 사용함으로써 환자 또는 피험자로부터 수득된 전장 인간일 수 있다. 항체는 인공 또는 천연 발생을 포함하여 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 비제한적으로, 키메라 항체 및 인간화된 항체를 포함하여 조작된 항체(문헌[Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402]), 또는 조합화학 라이브러리로부터 유래된 항체를 이용할 수 있다. 또한, 최적화되는 항체는, 하나 이상의 천연 항체 유전자에 의해 실질적으로 인코딩된 항체의 조작된 변이체일 수 있다. 예를 들어 일 실시형태에서, 최적화된 항체는 친화성 성숙에 의해 식별된 항체이다.

[0047] 본 발명의 항-CD3 항체에 관해서, 용어 "항원적으로 특이적인" 또는 "특이적으로 결합한다"는 관심 항원 또는 결합 파트너의 하나 이상의 에피토프에 결합하지만, 항원들의 혼합된 집단을 함유하는 시료에서 다른 분자를 실질적으로 인지해서 결합하지는 않는 항-CD3 항체를 지칭한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중특이적인 항-CD3 항체" 또는 "다중특이적인 항-CD3 항체"는 2개 이상의 항원-결합 부위 또는 결합 파트너 결합 부위를 포함하는 항-CD3 항체를 지칭하며, 제1 결합 부위는 제1 항원 또는 에피토프에 대해 친화성을 가지고, 제2 결합 부위는 제1의 것들과는 별개의 제2 항원 또는 에피토프에 대해 친

화성을 가진다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프"는 항-CD3 항체에 의해 인지되는 항원 또는 결합 파트너 상의 부위를 지칭한다. 항원이 폴리펩타이드를 포함하는 경우, 에피토프는 아미노산의 선형 또는 입체형태적으로 형성된 서열 또는 형상일 수 있다. 에피토프는 또한, 항-CD3 항체가 항원에 결합하는 임의의 유형의 항원 상의 임의의 위치일 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, "항원-결합 폴리펩타이드" 또는 "항-CD3 항체"는, 특정 결합 파트너, 예컨대 항원에 특이적으로 결합하는 생물학적 활성을 적어도 가진 폴리펩타이드 및 단백질, 뿐만 아니라 이들의 항-CD3 항체 유사체, 항-CD3 항체 이소폼(isoform), 항-CD3 항체 모방체, 항-CD3 항체 단편, 하이브리드 항-CD3 항체 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 호모로그(homologue), 글리코실화 패턴 변이체 및 돌연변이단백질(mutant)을 이들의 생물학적 활성과는 무관하게, 추가로 비제한적으로 재조합(cDNA, 계놈 DNA, 합성 DNA 또는 다른 형태의 핵산으로부터 생성되는지의 여부), 시험관내, 생체내, 핵산 분자의 미량주사, 합성, 트랜스제닉 및 유전자 활성화된 방법을 포함하여 이들의 합성 또는 제조 방법과는 무관하게 포함해야 한다. 항-CD3 항체의 특이적인 예로는, 항체 분자, 중쇄, 경쇄, 가변 영역, CDR, Fab, scFv, 대안적인 스캐폴드 비-항체 분자, 리간드, 수용체, 펩타이드, 또는 항원에 결합하는 임의의 아미노산 서열 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0051] 용어 "항-CD3 항체" 또는 "항원-결합 폴리펩타이드"는 상기 기재된 바와 같은 항-CD3 항체, 뿐만 아니라 천연-발생 항체의 적어도 하나의 생물학적 활성, 예컨대 비제한적으로 항원 결합 이외의 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 항원 결합 이외의 활성으로는, Fc와 연관된 활성들 중 임의의 하나 이상의 활성이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0052] 항원-결합 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용 가능한 염 및 전구약물, 및 천연-발생 인간 항-CD3 항체의 염, 다형체, 수화물, 용매화물, 생물학적 활성 단편, 생물학적 활성 변이체 및 입체이성질체의 전구약물, 뿐만 아니라 천연-발생 인간 항-CD3 항체의 효능체, 모방체 및 길항체 변이체 및 이들의 폴리펩타이드 융합체를 포함한다. 아미노 말단, 카르복실 말단 또는 두 말단 모두에서 추가 아미노산을 포함하는 융합체는 용어 "항원-결합 폴리펩타이드"에 포함된다. 예시적인 융합체로는 예를 들어, 재조합 밸현으로 인해 항-CD3 항체의 N-말단에 메티오닌이 연결되어 있는 메티오닐 항-CD3 항체, 정제용 융합체(비제한적으로 폴리-히스티딘 또는 친화성 에피토프를 포함함), 항-CD3 항체를 다른 생물학적 활성 분자에 연결하기 위한 융합체, 혈청 일부민 결합 펩타이드와의 융합체, 및 혈청 일부민과 같은 혈청 단백질과의 융합체 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0053] 용어 "항원" 또는 "결합 파트너"는 항-CD3 항체에 의해 나타나는 결합 활성의 표적인 성분을 지칭한다. 사실상 임의의 성분이 항-CD3 항체에 대한 항원 또는 결합 파트너일 수 있다.

[0054] 본 발명의 이중특이적인 항체는 인간화된 SP34 항체 또는 항체 단편을 가진 항-CD3 이중특이적인 항체를 포함한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 160에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 172에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 157에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 129에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 129 및 경쇄의 위치 172에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다.

[0055] 일부 실시형태에서, 본 발명은 중쇄의 위치 204에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 인간화된 SP34 항체를 포함한다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 210에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 191에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 187에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 133에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 114에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 중쇄의 위치 115에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 111에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 115에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 204에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 191에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 인간화된 SP34 항체는 경쇄의 위치 193에 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서,



- [0060] 다양한 참조문헌들이 중합체 컨쥬게이션 또는 글리코실화에 의한 폴리펩타이드의 변형을 개시하고 있다. 용어 "항-CD3 항체" 또는 "항원-결합 폴리펩타이드"로는, 중합체, 예컨대 PEG에 컨쥬게이션된 폴리펩타이드가 있으나 이들로 한정되는 것은 아니며, 시스테인, 라이신, N-말단 또는 C-말단 아미노산, 또는 다른 잔기의 하나 이상의 추가 유도체화로 구성될 수 있다. 또한, 항-CD3 항체는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함할 수 있거나, 라이신 또는 시스테인에 커플링되는 것과 같이 당업계에 공지된 기술을 이용하여 천연적으로 인코딩된 아미노산에 컨쥬게이션될 수 있으며, 여기서, 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자가 컨쥬게이션되는 아미노산은 본 발명에 따른 비-천연 아미노산일 수 있다. 미국 특히 4,904,584는 PEG화된(PEGylated) 라이신-결실 폴리펩타이드를 개시하고 있으며, 여기서, 적어도 하나의 라이신 잔기가 결실되어 있거나 임의의 다른 아미노산 잔기로 대체되어 있다. WO 99/67291은 단백질과 PEG의 컨쥬게이션 방법을 개시하고 있으며, 여기서, 단백질 상의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실되고, 이 단백질이, 단백질에의 컨쥬게이션이 달성되기에 충분한 조건 하에 PEG와 접촉된다. WO 99/03887은 성장 호르몬 슈퍼페밀리에 속하는 폴리펩타이드의 PEG화된 변이체를 개시하고 있으며, 여기서, 시스테인 잔기는 폴리펩타이드의 특정 영역에 위치한 비-필수 아미노산 잔기로 치환되어 있다. WO 00/26354는 알레르기항원성(allergenicity)이 감소된 글리코실화된 폴리펩타이드 변이체의 제조 방법을 개시하고 있으며, 이러한 변이체는 상응하는 부모 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 하나의 추가 글리코실화 부위를 포함한다.
- [0061] 용어 "항원-결합 폴리펩타이드"는 또한, 글리코실화된 항-CD3 항체, 예컨대 비제한적으로 임의의 아미노산 위치에서 글리코실화된 폴리펩타이드, 폴리펩타이드의 N-연결된 또는 O-연결된 글리코실화된 형태를 포함한다. 단일 뉴클레오파이드 변화를 함유하는 변이체가 또한, 항-CD3 항체의 생물학적 활성 변이체로서 간주된다. 마찬가지로, 스플라이스(splice) 변이체가 또한 포함된다. 용어 "항원-결합 폴리펩타이드"는 또한, 화학 수단에 의해 연결되거나 융합 단백질로서 발현되는 임의의 하나 이상의 항-CD3 항체 또는 임의의 다른 폴리펩타이드, 단백질, 탄수화물, 중합체, 저분자, 링커, 리간드, 또는 임의의 유형의 다른 생물학적 활성 분자의 항-CD3 항체 헤테로이량체, 호모이량체, 헤테로다량체 또는 호모다량체, 뿐만 아니라 예를 들어, 특이적인 결실 또는 다른 변형을 함유하지만 생물학적 활성을 여전히 유지하는 폴리펩타이드 유사체를 포함한다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 항원-결합 폴리펩타이드는 항-CD3 항체의 생물학적 활성을 조정하는 첨가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 첨가, 치환 또는 결실은, 비제한적으로 항원에 대한 친화성을 조정하는 것을 포함하여 항-CD3 항체의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조정하거나, 항원 입체형태적 또는 다른 2차, 3차 또는 4차 구조 변화를 조정하거나(비제한적으로 증가시키거나 감소시키는 것을 포함함), 항원 입체형태적 또는 다른 2차, 3차 또는 4차 구조 변화를 안정화시키거나, 항원 입체형태적 또는 다른 2차, 3차 또는 4차 구조 변화를 유도 또는 유발하거나, 순환 반감기를 조정하거나, 치료 반감기를 조정하거나, 폴리펩타이드의 안정성을 조정하거나, 용량을 조정하거나, 방출 또는 생체이용률을 조정하거나, 정제를 촉진하거나, 특정 투여 경로를 개선 또는 변경할 수 있다. 유사하게는, 항원-결합 폴리펩타이드는, 폴리펩타이드의 검출(비제한적으로 GFP를 포함함), 정제 또는 다른 특질(trait)을 개선하는 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 항체-결합 도메인(비제한적으로 FLAG 또는 폴리-His를 포함함), 다른 친화성-기반 서열(비제한적으로 FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함함) 또는 연결된 분자(비제한적으로 비오틴을 포함함)을 포함할 수 있다.
- [0063] 용어 "항원-결합 폴리펩타이드"는 또한, 동일하거나 상이한 비-천연적으로 인코딩된 아미노산 측쇄 또는 천연적으로 인코딩된 아미노산 측쇄에 연결된 항-CD3 항체 호모이량체, 헤테로이량체, 호모다량체 및 헤테로다량체를 포함하며, 비제한적으로 비-천연적으로 인코딩된 아미노산 측쇄를 통해 직접적으로 연결된 것들, 융합으로서 연결된 것들 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 것들을 포함한다. 예시적인 링커로는, 저분자 유기 화합물, 다양한 길이의 수용성 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리헥스트란, 또는 다양한 길이의 폴리펩타이드 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 당업자는, 특정 항원-결합 폴리펩타이드 서열 내 위치에 상응하는 아미노산 위치가 항원-결합 폴리펩타이드 또는 관련된 항원-결합 폴리펩타이드 등의 단편에서 쉽게 식별될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 서열 정렬 프로그램, 예컨대 BLAST가, 관련된 서열 내의 위치에 상응하는 단백질 내의 특정 위치를 정렬하고 식별하는 데 사용될 수 있다.
- [0065] 용어 "항원-결합 폴리펩타이드"는 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드를 포함한다. 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드는 하나 이상의 천연 아미노산의 변형과 함께 하나 이상의 비-천연 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 천연-발생 항-CD3 항체 폴리펩타이드 내의 광범위하게 다양한 아미노산 위치들에서의 예시적인 치환이 기재되어 있으며, 이들 치환으로는, 항원-결합 폴리펩타이드의 하나 이상의 생물학적 활성을 조정하는 치환, 예컨대 비제한적으로 효능제 활성을 증가시키며 폴리펩타이드의 용해성을 증가

시키며 폴리펩타이드를 길항제로 전환시키는 치환 등이 있으나 이들로 한정되는 것은 아니며, 마찬가지로 용어 "항-CD3 항체"에 포함된다.

[0066] "비-천연적으로 인코딩된 아미노산"은 20개의 보편적인 아미노산, 피로라이신 또는 셀레노시스테인 중 어느 것도 아닌 아미노산을 지칭한다. 용어 "비-천연적으로 인코딩된 아미노산"과 동의어로 사용될 수 있는 다른 용어로는, "비-천연 아미노산," "비천연 아미노산," "비-천연-발생 아미노산" 및 이들의 다양하게 하이픈으로 연결된 버전 및 하이픈으로 연결되지 않은 버전이 있다. 용어 "비-천연적으로 인코딩된 아미노산"으로는 또한, 천연적으로 인코딩된 아미노산(비제한적으로 20개의 보편적인 아미노산 또는 피로라이신 및 셀레노시스테인 등을 포함함)의 변형(예를 들어 번역 후 변형)에 의해 발생하지만 그 자체가 천연적으로, 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩타이드 사슬 내로 흔입되지는 않는 아미노산 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 비-천연-발생 아미노산의 예로는, *N*-아세틸글루코사미닐-L-세린, *N*-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 0-포스포티로신 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0067] "아미노 말단 변형 기"는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 유사하게는, "카르복시 말단 변형 기"는 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 말단 변형 기로는, 웨타이드의 혈청 반감기를 증가시키는 다양한 수용성 중합체, 웨타이드 또는 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 또는 다른 모이어티 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0068] 용어 "작용기", "활성 모이어티", "활성화기", "이탈기", "반응성 부위", "화학적 반응성 기" 및 "화학적으로 반응성 모이어티"가 당업계에 사용되고, 본원에서 분자의 별개의, 한정 가능한(definable) 부위 또는 단위를 지칭한다. 이들 용어는 화학 분야에서 다소 동의어이고, 본원에서 일부 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와 반응성인 분자의 일부를 가리키는 데 사용된다.

[0069] 용어 "연결(linkage)" 또는 "링커"는 통상적으로 화학 반응의 결과 형성되는 기 또는 결합을 지칭하는 데 사용되고, 전형적으로 공유 연결이다. 가수분해적으로 안정한 연결은, 이러한 연결이, 예컨대 비제한적으로 생리학적 조건 하에 연장된 기간 동안, 아마도 심지어 무한정으로 물에서 실질적으로 안정하고 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않음을 의미한다. 가수분해적으로 불안정한 또는 분해 가능한 연결은, 연결이 물 또는 예를 들어 혈액을 포함한 수용액에서 분해 가능함을 의미한다. 효소적으로 불안정한 또는 분해 가능한 연결은, 이러한 연결이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있음을 의미한다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, PEG 및 관련 중합체는 중합체 백본 내에, 또는 중합체 백본과 중합체 분자의 하나 이상의 말단 작용기 사이의 링커 기 내에, 분해 가능한 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성제 상에서 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 알코올기의 반응에 의해 형성되는 에스테르 연결은 일반적으로, 제제를 방출하는 생리학적 조건 하에 가수분해된다. 다른 가수분해적으로 분해 가능한 연결로는, 카르보네이트 연결; 아민과 알데하이드의 반응으로 인한 이민 연결; 알코올과 포스페이트기의 반응에 의해 형성되는 포스페이트 에스테르 연결; 하이드라자이드와 알데하이드의 반응 생성물인 하이드라존 연결; 알데하이드와 알코올의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트와 알코올의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; 비제한적으로 PEG와 같은 중합체의 말단에서 웨타이드의 아민기와 카르복실기에 의해 형성되는 웨타이드 연결; 및 비제한적으로 중합체의 말단에서 포스포라미다이트기와 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록실기에 의해 형성되는 올리고뉴클레오타이드 연결 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 분지형 링커는 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드에 사용될 수 있다.

[0070] 본원에 사용되는 경우, 용어 "생물학적 활성 분자", "생물학적 활성 모이어티" 또는 "생물학적 활성제"는, 비제한적으로 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포존, 프리온, 곤충, 진균류, 식물, 동물 및 인간을 포함한 유기체와 관련하여 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 임의의 성분을 의미한다. 특히, 본원에 사용된 바와 같이, 생물학적 활성 분자로는, 인간 또는 다른 동물에서 질병을 진단, 치유, 경감, 치료 또는 예방하거나, 그렇지 않다면 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 안녕(well-being)을 증강시키고자 하는 임의의 성분 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 생물학적 활성 분자의 예로는, 웨타이드, 단백질, 효소, 저분자 약물, 경질 약물(hard drug), 연질 약물(soft drug), 염료, 지질, 뉴클레오사이드, 올리고뉴클레오타이드, 독소, 세포, 바이러스, 리포좀, 미세입자(microparticle) 및 미셀(micelle) 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 사용하기에 적합한 생물학적 활성제 부류로는, 약물, 전구약물, 방사성 핵종, 이미징제(imaging agent), 중합체, 항생제, 살진균제, 항바이러스제, 항염증제, 항종양제, 심혈관제, 항불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제, 미생물 유래 독소 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 항-CD3 항체는 생체내 전달 및 약물동력학적 프로파일을 개선하기 위해 PEG와 같은 분자에 컨쥬제이

션될 수 있다. Leong 등은, 항-IL-8 항체의 Fab' 단편의 부위-특이적인 PEG화를 기재하고 있으며, 이것은 비-PEG화된 형태보다 청소율(clearance rate)은 감소되어 있고 항원 결합 활성의 손실은 거의 없거나 전혀 없다(문헌[Leong, S.R. et al. (2001) *Cytokine* 16:106-119]).

[0072] 다수의 상이한 절단 가능한 링커들이 당업자에게 공지되어 있다. 미국 특허 4,618,492; 4,542,225 및 4,625,014를 참조한다. 이들 링커기로부터 제제를 방출시키는 메커니즘으로는 예를 들어, 광 불안정한(photolabile) 결합에의 조사(irradiation) 및 산-촉매화된 가수분해가 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,671,958은 생체 내에서 환자의 보체 시스템의 단백질 분해(proteolytic) 효소에 의해 표적 부위에서 절단되는 링커를 포함하는 면역컨쥬게이트에 대한 설명을 포함하고 있다. 링커의 길이는 항-CD3 항체와, 이 항체에 연결되는 분자 사이의 요망되는 공간적 관계에 따라 예정되거나 선택될 수 있다. 다양한 방사선진단 화합물, 방사선치료 화합물, 약물, 독소 및 다른 제제를 항체에 부착시키는 것으로 보고된 많은 방법들을 고려하여, 당업자는 주어진 제제를 항-CD3 항체 또는 다른 폴리펩타이드에 부착시키는 데 적합한 방법을 결정할 수 있을 것이다.

[0073] "2작용성 중합체"는, 다른 모이어티(비제한적으로 아미노산 측기를 포함함)와 특이적으로 반응하여 공유 또는 비공유 연결을 형성할 수 있는 2개의 별개의 작용기들을 포함하는 중합체를 지칭한다. 특정한 생물학적 활성 구성성분 상의 기와 반응성이 하나의 작용기, 및 제2의 생물학적 구성성분 상의 기와 반응성이 또 다른 기를 갖는 2작용성 링커가 사용되어, 제1 생물학적 활성 구성성분, 2작용성 링커 및 제2 생물학적 활성 구성성분을 포함하는 컨쥬게이트가 형성될 수 있다. 다양한 화합물들을 펩타이드에 부착시키기 위한 많은 절차들 및 링커 분자들이 공지되어 있다. 예를 들어, 유럽 특허 출원 188,256; 미국 특허 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789; 및 4,589,071을 참조하며, 이들은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. "다작용성 중합체"는 다른 모이어티들(비제한적으로 아미노산 측기를 포함함)과 특이적으로 반응하여 공유 또는 비공유 연결을 형성할 수 있는 2개 이상의 별개의 작용기들을 포함하는 중합체를 지칭한다. 2작용성 중합체 또는 다작용성 중합체는 임의의 요망되는 분자 길이 또는 분자량을 가질 수 있으며, 항-CD3 항체에 연결되는 분자들 중 하나 사이에서 특정한 요망되는 공간 또는 입체형태를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "수용성 중합체"는 수성 용매 내에서 용해성이 임의의 중합체를 지칭한다. 수용성 중합체가 항-CD3 항체에 연결되면, 비제한적으로, 비변형된 형태와 비교하여 증가되거나 조정된 혈청 반감기 또는 증가되거나 조정된 치료 반감기, 조정된 면역원성, 조정된 물리적 연관 특징, 예컨대 응집(aggregation) 및 다량체 형성, 변경된 수용체 결합 및 변경된 수용체 이량체화 또는 다량체화를 포함한 변화들이 초래될 수 있다. 수용성 중합체는 그 자체가 생물학적 활성을 가질 수 있거나 가질 수 없으며, 항-CD3 항체를 비제한적으로 하나 이상의 항-CD3 항체 또는 하나 이상의 생물학적 활성 분자를 포함하여 다른 성분에 부착시키기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적합한 중합체로는, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드, 모노C1-C10 알콕시 또는 이의 아릴옥시 유도체(원용에 의해 본 명세서에 포함된 미국 특허 5,252,714 참조), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아미노산, 다이비닐에테르 말레산 무수불, N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아미드, 텍스트란, 텍스트란 설페이트를 포함하여 텍스트란 유도체, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 폴리당류, 올리고당류, 글리칸, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 예컨대 비제한적으로 메틸셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스, 전분 및 전분 유도체, 폴리펩타이드, 폴리알킬렌 글리콜 및 이의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 이의 유도체, 폴리비닐 에틸 에테르 및 알파-베타-폴리[(2-하이드록시에틸)-DL-아스파르타미드 등 또는 이들의 혼합물 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 수용성 중합체의 예로는, 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리알킬렌 글리콜" 또는 "폴리(알켄 글리콜)"은 폴리에틸렌 글리콜 (폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜 및 이의 유도체를 지칭한다. 용어 "폴리알킬렌 글리콜"은 평균 분자량이 0.1 kDa 내지 100 kDa인 선형 및 분지형 중합체를 둘 다 포함한다. 다른 예시적인 실시형태들은 예를 들어 상업적인 공급업체의 카탈로그, 예컨대 Shearwater Corporation의 카탈로그 "생의학적 적용을 위한 폴리에틸렌 글리콜 및 유도체"(2001)에 열거되어 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조정된 혈청 반감기"는 비-변형된 형태의 항체와 비교하여 변형된 항-CD3 항체의 순환 반감기의 양성 또는 음성 변화를 의미한다. 혈청 반감기는 항-CD3 항체의 투여 후 다양한 시점에서 혈액 시료를 채혈하고, 각각의 시료 내 해당 분자의 농도를 확인함으로써 측정된다. 혈청 농도와 시간과의 상관관계에 의해 혈청 반감기를 계산할 수 있다. 증가된 혈청 반감기는 요망되게는, 적어도 약 2배를 갖지만, 예를 들어 만족할 만한 투약 섭생을 가능하게 하거나 독성 효과를 피하는 경우 더 작은 증가도 유용할 수 있다. 일부

실시형태에서, 증가는 적어도 약 3배, 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배이다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조정된 치료 반감기"는 비-변형된 형태의 항체와 비교하여, 치료적 유효량의 항-CD3 항체 또는 변형된 생물학적 활성 분자를 포함하는 항-CD3 항체의 반감기의 양성 또는 음성 변화를 의미한다. 치료 반감기는 투여 후 다양한 시점에서 분자의 약물동력학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 증가된 치료 반감기는 요망되게는, 특정한 유익한 투약 섭생, 특정한 유익한 총 용량을 가능하게 하거나, 요망되지 않는 효과를 피한다. 일부 실시형태에서, 증가된 치료 반감기는 증가된 약효(potency), 변형된 분자의 이의 표적에 대한 증가되거나 감소된 결합, 또는 비-변형된 분자의 작용의 또 다른 파라미터 또는 메커니즘의 증가 또는 감소로 인한 것이다.

[0078] 용어 "단리된"은 핵산 또는 단백질에 적용되는 경우, 핵산 또는 단백질에, 천연 상태에서는 연관이 있는 다른 세포성 구성성분이 실질적으로 없음을 의미한다. 이는 균질한 상태로 존재할 수 있다. 단리된 성분은 견조 또는 반건조 상태이거나, 비제한적으로 수용액을 포함하여 용액으로 존재할 수 있다. 순도 및 균질성은 전형적으로, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석용 화학 기술을 사용하여 확인된다. 조제물에 존재하는 주요한 화학종(species)인 단백질이 실질적으로 정제된다. 특히, 단리된 유전자는, 이러한 유전자의 측면에 존재하고 관심 유전자 이외의 단백질을 인코딩하는 개방형 해독틀로부터 분리된다. 용어 "정제된"은, 핵산 또는 단백질이 전기영동 젤에서 실질적으로 하나의 밴드를 발생시킴을 의미한다. 특히, 이는, 핵산 또는 단백질이 적어도 85% 순수, 적어도 90% 순수, 적어도 95% 순수, 적어도 99% 또는 그 이상으로 순수함을 의미한다.

[0079] 용어 "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오사이드, 리보뉴클레오사이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 종합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이러한 용어는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함하며, 이러한 핵산은 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 가지고, 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사된다. 구체적으로 다르게 제한되지 않는 한, 이러한 용어는 또한, PNA(펩ти드핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA의 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 포함하여 올리고뉴클레오타이드 유사체를 지칭한다. 다르게 지시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한, 이의 보존적으로 변형된 변이체(비제한적으로 축퇴(degenerate) 코돈 치환을 포함함) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명백하게 지시된 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은, 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 발생시킴으로써 달성될 수 있다(문헌[Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).

[0080] 용어 "폴리펩타이드," "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호호환적으로 사용된다. 즉, 폴리펩타이드에 관한 설명은 웨프타이드의 설명 및 단백질의 설명에 동등하게 적용되고, 그 반대로 적용된다. 이러한 용어는 천연 발생 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-천연적으로 인코딩된 아미노산인 아미노산 중합체에 적용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 이러한 용어는 전장 단백질(즉, 항원)을 포함하여 임의의 아미노산 사슬을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 공유 웨프타이드 결합에 의해 연결된다.

[0081] 용어 "아미노산"은 천연 발생 및 비-천연 발생 아미노산, 뿐만 아니라 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 천연적으로 인코딩된 아미노산은 20개의 보편적인 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린), 및 피로라이신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본적 화학 구조를 가진 화합물, 즉 수소, 카르복실기, 아미노기 및 R 기에 결합된 a 탄소를 가진 화합물, 예컨대 호모세린, 노르루신, 메티오닌 설포사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예컨대 노르루신) 또는 변형된 웨프타이드 백본을 가지지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본적 화학 구조를 보유한다.

[0082] 본원에서 아미노산들은 이들의 보편적으로 공지된 3글자 기호, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에 의해 권고된 1글자 기호에 의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오타이드들은 이들의 보편적으로 허용된 단일 글자 코드에 의해 지칭될 수 있다.

[0083] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 다에 적용된다. 특정 핵산 서열과 관련하여, "보존적으로 변형된 변이체"는, 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 지칭하거나, 핵산이 아미노산 서열을 인코딩하지 않는 경우 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴성때문에,

다수의 기능적으로 동일한 핵산들이 임의의 주어진 단백질을 인코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 인코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 명시되는 모든 위치에서, 코돈은, 인코딩되는 폴리펩타이드를 변경시키지 않으면서, 상응하는 기재된 코돈들 중 임의의 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이"이며, 보존적으로 변형된 변이들 중 하나의 화학종이다. 본원에서 폴리펩타이드를 인코딩하는 모든 핵산 서열은 또한, 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기재하고 있다. 당업자는, 핵산 내 각각의 코돈(통상 메티오닌에 대한 유일한 코돈이 AUG, 및 통상 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 예외로 함)이 기능적으로 동일한 문자를 제공하도록 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 이에, 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산의 침묵 변이는 각각의 기재된 서열에 함축되어 있다.

[0084] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는, 인코딩된 서열 내 단일 아미노산 또는 작은 퍼센트의 아미노산을 변경하거나, 첨가하거나 결실시키는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 첨가가, 이러한 변경이 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키는 경우 "보전적으로 변형된 변이체"임을 인지할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 잘 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 부가되고, 본 발명의 다형체성 변이체, 종간 호모로그(interspecies homolog) 및 대립유전자를 배제하지 않는다.

[0085] 하기 8개의 그룹들은 각각, 서로 보존적 치환인 아미노산을 함유한다:

[0086] 1) 알라닌(A), 글리신(G);

[0087] 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0088] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0089] 4) 아르기닌(R), 라이신(K);

[0090] 5) 이소루신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V);

[0091] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W);

[0092] 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및

[0093] 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)

[0094] (예를 들어, 문헌[Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)] 참조)

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "피험자"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상체인 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간을 지칭한다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량"은 치료를 받는 질병, 질환 또는 장애의 증상을 중 하나 이상을 어느 정도 구제(relieve)할, 투여되는 (변형된) 비-천연 아미노산 폴리펩타이드의 양을 지칭한다. 본원에 기재된 (변형된) 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 예방, 증강 및/또는 치료적 치료를 위해 투여될 수 있다.

[0097] 용어 "증강시키다" 또는 "증강시키는"은, 요망되는 효과를 약효 또는 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 것을 의미한다. 따라서, 치료제의 효과를 증강시키는 것과 관련하여, 용어 "증강시키는"은 시스템 상의 다른 치료제의 효과를 약효 또는 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 능력을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, "증강-유효량(enhancing-effective amount)"은 요망되는 시스템 내의 또 다른 치료제의 효과를 증강시키기에 알맞은 양을 지칭한다. 환자에서 사용되는 경우, 이러한 용도에 효과적인 양은 질병, 장애 또는 질환의 증증도 및 경과, 과거 치료법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 주치의의 판단에 따라 다를 것이다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변형된"은 폴리펩타이드 상에서의 번역 후 변형의 존재를 지칭한다. "(변형된)"이라는 형태의 용어는, 고찰중인 폴리펩타이드가 선택적으로 변형됨, 즉 고찰의 폴리펩타이드가 변형되거나 또는 비변형될 수 있음을 의미한다.

[0099] 용어 "번역 후 변형된" 및 "변형된"은, 아미노산이 폴리펩타이드 사슬 내에 혼입된 후 이러한 아미노산에 발생하는 천연 또는 비-천연 아미노산의 임의의 변형을 지칭한다. 이러한 용어는 오로지 예로서, 공동번역적(co-translational) 생체내 변형, 번역 후 생체내 변형 및 번역 후 시험관내 변형을 포함한다.

[0100] 치료적 적용에서, (변형된) 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 이미 질병, 질환 또는 장애를

앓고 있는 환자에게, 이러한 질병, 장애 또는 질환의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 억제시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "치료적 유효량"으로 정의되고, 질병, 장애 또는 질환의 중증도 및 경과, 과거 치료법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 주치의의 판단에 따라 다를 것이다. 당업자는, 이러한 치료적 유효량을 일상적인 실험(예를 들어 용량 증가 임상 시험)에 의해 결정하는 것으로 잘 간주된다.

[0101] 용어 "치료하는"은 예방적 및/또는 치료적 치료를 지칭하는 데 사용된다.

[0102] 다르게 지시되지 않는 한, 당업계의 질량 분광학, NMR, HPLC, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약물학의 종래의 방법들이 이용된다.

[0103] 상세한 설명

#### 도입부

적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체 분자가 본 발명에 제공된다. 본 발명의 소정의 실시형태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산을 가진 항-CD3 항체는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 번역 후 변형은, 비제한적으로 제2 반응성 기를 포함하는 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 약물, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 생물학적 활성체, 저분자, 또는 상기 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 성분들의 임의의 조합을 포함하는 분자를, 제1 반응성 기를 포함하는 적어도 하나의 비천연 아미노산에, 특정 반응성 기에 적합한 것으로 당업자에게 공지된 화학 방법을 이용하여 부착시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 제1 반응성 기는 알키닐 모이어티(비제한적으로, 비천연 아미노산 *p*-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하며, 여기서 프로파길기는 또한 이따금 아세틸렌 모이어티로 지칭됨)이며, 제2 반응성 기는 아지도 모이어티이고, [3+2] 고리첨가 화학 방법이 이용된다. 또 다른 예에서, 제1 반응성 기는 아지도 모이어티(비제한적으로, 비천연 아미노산 *p*-아지도-L-페닐알라닌을 포함함)이고, 제2 반응성 기는 알키닐 모이어티이다. 본 발명의 변형된 항-CD3 항체 폴리펩타이드의 소정의 실시형태에서, 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하는 적어도 하나의 비천연 아미노산(비제한적으로, 케토 작용기를 함유하는 비천연 아미노산을 포함함)이 사용되며, 여기서, 적어도 하나의 번역 후 변형은 당류 모이어티를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 번역 후 변형은 생체내에서는 진핵 세포 또는 비-진핵 세포 내에서 수행된다.

[0106] 표 1은 본 발명의 항-CD3 항체의 가변 경쇄 서열을 포함하는 신규의 인간화된 가변 중쇄, 가변 경쇄 및 가변 중쇄의 목록을 포함한다.

## 표 1

서열 번호: VH/VL/둘 다	아미노산 서열
1 VH	Evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvgrirkynnyatyyadsvkdrftis rddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss
2 VH	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvarirkynnyatyyadsvkdrftis ddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss
3 VH	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvarirkynnyatyyadsvkdrftis ddsknilylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss
4 VL	qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwfqqkpgqaprtliygtnkrapwtparfsgsllggkaaltl sgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
5 VL	qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprgliggtnkrapgvparfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
6 VL	qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprgliggtnkrapgtarfsgsllggkaaltl sgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
7	Evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvgrirkynnyatyyadsvkdrftis rddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwfqqkpgqaprtliygtnkrapwtparfsgsllggkaaltl sgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
8	Evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvgrirkynnyatyyadsvkdrftis rddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprgliggtnkrapgvparfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
9	Evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvgrirkynnyatyyadsvkdrftis rddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwfqqkpgqaprgliggtnkrapgtarfsgsllggkaaltl sgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg
10	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvarirkynnyatyyadsvkdrftis ddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwfqqkpgqaprtliygtnkrapwtparfsgsllggkaaltl sgaqpedeaeyycalwysnlwvfgggtkltvlg

11	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvariskynnyatyyadsvkdrftisr ddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprliggnkrapgvparsfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfggkltvlg
12	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvariskynnyatyyadsvkdrftisr ddsknslylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprliggnkrapgvparsfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfggkltvlg
13	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvariskynnyatyyadsvkdrftisr ddsknilylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprliggnkrapgvparsfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfggkltvlg
14	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvariskynnyatyyadsvkdrftisr ddsknilylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprliggnkrapgvparsfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfggkltvlg
15	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfntyamnwvrqapgkglewvariskynnyatyyadsvkdrftisr ddsknilylqmnslktedtavyycvrhgnfgnsyvswfaywgqgtlvtvss qavvtqepsltvspggtvltcrsstgavttsnyanwvqqkpgqaprliggnkrapgvparsfsgsllggkaaltl lsgaqpedeaeyycalwysnlwvfggkltvlg

[0108]

항원-결합 폴리펩타이드 및 저분자는 링커, 중합체 또는 공유 결합에 의해 연결될 수 있다. 링커, 중합체 또는 저분자는 그 자체가, 20개의 보편적인 아미노산에 대해 비반응성인 작용기를 포함할 수 있다. 링커 또는 중합체는 2작용성일 수 있다. 링커, 중합체 또는 공유 결합을 통해 항원-결합 폴리펩타이드를 생물학적 활성 분자에 접합시키는 데 관여하는 하나 이상의 결합은 요망되는 조건 하에 비가역적, 가역적 또는 불안정할 수 있다. 링커, 중합체 또는 공유 결합을 통해 항원-결합 폴리펩타이드를 분자에 접합시키는 데 관여하는 하나 이상의 결합은 항원-결합 폴리펩타이드 또는 다른 분자의 조정된 방출을 가능하게 할 수 있다. 다양한 저분자들이 당업자에 의해 화학적 수단, 천연 생성물로서의 단리, 또는 다른 수단들에 의해 생성될 수 있다.

[0109]

본원에 원용에 의해 포함된 문헌[Rader et al. in Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5396-400]은 합성 저분자와 일반(generic) 항체 분자와의 반응을 통해 이러한 합성 저분자에 효과기 기능 및 연장된 혈청 반감기를 제공하는 방법을 기재하고 있다. 기재된 복합체는, 천연 알돌라제 효소를 모방하는 촉매적 항체인 mAb 38C2와, 이러한 항체 상의 반응성 라이신 잔기를 통해 Arg-Gly-Asp 펩티도 모방체를 표적으로 하는 인테그린의 다이케톤 유도체 사이의 가역적인 공유 결합에 의해 생성되었다. 펩티도 모방체의 반감기를 증가시키는 것 외에도, 복합체는 인테그린  $\alpha_v\beta_3$  및  $\alpha_v\beta_5$  발현 세포의 표면에 대한 항체의 선택적인 재표적화를 보여주었다.

[0110]

본 발명은 적어도 하나의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드 또는 항-CD3 항체를 기반으로 한 방법 및 조성물을 제공한다. 적어도 하나의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산이 항-CD3 항체 내에 도입되면, 비제한적으로, 20개의 천연 발생 아미노산과는 반응하지 않으면서 하나 이상의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산과의 반응을 포함하여 특이적인 화학 반응에 관여하는 컨쥬게이션 화학이 적용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산의 측쇄를 통해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 수용성 중합체에 연결된다. 본 발명은, 20개의 천연적으로 혼입되는 아미노산에서 확인되지 않는 작용기 또는 치환기, 예컨대 비제한적으로 케톤, 아자이드 또는 아세틸렌 모이어티를 함유하는 아미노산을 비제한적으로 포함하는 비-유전학적으로 인코딩된 아미노산을 선택자 코돈에 반응하여 단백질 내로 선택적으로 혼입하는 단계 및 이들 아미노산을 적합하게 반응성인 PEG 유도체를 이용하여 후속적으로 변형시키는 단계를 포함하는, PEG 유도체를 이용한 단백질의 선택적인 변형을 위한 고도로 효율적인 방법을 제공한다. 그런 다음, 아미노산 측쇄는 일단 혼입되고 나면, 천연적으로 인코딩된 아미노산에 존재하는

특정 작용기 또는 치환기에 적합한 것으로 당업자에게 공지된 화학 방법을 이용하여 변형될 수 있다. 광범위하게 다양한 공지된 화학 방법들이 본 발명에서 수용성 중합체를 단백질 내에 흔입하는 데 사용되기에 적합하다. 이러한 방법으로는, 비제한적으로 각각 아세틸렌 또는 아자이드 유도체를 이용한 Huisgen [3+2] 고리첨가 반응 (예를 들어 문헌[Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; 및 Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176]) 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0112] Huisgen [3+2] 고리첨가 방법이 친핵성 치환 반응보다는 고리첨가에 관여하기 때문에, 단백질은 극도로 높은 선택성에 의해 변형될 수 있다. 이러한 반응은 실온에서 수성 조건 하에, 촉매량의 Cu(I) 염을 반응 혼합물에 첨가함으로써 우수한 위치선택성(regioselectivity)(1.4 > 1.5)으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tornoe, et al., (2002) Org. Chem. 67:3057-3064; 및 Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599]; 및 WO 03/101972를 참조한다. [3+2] 고리첨가를 통해 본 발명의 단백질에 첨가될 수 있는 분자로는 사실상, 비제한적으로 아지도 또는 아세틸렌 유도체를 포함하는 적합한 작용기 또는 치환기를 가진 임의의 분자가 있다. 이들 분자는 각각, 비제한적으로 p-프로파길옥시페닐알라닌을 포함하는 아세틸렌기, 또는 비제한적으로 p-아지도-페닐알라닌을 포함하는 아지도기를 가진 비천연 아미노산에 첨가될 수 있다.

[0113] Huisgen [3+2] 고리첨가로 인한 5원 고리는 일반적으로 환원 환경에서는 가역적이지 않고, 수성 환경에서는 연장된 기간 동안 가수분해에 대해 안정하다. 결과적으로, 광범위하게 다양한 성분들의 물리적 및 화학적 특징들은 요구하는 수성 조건 하에, 본 발명의 활성 PEG 유도체에 의해 변형될 수 있다. 보다 더 중요하게는, 아자이드 및 아세틸렌 모이어티가 서로 특이적이기 때문에(예를 들어 20개의 보편적인 유전적으로-인코딩된 아미노산들 중 임의의 아미노산과 반응하지 않음), 단백질은 하나 이상의 특이적인 부위에서 극도로 높은 선택성으로 변형될 수 있다.

[0114] 본 발명은 또한, PEG 유도체, 및 하나 이상의 아세틸렌 또는 아자이드 모이어티를 가진 관련된 친수성 중합체의 수용성이고 가수분해적으로 안정한 유도체를 제공한다. 아세틸렌 모이어티를 함유하는 PEG 중합체 유도체는, 선택자 코돈에 반응하여 단백질 내에 선택적으로 도입된 아자이드 모이어티와 커플링하기에 고도로 선택적이다. 유사하게는, 아자이드 모이어티를 함유하는 PEG 중합체 유도체는, 선택자 코돈에 반응하여 단백질 내에 선택적으로 도입된 아세틸렌 모이어티와 커플링하기에 고도로 선택적이다.

[0115] 보다 구체적으로, 아자이드 모이어티로는 알킬 아자이드, 아릴 아자이드 및 이들 아자이드들의 유도체 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 알킬 및 아릴 아자이드의 유도체는, 아세틸렌-특이적인 반응성이 유지되는 한, 다른 치환기를 포함할 수 있다. 아세틸렌 모이어티는 알킬 아세틸렌 및 아릴 아세틸렌 및 이들 각각의 유도체를 포함한다. 알킬 아세틸렌 및 아릴 아세틸렌의 유도체는, 아자이드-특이적인 반응성이 유지되는 한, 다른 치환기를 포함할 수 있다.

[0116] 따라서, 항-CD3 항체는 표적 분자 또는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 나타내는 임의의 폴리펩타이드를 포함하고자 한다. 임의의 공지된 항체 또는 항체 단편은 항-CD3 항체이다.

[0117] 본 발명의 항-CD3 항체는 Fc 영역 또는 Fc-유사 영역을 포함할 수 있다. Fc 도메인은 보체 또는 포식 세포와 같은 효과기 기능에의 연결(link)을 제공한다. 면역글로불린의 Fc 부분은 장기간의 혈장 반감기를 가지는 반면, Fab는 수명이 짧다(문헌[Capon, et al. (1989), *Nature*, 337:525-531]). Fc 도메인은 치료용 단백질과 함께 구축되는 경우, 더 장기간의 반감기를 제공하거나, Fc 수용체 결합, 단백질 A 결합, 보체 고정 및 아마도 심지어 태반 이동(placental transfer)과 같은 기능을 통합할 수 있다. 예를 들어, IgG1 항체의 Fc 영역은 호지킨병 종양 세포, 역형성 림프종(anaplastic lymphoma) 세포, T-세포 백혈병 세포 및 다른 악성 세포 유형 상에서 발현되는 CD30 수용체에 결합하는 분자인 CD30-L의 N-말단에 융합되어 왔다(미국 특허 5,480,981). 사이토카인의 짧은 순환 반감기를 증가시키기 위해, 항염증 및 항거부반응(antirejection) 제제인 IL-10이 뮤린 Fc $\gamma$ 2a에 융합되어 왔다(문헌[Zheng, X. et al. (1995), *The Journal of Immunology*, 154: 5590-5600]). 연구들은 또한, 패혈 쇼크(septic shock)(문헌[Fisher, C. et al., *N. Engl. J. Med.*, 334: 1697-1702 (1996); Van Zee, K. et al., *The Journal of Immunology*, 156: 2221-2230 (1996)]) 및 류마티스 관절염(문헌[Moreland, et al. (1997), *N. Engl. J. Med.*, 337(3):141-147])을 가진 환자를 치료하기 위해 인간 IgG1의 Fc 단백질과 연결된 종양 괴사 인자 수용체의 용도를 평가하였다. Fc는 또한, AIDS의 치료를 위한 치료용 단백질을 생성하기 위해 CD4 수용체와 융합되어 왔다(문헌[Capon et al. (1989), *Nature*, 337:525-531]). 또한, 인터루킨 2의 N-말단 또한, 인터루킨 2의 짧은 반감기 및 이의 전신 독성을 극복하기 위해 IgG1 또는 IgG3의 Fc 부분에 융합되어 왔다(문헌[Harvill et al. (1995), *Immunotechnology*, 1: 95-105]).

[0118]

항체의 Fc 영역은, 이황화 결합 또는 비공유 결합에 의해 이량체 형태 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체성 폴리펩타이드 절편으로 구성되는 것으로 잘 공지되어 있다. 본래의 Fc 분자의 단량체성 하위단위들 사이에서 분자간 이황화 결합의 수는 관여하는 항체의 부류(예를 들어 IgG, IgA, IgE) 또는 하위부류(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2)에 따라 1 내지 4의 범위이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "Fc"는 단량체, 이량체 및 다량체 형태의 Fc 분자에 일반적(generic)이다. 이황화 결합 형성을 통한 이량체화를 방지하는 특정한 조건이 존재하지 않는 한, 적절한 Cys 잔기들이 존재할 때 Fc 단량체들은 자발적으로 이량체화할 것임을 주지해야 한다. Fc 이량체에서 통상적으로 이황화 결합을 형성하는 Cys 잔기들이 제거되거나 다른 잔기에 의해 대체되는 경우에도, 단량체 사슬들은 일반적으로 비공유 상호작용을 통해 이량체화할 것이다. 본원에서 용어 "Fc"는 이들 형태들 중 임의의 형태를 의미하는 데 사용된다: 본래의 단량체, 본래의 이량체(이황화 결합 연결된), 변형된 이량체(이황화 및/또는 비공유 연결된) 및 변형된 단량체(즉, 유도체).

[0119]

Fc 부분의 변이체, 유사체 또는 유도체는 예를 들어, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 형성함으로써 구축될 수 있다. 변이체(또는 유사체) 폴리펩타이드는 삽입 변이체를 포함하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기가 Fc 아미노산 서열에 보충된다. 삽입은 단백질의 어느 한 말단 또는 양 말단 모두에 위치할 수 있거나, Fc 아미노산 서열의 내부 영역 내에 위치할 수 있다. 어느 한 말단 또는 양 말단 모두에 추가 잔기를 가진 삽입 변이체는 예를 들어, 융합 단백질, 및 아미노산 태그 또는 표지(label)를 포함하는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fc 분자는 선택적으로, N-말단 Met을 함유할 수 있으며, 특히 상기 문자가 이. 콜라이와 같은 박테리아 세포 내에서 재조합적으로 발현되는 경우에 그러하다. Fc 결실 변이체에서, Fc 폴리펩타이드 내 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거된다. 결실은 Fc 폴리펩타이드의 어느 한 말단 또는 양 말단 모두에서 수행될 수 있거나, Fc 아미노산 서열 내의 하나 이상의 잔기가 제거될 수 있다. 따라서, 결실 변이체는 Fc 폴리펩타이드 서열의 모든 단편들을 포함한다. Fc 치환 변이체에서, Fc 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고, 대안적인 잔기로 대체된다. 일 양태에서, 치환은 사실상 보존적이지만, 본 발명은 비-보존적이기도 한 치환을 포함한다. 예를 들어, Fc 서열의 일부 또는 모든 이황화 가교의 형성을 방지하기 위해, 시스테인 잔기가 결실되거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 단백질은 하나 이상의 시스테인 잔기를 가질 수 있고, 당업자는 이를 시스테인 잔기들을 각각 제거할 수 있거나 하나 이상의 이러한 시스테인 잔기를 다른 아미노산, 예컨대 Ala 또는 Ser, 또는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산으로 치환할 수 있다. 또 다른 예로서, 변형은 또한, (1) Fc 수용체 결합 부위를 제거하거나; (2) 보체(Clq) 결합 부위를 제거하거나; 및/ 또는 (3) 항체 의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 부위를 제거하기 위해, 아미노산 치환을 도입하도록 형성될 수 있다. 이러한 부위는 당업계에 공지되어 있고, 임의의 공지된 치환은 본원에 사용되는 바와 같이 Fc의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, IgG1에서의 ADCC 부위에 대해서는 문헌[Molecular Immunology, Vol. 29, No. 5, 633-639 (1992)]를 참조한다. 마찬가지로, 하나 이상의 티로신 잔기가 마찬가지로 페닐알라닌 잔기에 의해 대체될 수 있다. 또한, 다른 변이체 아미노산 삽입, 결실(예를 들어 1개 내지 25개의 아미노산) 및/또는 치환이 또한 고려되고, 본 발명의 범위 내에 포함된다. 보존적 아미노산 치환이 일반적으로 바람직하다. 더욱이, 변경은 변경된 아미노산 형태, 펩티도 모방체 또는 D-아미노산으로 존재할 수 있다.

[0120]

Fc 서열은 또한, 유도체화(derivatization)될 수 있으며, 즉 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환 이외의 변형을 가질 수 있다. 바람직하게는, 변형은 사실상 공유이고, 예를 들어 중합체, 지질, 다른 유기 모이어티 및 무기 모이어티와의 화학적 결합을 포함한다. 본 발명의 유도체는 순환 반감기를 증가시키도록 제조될 수 있거나, 폴리펩타이드를 요망되는 세포, 조직 또는 기관까지 표적화시키는 능력을 개선하도록 디자인될 수 있다. 또한, 예컨대 "반감기가 증가된 변경된 폴리펩타이드(Altered Polypeptides with Increased Half-Life)"라는 명칭의 WO 96/32478에 기재된 바와 같이, 온전한 Fc 분자의 구제 수용체(salvage receptor) 결합 도메인을 본 화합물의 Fc 파트로서 사용하는 것이 가능하다. 본원에서 Fc로서 지정된 부류의 분자의 추가 구성 원은 "반감기가 증가된 면역글로불린-유사 도메인(Immunoglobulin-Like Domains with Increased Half-Lives)"이라는 명칭의 WO 97/34631에 기재된 것들이다. 이 단락에서 인용된 공개 PCT 출원들은 둘 다 원용에 의해 본 명세서에 포함되어 있다.

[0121]

일 실시형태에서, 비천연 아미노산(예컨대 p-(프로파길옥시)-페닐알라닌)을 포함하는 항-CD3 항체의 조성물이 제공된다. p-(프로파길옥시)-페닐알라닌을 포함하고 비제한적으로 단백질 및/또는 세포를 포함하는 다양한 조성물들이 또한 제공된다. 일 양태에서, p-(프로파길옥시)-페닐알라닌 비천연 아미노산을 포함하는 조성물은 오르토고날(orthogonal) tRNA를 추가로 포함한다. 비천연 아미노산은, 비제한적으로 아미노-아실 결합을 통해 오르토고날 tRNA에 공유 결합되는 것, 오르토고날 tRNA의 말단 리보스 당, 트레실레이트, 알켄 및 케톤의 3'OH 또는 2'OH에 공유 결합되는 것을 포함하여 오르토고날 tRNA에 결합(비제한적으로 공유 결합을 포함함)될 수 있다.

**[0122] 항-CD3 항체 활성, 및 항-CD3 항체 항원 또는 결합 파트너에 대한 항-CD3 항체의 친화성의 측정**

항-CD3 항체 활성은 표준 시험관내 또는 생체내 검정법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 항-CD3 항체에 결합하는 세포 또는 세포주(비제한적으로 본래의 항-CD3 항체 항원 또는 결합 파트너를 함유하는 세포, 또는 재조합 항-CD3 항체 항원 또는 결합 파트너를 생성하는 세포를 포함함)는 항-CD3 항체 결합을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 비-천연 아미노산을 포함하는 비-PEG화된 또는 PEG화된 항원-결합 폴리펩타이드의 경우, 항원 또는 결합 파트너에 대한 항-CD3 항체의 친화성은 당업계에 공지된 기술, 예컨대 BIACore의 바이오센서 (Pharmacia)를 사용함으로써 측정될 수 있다.

항-CD3 항체를 생성하는 데 어떤 방법이 사용되는지와는 무관하게, 항-CD3 항체는 생물학적 활성 검정법으로 처리된다. 삼중수소의(tritiated) 티미딘 검정법은 적절하다면 세포 분열도를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 그러나, 다른 생물학적 검정법들도 요망되는 활성의 확인에 사용될 수 있다. 예컨대 항원의 생물학적 활성, 예컨대 효소, 중식 또는 대사 활성을 저해하는 능력을 측정하는 생물학적 검정법 또한, 항-CD3 항체 활성의 지표(indication)를 제공한다. 다른 시험관내 검정법은 생물학적 활성의 확인에 사용될 수 있다. 일반적으로, 생물학적 활성 시험은 요망되는 결과에 대한 분석, 예컨대 항원의 생물학적 활성에 적절하다면, (비-변경된 항-CD3 항체와 비교하여) 생물학적 활성의 증가 또는 감소, (비-변경된 항-CD3 항체와 비교하여) 상이한 생물학적 활성, 수용체 친화성 분석, 입체형태적 또는 구조적 변화, 또는 혈청 반감기 분석을 제공해야 한다.

검정법 방법에 대한 참조문헌들의 상기 모음은 배제적이지 않고, 당업자는 요망되는 최종 결과를 시험하는 데 유용한 다른 검정법들을 인지할 것이다.

**약효, 생체내 기능적 반감기 및 약물동력학적 파라미터의 측정**

본 발명의 중요한 양태는 항-CD3 항체가 수용성 중합체 모이어티에 컨쥬케이션되거나 컨쥬케이션되지 않은 채 항-CD3 항체의 구축에 의해 수득되는 연장된 생물학적 반감기이다. 항-CD3 항체 혈청 농도의 급속한 감소로 인해, 컨쥬케이션된 및 비-컨쥬케이션된 항-CD3 항체 및 이의 변이체의 처리에 대한 생물학적 반응을 평가하는 것이 중요해졌다. 바람직하게는, 본 발명의 컨쥬케이션된 및 비-컨쥬케이션된 항-CD3 항체 및 이의 변이체는 정맥내 투여 후에도 연장된 혈청 반감기를 가지며, 예를 들어 ELISA 방법 또는 1차 스크리닝 검정법에 의해 측정하는 것이 가능하다. 생체내 생물학적 반감기의 측정은 본원에 기재된 바와 같이 수행된다.

비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드에 대한 약물동력학적 파라미터는 정상 스프라그 돌리(Sprague-Dawley) 수컷 래트(1개 치료군 당 N=5마리의 동물)에서 평가될 수 있다. 동물에게 래트 1마리 당 25 ug의 단일 용량을 정맥내로 또는 래트 1마리 당 50 ug의 단일 용량을 피하 투여할 것이고, 일반적으로 수용성 중합체에 컨쥬케이션되지 않은 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드의 경우 약 6시간 및 수용성 중합체에 컨쥬케이션된 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩타이드의 경우 약 4일을 망라하는 예정된 시간 경과에 따라 대략 5개 내지 7개의 혈액 시료를 채혈할 것이다. 항-CD3 항체에 대한 약물동력학적 데이터는 몇몇 종들에서 잘 연구되어 있으며, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체에 대해 수득된 데이터와 직접 비교될 수 있다.

본 발명에 따른 항-CD3 항체의 특이적인 활성은 당업계에 공지된 다양한 검정법들에 의해 확인될 수 있다. 본 발명에 따라 수득되고 정제된 항-CD3 항체 돌연변이단백질 및 이의 단편의 생물학적 활성은 본원에 기재 또는 인용되거나 당업자에게 공지된 방법에 의해 시험될 수 있다.

**투여 및 약제학적 조성물**

본 발명의 폴리펩타이드 또는 단백질(비제한적으로 항-CD3 항체, 신서타제(synthetase), 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질 등을 포함함)은 선택적으로, 비제한적으로 예컨대 적합한 약제학적 담체와 조합하여 치료적 용도에 이용된다. 이러한 조성물은 예를 들어, 치료적 유효량의 화합물, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체 또는 부형제로는, 식염수, 완충된 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및/또는 이들의 조합 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 제형은 투여 방식에 맞춰진다. 일반적으로, 단백질의 투여 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 본 발명의 폴리펩타이드의 투여에 적용될 수 있다.

본 발명의 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 치료용 조성물은 선택적으로, 효능, 조직 대사를 확인하고 투여량을 추정하기 위해, 당업계에 잘 공지된 방법에 따라 하나 이상의 적절한 시험관내 및/또는 생체내 질병 동물 모델에서 시험된다. 특히, 투여량은 처음에, 본원의 비천연 내지 천연 아미노산 호모로그의 활성, 안정성 또

는 다른 적합한 측정(비제한적으로, 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하도록 변형된 항-CD3 항체를 천연 아미노산 항-CD3 항체와 비교하는 것을 포함함)에 의해, 즉 관련 검정법에서 확인될 수 있다.

[0133] 투여는, 궁극적으로 혈액 또는 조직 세포와 접촉되도록 분자를 도입하는 데 통상적으로 사용되는 임의의 경로에 의해 수행된다. 본 발명의 비천연 아미노산 폴리펩타이드는, 선택적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께, 임의의 적합한 방식으로 투여된다. 본 발명의 맥락에서 환자에게의 이러한 폴리펩타이드의 적절한 투여 방법이 이용 가능하고, 1개 초과의 경로가 특정 조성물의 투여에 사용될 수 있긴 하더라도, 특정 경로가 종종 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 작용 또는 반응을 제공할 수 있다.

[0134] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물에 의해 결정되고, 뿐만 아니라 조성물의 투여에 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 이에, 본 발명의 약제학적 조성물의 광범위하게 다양한 적합한 제형들이 존재한다.

[0135] 폴리펩타이드 조성물은 비제한적으로 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국소, 설하 또는 직장 수단을 포함하는 다수의 경로들에 의해 투여될 수 있다. 변형된 또는 비변형된 비-천연 아미노산 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 또한, 리포좀을 통해 투여될 수 있다. 이러한 투여 경로 및 적절한 제형은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다.

[0136] 비-천연 아미노산을 단독으로 또는 다른 적합한 구성성분과 조합하여 포함하는 항-CD3 항체는 또한, 흡입에 의해 투여되는 에어로졸 제형(즉, 이들 제형은 "분무(nebulized)"될 수 있음)으로 제조될 수 있다. 에어로졸 제형은 허용 가능한 가압된 분사제(propellant), 예컨대 다이클로로다이플루오로메탄, 프로판, 질소 등 내로 위치할 수 있다.

[0137] 예컨대 관절내(관절 내에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내 및 피하 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 제형은, 항산화제, 완충제, 정균제 및 이러한 제형을 의도된 수여자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의 등장성 멸균 주사액, 및 혼탁제, 가용화제, 농조화제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 혼탁액을 포함한다. 패키징된 항-CD3 항체의 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 밀봉된 용기, 예컨대 앰플 및 바이얼에 제시될 수 있다.

[0138] 비경구 투여 및 정맥내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 특히, 현재 사용되는 제형과 함께 천연 아미노산 호모로그 치료제에 이미 사용되고 있는 투여 경로(비제한적으로 EPO, GH, 항-CD3 항체, G-CSF, GM-CSF, IFN, 인터루킨, 항체 및/또는 임의의 다른 약제학적으로 전달되는 단백질에 전형적으로 사용되는 경로를 포함함)는 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 바람직한 투여 경로 및 제형을 제공한다.

[0139] 본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 용량은 적용에 따라, 비제한적으로 병원체에 의한 감염을 저해하는 활성 또는 다른 적절한 활성을 포함하여 유익한 치료 반응을 시간 경과에 따라 환자에서 갖기에 충분하다. 용량은 특정 벡터 또는 제형의 효능, 및 이용되는 비천연 아미노산 폴리펩타이드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기, 및 환자의 상태, 뿐만 아니라 치료되는 환자의 체중 또는 표면적에 의해 결정된다. 또한, 용량의 크기는 특정 환자에서 특정 벡터, 제형 등의 투여에 수반되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 규모(extent)에 의해 결정된다.

[0140] 질병(비제한적으로 암, 유전병, 당뇨병, AIDS 등을 포함함)의 치료 또는 예방에서 투여되는 벡터 또는 제형의 유효량을 결정하는 데 있어서, 의사는 순환 혈장 수준, 제형 독성, 질병의 진행 및/또는 관련이 있는 경우 항-비천연 아미노산 폴리펩타이드 항체의 생성을 평가한다.

[0141] 예를 들어 70 kg 환자에게 투여되는 용량은 전형적으로, 관련 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 맞게 조정된, 현재 사용되는 치료용 단백질의 투여량과 동등한 범위이다. 본 발명의 벡터는 항체 투여, 백신 투여, 세포독성제, 천연 아미노산 폴리펩타이드, 핵산, 뉴클레오타이드 유사체, 생물학적 반응 변형제 등의 투여를 포함하는 임의의 공지된 종래의 치료법에 의한 치료 조건을 보완할 수 있다.

[0142] 투여를 위해, 본 발명의 제형은 관련 제형의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 비제한적으로 예컨대 환자의 체중 및 전반적인 건강에 적용되는 바와 같이 다양한 농도에서 비천연 아미노산의 임의의 부작용의 관찰에 의해 결정되는 속도로 투여된다. 투여는 단일 또는 분할된 용량을 통해 달성될 수 있다.

[0143] 제형을 주입받는 환자에서 열, 오한 또는 근육통이 발생하는 경우, 환자에게 아스피린, 이부프로펜, 아세트아미노펜 또는 다른 통증/열 조절 약물을 수여한다. 주입에 대한 반응, 예컨대 열, 근육통 및 오한을 경험하는 환자는 향후 주입 30분 전에 아스피린, 아세트아미노펜 또는 비제한적으로 예컨대 다이펩하이드라민을 사전 약물 투여받는다. 메페리딘(meperidine)은 해열제 및 항히스타민에 신속하게 반응하지 않는 보다 중증의 오한 및 근육

통에 사용된다. 세포 주입은 반응의 중증도에 따라 지연되거나 중단된다.

[0144] 본 발명의 인간 항원-결합 폴리펩타이드는 포유류 피험자에게 직접 투여될 수 있다. 투여는 항-CD3 항체를 피험자에게 도입되는 데 통상적으로 사용되는 임의의 경로에 의해서 수행된다. 임의의 주어진 사례에 가장 적합한 경로가 치료되는 질환의 성질 및 중증도에 따라 다를 것이더라도, 본 발명의 실시형태에 따른 항-CD3 항체 조성물은 경구, 직장, 국소, 흡입(비제한적으로 에어로졸을 통한 것을 포함함), 혀측(buccal)(비제한적으로 설사를 포함함), 질내, 비경구(비제한적으로 피하, 근육내, 피내, 관절내, 흉막내, 복강내, 대뇌내, 동맥내 또는 정맥내를 포함함), 국소(즉, 피부 표면, 및 기도 표면을 포함한 점막 표면 둘 다) 및 경피 투여에 적합한 것을 포함한다. 투여는 국소 또는 전신일 수 있다. 화합물의 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 밀봉된 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 제시될 수 있다. 본 발명의 항-CD3 항체는 단위 투여량 주사 형태(비제한적으로 용액, 혼탁액 또는 에멀젼을 포함함) 내에서 약제학적으로 허용 가능한 담체와의 혼합물로 제조될 수 있다. 본 발명의 항-CD3 항체는 또한, 연속 주입(예컨대 비제한적으로 미니펌프, 예컨대 삼투 펌프(osmotic pump)를 사용함), 단일 볼루스(bolus) 또는 서방성 데포(depot) 제형에 의해 투여될 수 있다.

[0145] 투여에 적합한 제형은 수성 및 비수성 용액, 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제형을 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 등장성 멸균액, 및 혼탁제, 가용화제, 농조화제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 혼탁액을 포함한다. 용액 및 혼탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0146] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 부분적으로는, 투여되는 특정 조성물, 뿐만 아니라 조성물의 투여에 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 이에, 본 발명의 약제학적 조성물(선택적인 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함함)의 광범위하게 다양한 적합한 제형들이 존재한다(예를 들어, 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>th</sup> ed. 1985]) 참조).

[0147] 적합한 담체는, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트 및 다른 유기산을 함유하는 완충제; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; 키레이트제, 예컨대 EDTA; 2가 금속 이온, 예컨대 아연, 코발트 또는 구리; 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween™, Pluronics™ 또는 PEG를 포함한다.

[0148] 수용성 중합체, 예컨대 PEG에 연결된 것들을 포함하여 본 발명의 항-CD3 항체는 또한, 서방성 시스템에 의해 또는 이의 일부로서 투여될 수 있다. 서방성 조성물은, 비제한적으로 필름 또는 마이크로캡슐을 포함하여 성형된 물품 형태의, 예컨대 비제한적으로 반투과성 중합체 매트릭스를 포함한다. 서방성 매트릭스는 생체적합성 물질, 예컨대 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(문헌[Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)]), 에틸렌 비닐 아세테이트(상기 Langer 등) 또는 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산(EP 133,988), 폴리락타이드(폴리락트산)(미국 특허 3,773,919; EP 58,481), 폴리글리콜라이드(글리콜산의 중합체), 폴리락타이드 코-글리콜라이드(락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물, L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체(문헌[U. Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)]), 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩타이드, 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 폴리당류, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 이소루신, 폴리뉴클레오타이드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 서방성 조성물은 또한, 리포좀에 의해 갇힌(entrapped) 화합물을 포함한다. 화합물을 함유하는 리포좀은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다: DE 3,218,121; 문헌[Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)]; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허 출원 83-118008; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 EP 102,324. 인용된 모든 참조 문헌 및 특허들은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0149] 리포좀에 의해 갇힌 항-CD3 항체는 예를 들어, DE 3,218,121; 문헌[Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)]; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본 특허 출원 83-118008; 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545; 및 EP 102,324에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 리포좀의 조성 및 크기는 당업계에 공지되어

있거나, 당업자에 의해 경험적으로 쉽게 결정될 수 있다. 리포좀의 일부 예들은 예를 들어 문헌[Park JW, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1327-1331 (1995); Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): *Medical Applications of Liposomes* (1998); Drummond DC, et al., *Liposomal drug delivery systems for cancer therapy*, in Teicher B (ed): *Cancer Drug Discovery and Development* (2002); Park JW, et al., *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, et al., *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003)]에 기재되어 있다. 인용된 모든 참조 문헌 및 특허들은 원용에 의해 본 명세서에 포함되어 있다.

[0150] 본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 용량은 시간 경과에 따라 피험자에서 유익한 반응을 유발하기에 충분해야 한다. 일반적으로, 1개 용량 당 비경구로 투여되는 본 발명의 항-CD3 항체의 총 약제학적 유효량은 치료적 재량(discretion)에 달려 있더라도, 약 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 환자 체중/일(day) 내지 약 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 또는 약 0.05 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위이다. 투약 빈도 또한, 치료적 재량에 달려 있으며, 인간에서 사용되는 것으로 승인된 상업적으로 이용 가능한 항-CD3 항체 생성물보다 더 빈번하거나 덜 빈번할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 PEG화된 항원-결합 폴리펩타이드는 상기 기재된 투여 경로들 중 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.

#### 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드의 치료적 용도

[0151] 본 발명의 항-CD3 항체 폴리펩타이드는 광범위한 장애들의 치료에 유용하다. 항-CD3 항체를 함유하는 약제학적 조성물은, 단독으로 또는 질환 또는 질병의 일부로서 사용되는 비제한적으로 항증식제, 항염증제 또는 항바이러스제와 같은 항-CD3 항체 효능제 또는 길항제에 의해 영향을 받을 수 있는 장애를 앓고 있는 인간 환자에게 다양한 수단에 의해 투여되기에 효과적인 강도로 제형화될 수 있다. 항-CD3 항체의 평균 양은 다양할 수 있고, 특히 자격을 갖춘 의사의 권고 및 처방을 기반으로 해야 한다. 항-CD3 항체의 정확한 양은 치료되는 질환의 정확한 유형, 치료되는 환자의 상태, 뿐만 아니라 조성을 내 다른 성분과 같은 인자들에 대한 선호도의 문제이다. 본 발명은 또한, 치료적 유효량의 또 다른 활성제, 예컨대 항암 화학치료제의 투여를 제공한다. 주어지는 양은 항-CD3 항체를 이용한 치료법을 기반으로 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

#### 실시예

[0154] 하기 실시예는 예시를 위해 제공되지만, 청구된 발명을 제한하려는 것이 아니다.

#### 실시예 1

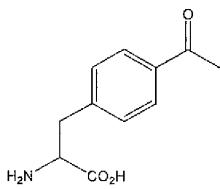
[0156] 이 실시예는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 항-CD3 항체 내로 흔입하는 데 바람직한 부위의 선별을 위한 많은 잠재적인 기준 세트들 중 하나를 기재하고 있다.

[0157] 이 실시예는, 항원-결합 폴리펩타이드 내의 바람직한 부위가 어떻게 비-천연적으로 인코딩된 아미노산의 도입에 선별되었는지 나타내고 있다. 항-CD3 항체의 2개 분자로 구성된 3차원 구조 또는 항-CD3 항체의 2기, 3기 또는 4기 구조가, 하나 이상의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산이 도입될 수 있을 바람직한 위치를 확인하는 데 사용되었다.

[0158] 비-천연적으로 인코딩된 아미노산의 도입을 위한 항-CD3 항체의 각각의 위치를 평가하기 위해 하기 기준들이 사용되었다: 잔기는 (a) 항-CD3 항체의 3차원 구조 또는 2기, 3기 또는 4기 구조의 구조적 분석을 기반으로 항-CD3 항체의 결합을 방해하지 않아야 하며, (b) 알라닌 또는 호모로그 스캐닝(scanning) 돌연변이형성에 의해 영향을 받지 않아야 하며, (c) 표면 노출되고, 주변 잔기와의 최소의 반데르발스 또는 수소 결합 상호작용을 나타내어야 하며, (d) 항-CD3 항체의 하나 이상의 노출된 면 상에 존재할 수 있으며, (e) 제2 항-CD3 항체 또는 이의 다른 분자 또는 단편의 측면에 놓인(juxtaposed) 항-CD3 항체의 부위 또는 부위들일 수 있으며, (f) 항-CD3 항체 변이체에서 결실되거나 가변성이어야 하며, (g) 비-천연적으로 인코딩된 아미노산으로의 치환 시 보존적 변화를 초래할 것이며, (h) 항-CD3 항체 그 자체, 또는 하나 이상의 항-CD3 항체를 포함하는 이량체 또는 다량체의 입체형태를, 기재된 바와 같이 완전 구조의 굴곡성(flexibility) 또는 강성(rigidity)을 변경함으로써 조정할 수 있으며, (i) 고도로 굴곡성인 영역 또는 구조적으로 강성인 영역에서 발견될 수 있을 것이고, (j) 상보성 결정 영역(CDR)에서 확인되거나 확인되지 않는다. 또한, 항-CD3 항체 분자 상에서 Cx 프로그램(문헌[Pintar et al. *Bioinformatics*, 18, pp 980])을 이용하여 추가의 계산을 수행하여, 각각의 단백질 원자에 대한 돌출(protrusion) 규모를 평가하였다. 그 결과 일부 실시형태에서, 비-천연적으로 인코딩된 인코딩된 아미노산은 비제한적으로 항-CD3 항체의 하나 이상의 위치에서 치환된다.

#### 실시예 2

- [0160] 이 실시예는 이. 콜라이에서 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체의 클로닝 및 발현을 상술하고 있다.
- [0161] 오르토고날 tRNA(0-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 신서타제(0-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템은 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 함유하는 항-CD3 항체를 발현하는 데 사용된다. 0-RS는 우선적으로, 0-tRNA를 비-천연적으로 인코딩된 아미노산으로 아미노아실화한다. 결국, 번역 시스템은 인코딩된 선택자 코돈에 반응하여, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 항-CD3 항체 내로 삽입한다.
- [0162] 변형된 항-CD3 항체 유전자 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 신서타제/tRNA 쌍(요망되는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산에 특이적임)을 함유하는 플라스미드로 이. 콜라이를 형질변환시키면, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 항-CD3 항체 내에 부위-특이적으로 혼입시킬 수 있다. 0.01 mM 내지 100 mM의 특정 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 함유하는 배지 내에서 37°C에서 성장된 형질변환된 이. 콜라이는 변형된 항-CD3 항체를 높은 충실도(fidelity) 및 효율로 발현한다. 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 함유하는 His-태깅된 항-CD3 항체를 이. 콜라이 숙주 세포에 의해 봉입체 또는 응집물(aggregate)로서 생성한다. 응집물을 6 M 구아ニ딘 HCl 내에서 변성 조건 하에 용해되고 친화성 정제한다. 재접힘(refolding)을 50 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 40 μM CuSO<sub>4</sub> 및 2%(w/v) 사르코실(Sarkosyl) 내에서 4°C에서 밤새 투석에 의해 수행한다. 그런 다음, 물질을 20 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>에 의해 투석한 다음, His-태그를 제거한다. 문헌[Boissel et al., (1993) 268:15983-93]을 참조한다. 항-CD3 항체의 정제 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 분석 또는 전기분무-이온화 이온 트랩 질량 분광법에 의해 수행된다.
- [0163] 발현/역제
- [0164] 파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)을 이용한 억제: 이. 콜라이에서 호박 돌연변이의 억제를 당업계에 공지된 표준 프로토콜을 사용하여 달성하였다. 간략하게는, 이. 콜라이에서 항체 단편(scFv 및 Fab)의 주변세포질 억제를 위해, 발현 벡터 구축물을 엠. 앤나쉬이(*M. jannaschii*) 유래의 오르토고날 티로실-tRNA-신서타제(*MjTyrRS*)를 인코딩하는 플라스미드를 이용하여 이. 콜라이 숙주 세포 내로 형질변환하였다. 밤새 박테리아 배양물을 LB 배지 (Luria-Bertani) 또는 슈퍼브로쓰(Superbroth)를 함유하는 진탕 플라스크 내로 1:100 희석시키고, 37°C에서 대략 0.8의 OD까지 성장시켰다. 파라-아세틸-페닐알라닌(pAcF)을 4 mM의 최종 농도까지 첨가함으로써 호박 코돈의 억제를 달성하면서, Fab 및 scFv 발현을 유도하였다. 배양물을 25°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0165] aa9.2를 이용한 억제: pAcF의 유도체(aa 9.2)를 이용한 호박 돌연변이의 억제를, 엠. 앤나쉬이 유래의 오르토고날 티로실-tRNA-신서타제(*MjTyrRS*)가 이 아미노산에 특이적이라는 점을 제외하고는, pAcF와 유사한 방식으로 달성하였다. 유도 시 aa9.2(4 mM)를 첨가함으로써 억제를 달성하였다.
- [0166] 단백질 추출 및 정제
- [0167] 세포를 원심분리에 의해 수합하고, 100 ug/ml의 리소자임이 보완된 주변세포질 방출 완충제(50 mM NaPO<sub>4</sub>, 20% 수크로스, 1 mM EDTA, pH 8.0) 내에서 재현탁시키고, 엘음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 원심분리 후, 상층액 내 항체 단편을 이의 His 태그에 의해 ProBind 비드(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) 상에 고정하였으며, 이러한 비드를 결합 완충제를 이용하여 광범위하게 세척한 다음, 결합된 단편을 0.5 M 이마다 졸을 이용하여 비드로부터 용리하였다. 정제된 단편을 저장 완충제(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, 5% 수크로스, pH 7.8) 내에서 투석하였다. 세포질에서 발현되는 scFv 단편의 소규모 분석의 경우, 15 ml의 배양물 유래의 이. 콜라이를 원심분리에 의해 수합하고, 10 ug/ml의 DNase가 보완된 1 ml의 용해 완충제(B-PER, Pierce Biotechnology; 미국 일리노이주 록퍼드 소재) 내에서 재현탁하였다. 혼합물을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 단백질 로딩 완충제(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재) 내에서 1X까지 희석시키고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다.
- [0168] 실시예 3
- [0169] 이 실시예는 카르보닐-함유 아미노산의 도입, 및 아미노옥시-함유 PEG와의 후속적인 반응을 상술하고 있다.
- [0170] 이 실시예는, 케톤-함유 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 혼입하고 후속적으로 대략 5,000 MW의 아미노옥시-함유 PEG와 반응하는 항원-결합 폴리펩타이드의 생성 방법을 나타내고 있다. 실시예 1의 기준에 따라 확인된 잔기는 각각 개별적으로, 하기 구조:



[0171]

를 가진 비-천연적으로 인코딩된 아미노산으로 치환된다.

[0173]

일단 변형되면, 카르보닐-함유 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체 변이체는 형태:

[0174]

$R-PEG(N)-O-(CH_2)_n-O-NH_2$

[0175]

의 아미노옥시-함유 PEG 유도체와 반응하며,

[0176]

여기서, R은 메틸이며, n은 3이고, N은 대략 5,000 MW이다. 25 mM MES(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 6.0, 25 mM Hepes(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 7.0 또는 10 mM 소듐 아세테이트(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 4.5에서 10 mg/mL로 용해된 *p*-아세틸페닐 알라닌을 함유하는 정제된 항-CD3 항체를 10배 내지 100배 과량의 아미노옥시-함유 PEG와 반응시킨 다음, 실온에서 10시간 내지 16시간 동안 교반한다(문헌[Jencks, W. J. *Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475]). 그런 다음, PEG-항-CD3 항체를 즉각적인 정제 및 분석을 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[0177]

실시예 4

[0178]

아미드 연결을 통해 PEG에 연결된 하이드록실아민기로 구성된, PEG와의 컨쥬게이션.

[0179]

하기 구조:

[0180]

$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-O-NH_2$

[0181]

를 가진 PEG 시약을 실시예 3에 기재된 절차를 사용하여 케톤-함유 비-천연적으로 인코딩된 아미노산에 커플링하며,

[0182]

여기서, R은 메틸이며, n은 4이고, N은 대략 20,000 MW이다. 반응, 정제 및 분석 조건은 실시예 3에 기재된 바와 같다.

[0183]

실시예 5

[0184]

이 실시예는 2개의 별개의 비-천연적으로 인코딩된 아미노산들을 항-CD3 항체 내에 도입하는 것을 상술하고 있다.

[0185]

이 실시예는, 실시예 1에 따라 확인된 2개의 위치들에서 케톤 작용기를 포함하는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 혼입하는 항원-결합 폴리펩타이드의 생성 방법을 나타내고 있으며, 여기서, X\*는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 나타낸다. 항원-결합 폴리펩타이드를, 억제자 코돈을 핵산 내의 2개의 별개의 부위들에 도입하는 점을 제외하고는, 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 제조한다.

[0186]

실시예 6

[0187]

이 실시예는 항원-결합 폴리펩타이드를 하이드라자이드-함유 PEG에 컨쥬게이션하고, 후속적으로 인 *시추*(*in situ*) 환원시키는 것을 상술하고 있다.

[0188]

카르보닐-함유 아미노산을 혼입하는 항원-결합 폴리펩타이드를 실시예 2 및 3에 기재된 절차에 따라 제조한다. 일단 변형되면, 하기 구조:

[0189]

$R-PEG(N)-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_n-X-NH-NH_2$

[0190]

를 가진 하이드라자이드-함유 PEG를 항-CD3 항체에 컨쥬게이션하며,

[0191]

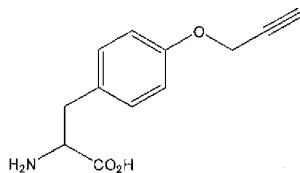
여기서, R은 메틸이며, n은 2이며, N은 10,000 MW이고, X는 카르보닐(C=O)기이다. *p*-아세틸페닐알라닌을 함유하는 정제된 항-CD3 항체를 25 mM MES(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 6.0, 25 mM Hepes(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 7.0 또는 10 mM 소듐 아세테이트(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재) pH 4.5 내에서 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL로 용해시키며, 1배 내지

100배 과량의 하이드라자이드-함유 PEG와 반응시키고, 상응하는 하이드라존을 1 M NaCNBH<sub>3</sub> 스톡(stock)(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)을 첨가하여 인 시추 환원시키고, H<sub>2</sub>O에서 10 mM 내지 50 mM의 최종 농도까지 희석시킨다. 반응을 4°C 내지 RT까지 암실에서 18시간 내지 24시간 동안 수행한다. 반응을, 약 pH 7.6에서 1 M Tris(Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)를 50 mM의 최종 Tris 농도까지 첨가하여 중단시키거나, 즉각적인 정제를 위해 적절한 완충제 내로 희석시킨다.

[0192] 실시예 7

[0193] 이 실시예는 알카인-함유 아미노산을 항-CD3 항체 내로 도입하고, mPEG-아자이드를 이용하여 유도체화하는 것을 상술하고 있다.

[0194] 실시예 1에 따라 확인된 잔기들 중 임의의 잔기를 하기 비-천연적으로 인코딩된 아미노산:

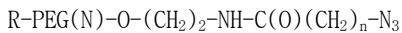


[0195]

[0196] 으로 치환한다.

[0197] PB 완충제(100 mM 소듐 포스페이트, 0.15 M NaCl, pH = 8) 내에서 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL로 용해된 프로파길-티로신 및 10배 내지 1000배의 과량의 아자이드-함유 PEG를 함유하는 정제된 항-CD3 항체를 반응 혼합물에 첨가한다. 그런 다음, 촉매량의 CuSO<sub>4</sub> 및 Cu 와이어를 반응 혼합물에 첨가한다. 혼합물을 인큐베이션한 후(비제한적으로 실온 또는 37°C에서 약 4시간, 또는 4°C에서 밤새를 포함함), H<sub>2</sub>O를 첨가하고, 혼합물을 투석막을 통해 여과한다. 시료를 비제한적으로 실시예 3에 기재된 유사한 절차에 의해 첨가에 대해 분석할 수 있다.

[0198] 이 실시예에서, PEG는 하기 구조:



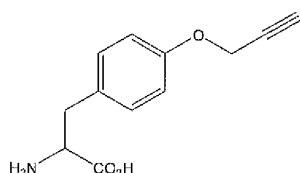
[0200] 를 가질 것이며,

[0201] 여기서, R은 메틸이며, n은 4이고, N은 10,000 MW이다.

[0202] 실시예 8

[0203] 이 실시예는 항-CD3 항체 내에서 큰 소수성 아미노산을 프로파길 티로신으로 치환하는 것을 상술하고 있다.

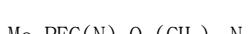
[0204] 항-CD3 항체의 서열 내에 존재하는 Phe, Trp 또는 Tyr 잔기를 실시예 7에 기재된 바와 같이 하기 비-천연적으로 인코딩된 아미노산:



[0205]

[0206] 으로 치환한다.

[0207] 일단 변형되면, PEG를, 알카인-함유 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체 변이체에 부착한다. PEG는 하기 구조:



[0209] 를 가질 것이고, 커플링 절차는 실시예 7에 기재된 절차를 따를 것이다. 이로써, 천연-발생의 큰 소수성 아미노산들 중 하나와 대략 동전자인(isosteric)이고 폴리펩타이드 내의 별개의 부위에서 PEG 유도체에 의해 변형되는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체 변이체가 생성될 것이다.

[0210] 실시예 9

[0211] 이 실시예는 하나 이상의 PEG 링커에 의해 분리된 항-CD3 항체 호모이량체, 혼테로이량체, 호모다량체 또는 혼

테로다량체의 생성을 상술하고 있다.

[0212] 실시예 7에서 생성된 알카인-함유 항-CD3 항체 변이체를 형태:



[0214] 의 2작용성 PEG 유도체와 반응시켜, 상응하는 항-CD3 항체 호모이량체를 생성하며,

[0215] 여기서, n은 4이고, PEG의 평균 MW는 대략 5,000이고, 여기서, 2개의 항-CD3 항체 분자들은 PEG에 의해 물리적으로 분리된다. 유사한 방식으로, 항원-결합 폴리펩타이드는 하나 이상의 다른 폴리펩타이드와 커플링되어, 헤테로이량체, 호모다량체 또는 헤테로다량체를 형성할 수 있다. 커플링, 정제 및 분석은 실시예 7 및 3에서와 같이 수행될 것이다.

[0216] 실시예 10

[0217] 이 실시예는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 항-CD3 항체 및 PEG화된 항-CD3 항체의 시험관내 및 생체내 활성을 측정하는 방법을 기재하고 있다.

[0218] 세포 결합 검정법

[0219] 세포( $3 \times 10^6$ )를 다양한 농도(부피:  $10 \mu\text{l}$ )의 비표지된 항-CD3 항체, 항-CD3 항체 또는 음성 대조군의 부재 또는 존재 하에 및  $^{125}\text{I}$ -항-CD3 항체(대략 100,000 cpm 또는 1 ng)의 존재 하에, PBS/1% BSA( $100 \mu\text{l}$ ) 내에서 0°C에서 90분 동안 2별 중복으로 인큐베이션한다(총 부피:  $120 \mu\text{l}$ ). 그런 다음, 세포를  $350 \mu\text{l}$  플라스틱 원심분리 투브 내에서  $200 \mu\text{l}$  얼음 냉각 FCS에 걸쳐 재현탁하고 층화(layering)시킨 다음, 원심분리(1000 g; 1분)한다. 투브의 말단을 절단함으로써 펠렛을 수합하고, 펠렛 및 상층액을 감마 계수기(Packard)에서 개별적으로 계수한다.

[0220] 특이적인 결합(cpm)을, 경쟁자의 부재 하에서의 총 결합(2별 중복의 평균) - 100배 과량의 비표지된 항-CD3 항체의 존재 하에서의 결합(비-특이적인 결합)(cpm)으로서 확인한다. 비-특이적인 결합을 사용된 각각의 세포 유형에 대해 측정한다. 실험은 동일한  $^{125}\text{I}$ -항-CD3 항체 제조물을 사용하여 개별 일자에 진행되고, 내적 일관성(internal consistency)을 나타내어야 한다. 결합은 비표지된 천연 항-CD3 항체 또는 항-CD3 항체에 의해 용량의존적 방식으로 저해되지만, 음성 대조군에 의해서는 저해되지 않는다. 천연  $^{125}\text{I}$ -항-CD3 항체의 결합에 대해 경쟁하는 항-CD3 항체의 능력은, 수용체가 두 형태들을 동등하게 잘 인지함을 제시한다.

[0221] PEG화된 항-CD3 항체의 생체내 연구

[0222] PEG-항-CD3 항체, 비변형된 항-CD3 항체 및 완충제 용액을 마우스 또는 래트에게 투여한다. 그 결과는, 비변형된 항-CD3 항체와 비교하여 본 발명의 PEG화된 항-CD3 항체의 우수한 활성 및 연장된 반감기를 보여줄 것이다.

[0223] 컨쥬게이션된 및 비-컨쥬게이션된 항-CD3 항체 및 이들의 변이체의 생체내 반감기의 측정.

[0224] 수컷 스프라그 돌리 래트(약 7주령)를 사용한다. 투여 일자에, 각각의 동물의 체중을 측정한다. 체중 1 kg 당 비-컨쥬게이션된 및 컨쥬게이션된 항-CD3 항체 시료  $100 \mu\text{g}$ 을 각각 3마리의 래트의 꼬리 정맥 내로 정맥내 주사한다. 주사 후 1분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 및 24시간째에, 혈액  $500 \mu\text{l}$ 을  $\text{CO}_2$  마취 하에 각각의 래트로부터 채혈한다. 혈액 시료를 실온에서 1.5시간 동안 저장한 다음, 혈청을 원심분리(4°C, 18000 xg에서 5분)에 의해 단리한다. 혈청 시료를 분석일까지 -80°C에서 저장한다. 혈청 시료 내 활성 항-CD3 항체의 양을, 시료를 얼음 상에서 해동시킨 후 항-CD3 항체 시험관내 활성 검정법에 의해 정량화한다.

[0225] 실시예 11

[0226] 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체의 안전성 및/또는 효능에 대한 인간 임상 시험.

[0227] 목적 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 피하 투여된 PEG화된 재조합 인간 항-CD3 항체의 안전성 및 약물동력학을, 동일한 표적 항원에 특이적인 상업적으로 입수 가능한 제품들(예를 들어 Herceptin®, Bexxar®, Campath®, CEA-Scan®, Enbrel®, Erbitux®, Humira®, Myoscint®, Prostascint®, Raptiva®, Remicade®, ReoPro®, Rituxan®, Simulect®, Synagis®, Verluma®, Xolair®, Zenapax®, Zevalin® 또는 Avastin®)과 비교하기 위한 것이다.

[0228] 환자 연령이 20세 내지 40세의 범위이며 체중이 60 kg 내지 90 kg인 18명의 건강한 지원자들을 연구에 등록시킨

다. 피험자는 혈액학 또는 혈청 화학, 및 음성 소변 독성 스크린, HIV 스크린 및 B형 간염 표면 항원에 대한 임상적으로 유의한 비정상적인 실험실 값을 가지지 않을 것이다. 이들 피험자는 하기 중 임의의 증거를 갖지 않아야 한다: 고혈압; 임의의 원발성 혈액학적 질병의 이력; 유의한 간, 신장, 심혈관, 위장관, 비뇨생식기의 이력; 대사, 신경학적 질병; 빈혈 또는 발작 장애의 이력; 박테리아 또는 포유류-유래 생성물, PEG 또는 인간 혈청 알부민에 대한 공지된 민감성; 카페인 함유 음료의 습관적이고 중독성 있는 소비; 임의의 다른 임상 시험에의 참여 또는 연구 시작 30일 이내에 혈액 수혈 또는 헌혈; 연구 시작 3개월 이내에 항-CD3 항체에의 노출; 연구 시작 7일 이내에 병의 발병; 및 예비연구 신체 검사 또는 연구 시작 14일 이내에 임상 실험실 평가에서 유의한 비정상의 증거 중 어떠한 증거도 갖지 않아야 한다. 모든 피험자들을 안전성에 대해 평가할 수 있고, 약물 동력학적 분석을 위한 모든 혈액 수합물들을 스케줄대로 수합한다. 모든 연구를 기관 윤리 위원회의 승인 및 환자의 동의를 받아 수행한다.

[0229] 연구 디자인 이는 건강한 남성 지원자들에서 I상, 단일-센터, 오픈-표지, 랜덤화된, 2-기간 교차 연구일 것이다. 18명의 피험자를 2개의 치료 순서 그룹들 중 하나의 그룹(9명의 피험자/그룹)에 랜덤하게 지정한다. 항-CD3 항체를, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체 및 선택된 상업적으로 입수 가능한 제품을 동등한 용량으로 사용하여 2개의 개별 투약 기간에 걸쳐 볼루스 피하 주사로서 상부 대퇴부에 투여한다. 상업적으로 입수 가능한 제품의 투여 용량 및 빈도는 패키지 표지에 지시된 바와 같다. 요망되는 경우, 상업적으로 입수 가능한 제품을 사용한 추가 투약, 투약 빈도 또는 다른 파라미터를, 추가 피험자 그룹을 포함시킴으로써 연구에 추가할 수 있다. 각각의 투약 기간은 14일의 워시아웃(washout) 기간에 의해 분리된다. 피험자는, 투약 기간들 사이가 아니라 2개의 투약 기간들 중 각각의 투약 기간에 대한 투약 이전 적어도 12시간 및 투약 이후 72시간 동안 연구 센터에 격리된다. PEG화된 항-CD3 항체에 대해서도 시험되어야 하는 추가 투약, 빈도 또는 다른 파라미터가 존재한다면, 추가 그룹의 피험자들이 추가될 수 있다. 항-CD3 항체의 실험 제형은 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체이다.

[0230] 혈액 시료화 항-CD3 항체의 투여 이전 및 이후에 일련의 혈액을 직접적인 정맥 천자(vein puncture)에 의해 채혈한다. 혈청 항-CD3 항체 농도의 확인을 위한 정맥혈 시료(5 mL)를 투약 이전 약 30분, 20분 및 10분째(3개의 기준선 시료), 및 투약 후 대략 하기 시점들에서 수득한다: 30분 및 1시간, 2시간, 5시간, 8시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간. 각각의 혈청 시료를 2개의 분취물로 분할한다. 모든 혈청 시료들을 -20°C에 저장한다. 혈청 시료를 건조 얼음 상에서 운반한다. 단식 임상 실험실 시험(혈액학, 혈청 화학 및 소변 검사)을 제1일에 초기 투여 직전에, 제4일 아침에, 제16일에 투약 직전에, 및 제19일 아침에 수행한다.

[0231] 생물분석학적 방법 방사성면역검정법(RA) 또는 ELISA 키트 절차를 혈청 항-CD3 항체 농도의 확인에 사용한다.

[0232] 안전성 확인 바이탈 사인(vital sign)을 각각의 투약(제1일 및 제16일) 직전, 및 각각의 투약 후 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간째에 기록한다. 안전성 확인은 부작용의 발생 및 유형, 및 임상 실험실 시험에서 기준선으로부터의 변화를 기반으로 한다. 또한, 혈압을 포함하여 바이탈 사인 측정에서 예비연구로부터의 변화, 및 신체 검사 결과를 평가한다.

[0233] 데이터 분석 투약 이전 30분, 20분 및 10분째에 수합된 3개의 시료들의 항-CD3 항체 수준의 평균을 내어서 확인된 평균 기준선 항-CD3 항체 농도를 각각의 투여후(post-dose) 값으로부터 제함으로써, 투여후 혈청 농도 값을 투여전(pre-dose) 기준선 항-CD3 항체 농도에 대해 보정한다. 투여전 혈청 항-CD3 항체 농도가 검정법의 정량화 수준보다 낮은 경우, 이 농도는 평균값의 계산에 포함되지 않는다. 약물동력학적 파라미터는 기준선 항-CD3 항체 농도에 대해 보정된 혈청 농도 데이터로부터 확인된다. 약물동력학적 파라미터는 최신 버전의 BIOAVL 소프트웨어를 사용하여 Digital Equipment Corporation VAX 8600 컴퓨터 시스템 상에서 모델 독립적 방법에 의해 계산된다. 하기 약물동력학적 파라미터를 확인한다: 피크 혈청 농도( $C_{\max}$ ); 피크 혈청 농도까지의 시간( $t_{\max}$ ); 선형 사다리꼴 법칙을 이용하여 계산된 제로 시점에서부터 마지막 혈액 시료화 시간까지의 농도-시간 곡선 하 면적 (AUC<sub>0-72</sub>); 및 제거 속도 상수(elimination rate constant)로부터 계산된 최종 제거 반감기( $t_{1/2}$ ). 제거 속도 상수는 로그-선형 농도-시간 플롯의 최종 선형 영역에서 연속적인 데이터 지점들의 선형 회귀에 의해 추정된다. 약물동력학적 파라미터의 평균, 표준 편차(SD) 및 변동 계수(CV; coefficient of variation)는 각각의 치료에 대해 계산된다. 파라미터 평균의 비율(보존된 제형/비보존된 제형)을 계산한다.

[0234] 안전성 결과 부작용의 발생은 치료군에 걸쳐 동일하게 분포된다. 기준선, 또는 예비연구 임상 실험실 시험 또는 혈압으로부터 임상적으로 유의한 변화가 존재하지 않고, 신체 검사 결과 및 바이탈 사인 측정에서 예비연구로부터 주목할 만한 변화가 존재하지 않는다. 2개의 치료군들에 대한 안전성 프로파일은 유사한 것으로 보여야

한다.

[0235] 약물동력학적 결과 동일한 표적 항원에 특이적인 하나 이상의 상업적으로 입수 가능한 제품을 단일 용량으로 수여 받은 후 평균 18명의 모든 피험자들에서 혈청 항-CD3 항체 농도-시간 프로파일(기준선 항-CD3 항체 수준에 대해 비보정됨)을, 측정된 각각의 시점에서 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체와 비교한다. 모든 피험자들은 투여전 기준선 항-CD3 항체 농도를 정상적인 생리학적 범위 내에서 가져야 한다. 약물동력학적 파라미터를 투여전 평균 기준선 항-CD3 항체 농도에 대해 보정된 혈청 데이터로부터 확인하고,  $C_{max}$  및  $t_{max}$ 를 확인한다. 선택된 임상적 비교자(들)에 대한 평균  $t_{max}$ 는 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체에 대한  $t_{max}$ 보다 유의하게 더 짧다. 최종 반감기 값은, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체에 대한 최종 반감기와 비교하여 시험된 임상적으로 입수 가능한 항-CD3 항체 생성물에 대해 유의하게 더 짧다.

[0236] 본 연구가 건강한 남성 피험자에서 수행되더라도, 유사한 흡수 특징 및 안전성 프로파일은 다른 환자 집단: 예컨대 암 또는 만성 신부전을 앓고 있는 남성 또는 여성 환자, 소아 신부전 환자, 자가 예치 프로그램(autologous predeposit programm)의 환자, 또는 대기 수술(elective surgery) 스케줄이 있는 환자에서도 예상될 것이다.

[0237] 결론적으로, 피하 투여된 단일 용량의, 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체는 건강한 남성 피험자에게 안전하고 양호하게 관용될 것이다. 부작용의 비교적인 발생, 임상 실험실 값, 바이탈 사인 및 신체 검사 결과를 기반으로 하여, 상업적으로 입수 가능한 형태의 항-CD3 항체 및 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체의 안전성 프로파일은 동등할 것이다. 비-천연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 PEG화된 항-CD3 항체는 잠재적으로, 환자 및 헬스 케어 제공자에게 큰 임상적 유용성을 제공한다.

#### 실시예 12

[0239] 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트의 친화성 및 특이성을  $FR^+$  및  $FR^-$  세포주를 사용하여 평가하였다. 폴레이트 결핍 배지에서 배양된 후, FR은 유세포분석에 의해 확인된 바와 같이 비인두암 세포주(KB) 및 난소암 세포주(OV-90, SKOV-3)에서 과발현되었다. FR을 발현하지 않는 신장암 세포주 CAKI-1 및 폐포 기저 상피 세포암종 A549를 음성 대조군으로서 사용하였다. 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트는 유리(free) 폴레이트와 유사한 친화성으로 KB 세포( $FR^+$ )에 결합할 수 있었으며, 이는 항-CD3 Fab와 컨쥬케이션된 결과 폴레이트 수용체의 결합의 최소 손실을 가리킨다. 마찬가지로, 항-CD3 Fab-폴레이트는 항-CD3와 유사한 친화성으로 Jurkat 세포( $CD3^+$ )에 결합하였으며; A549 세포( $FR^-$ )에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

#### 실시예 13

[0241] 다음으로, 본 발명자들은 KB 및 OV-90 세포( $FR^+$ ) 및 대조군으로서 CAKI-1 및 A549 세포( $FR^-$ )를 이용하여 시험관내 세포독성 검정법에서 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트의 활성을 시험하였다. 세포를 활성화된 인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC; 표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)와 공동 배양하고, 다양한 농도의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 항-CD3 Fab를 단독으로 처리하였다. 용해된 세포로부터 방출된 LDH 수준을 CellTiter-Glo 및 FACS-기반 독성 검정법을 이용하여 측정함으로써, 세포독성을 정량화하였다. 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트는 PBMC의 존재 하에 KB 및 OV-90 세포를 각각  $EC_{50}$ 의 10 pM 및 100 pM로 효율적으로 사멸화시켰으며(도 2 A, 보완도 4), 한편 CAKI-1 세포(도 2 A) 및 A549 세포(보완 도 4)는 100 nM의 컨쥬케이트에서 영향을 받지 않았다. 항-CD3 Fab 단독의 처리는 시험된 모든 세포주들에서 무시할 만한 독성을 유도하였다(도 2 A). 더욱이, 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트의 존재 하에 폴레이트 결핍 배지에서 활성화된 PBMC와 함께 SKOV-3 세포(도 2 B) 또는 KB 세포(보완 도 5)의 인큐베이션(16시간)(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)은 로제트(rosette)의 형성을 초래하였으며, 이는 T 세포 표적화에 대한 추가의 증거를 제공한다. 이와는 대조적으로, 항-CD3 Fab는 T 세포 연결에 아무런 영향을 미치지 않았고, PBMC 또는 KB 세포의 부재 하에 클러스터는 관찰되지 않았다(보완도 5).

#### 실시예 14

[0243] 다음으로, 본 발명자들은 설치류에서 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트 및 비컨쥬케이션된 항-CD3 Fab의 약물동

력학을 검사하였다. PBS 중 1 mg/kg 또는 5 mg/kg의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 1 mg/kg의 비컨쥬케이션된 항-CD3 Fab의 단일 용량을 3마리의 래트에게 정맥내 주사하고, 정기적인 간격으로 수합된 혈청을 ELISA에 의해 분석하였다. 혈청 농도는 항-CD3 Fab-폴레이트 및 상응하는 비컨쥬케이션된 돌연변이체 항-CD3 Fab 둘 다에 대해 60분의 혈청 반감기라는 동일한 속도로 감소하였다(도 3 D). 따라서, 항-CD3 Fab-폴레이트는 비컨쥬케이션된 항-CD3 Fab와 유사한 약물동력학을 가지며, 이는, 컨쥬케이트의 PK 프로파일이 폴레이트 유도체화에 의해 영향을 받지 않았음을 가리킨다.

[0244] 실시예 15

그런 다음, 항-CD3 Fab-폴레이트 이중특이적인 제제의 생체내 효능을 암컷 NOD-SCID 마우스를 사용하여 이종 이식 모델에서 평가하였다. 동물을 저-폴레이트 식이요법 상에서 유지시켜, 이중특이적인 제제와 경쟁하게 될 폴레이트의 순환 혈청 수준을 감소시켰다. KB(FR<sup>+</sup>) 또는 A549(FR<sup>-</sup>) 세포는 비-활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 100임) 또는 활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)와 혼합시 종양을 형성할 수 있었으며, 마우스에게 피하 주사되었다. 따라서, 본 발명자들은 활성화된 인간 PBMC와 혼합된 KB 세포(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 10임)를 마우스에게 이식하고, 마우스에게 1.5 mg/kg의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS를 종양 세포 이식일과 동일한 일자에 시작하여 10일 동안 매일 정맥내 주사하였다. 이러한 투약 계획(regimen)을 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트의 약물동력학적 특성 및 이중특이적인 항체를 이용한 이전의 연구<sup>10</sup>를 기반으로 선택하였다. 종양 부피는 PBS-처리 마우스에서 배가 시간이 대략 5일일 정도로 급속한 증가를 보여주었다. 이와는 대조적으로, 항-CD3 Fab-폴레이트로 치료된 마우스에서 종양은 연구 기간 전체에 걸쳐 거의 검출 가능하지 않았다(도 3 A). 병행 연구에서, 마우스에게 비활성화된 인간 PBMC와 혼합된 KB 세포(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 100임)를 이식하고, 1.5 mg/kg의 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS를 종양 세포 이식일과 동일한 일자에 시작하여 10일 동안 매일 정맥내 치료하였다. 2개 그룹의 마우스 모두에서 종양 부피가 주사 부위에서 가능하게는 PBMC의 높은 부담(burden)으로 인해 처음 연구 30일 동안 감소하였다. 그러나, 종양의 감소 속도는 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 마우스에서 더 높았다. 연구 제35일 후, PBS-처리 마우스에서 종양은 부피가 꾸준히 증가한 한편, 항-CD3 Fab-폴레이트로 처리된 마우스에서 종양은 거의 검출 불가능한 수준까지 감소하였으며, 이는, 심지어 활성화된 T 세포의 부재 하에 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트에 의한 종양의 제거를 위한 세포독성 T 세포의 연결을 가리킨다. FR-발현 종양에 대한 항-CD3 Fab-폴레이트 컨쥬케이트의 생체내 선택성을 시험하기 위해, A549 세포(FR<sup>-</sup>)를 비활성화된 인간 PBMC(표적 세포 : 효과기 세포의 비율은 1 : 100임)와 혼합하고, 마우스에게 이식하였다. 마우스를 1.5 mg/kg 항-CD3 Fab-폴레이트의 10 일일 정맥내 용량으로 유사한 방식으로 치료하였으며, 치료 후 20일째에 PBS 처리된 종양과 유의한 차이를 보여주지 않았다. 이들 모든 연구 전체에서, 체중 손실 또는 다른 명시적인 독성은 항-CD3 Fab-폴레이트 및 PBS-처리 마우스 둘 다에서 관찰되지 않았다(도 3 C, 보완 도 6 B). 본 발명자들은 항-CD3 Fab-폴레이트를 주사한 마우스 및 주사하지 않은 마우스 둘 다의 조직병리학적 분석을 추가로 수행하였다. 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS로 치료된 마우스의 신장의 염색은 T 세포의 침윤을 보여주지 않았으며; 치료군과 대조군 사이에서 혈마록실린 및 에오신(H&E) 염색에서 명백한 병리학적 차이가 비장, 폐 및 간과 같은 다른 조직에서 관찰되었다.

[0246] 실시예 16

[0247] 고체상 웨타이드 합성(SPPS)을, 표준 웨타이드 합성 장비를 사용하여 수행하였다. 모든 웨타이드 및 웨타이드 컨쥬케이트들을 제조 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 장치(Waters, xTerra C18 10  $\mu$ m; 19 x 250 mm)를 사용하여 정제하고, 분석 RP-HPLC(Waters, X-Bridge C18 5  $\mu$ m; 3.0 x 50 mm) 및 액체 크로마토그래피/질량 분광법(LC/MS)에 의해 분석하였다. Varian 400 MHz NMR 분광계를 사용하여 1 H 스펙트럼을 수득하였다. 시료를 DMSO-d6/D20에서 진행시켰으며; 모든 1 H 신호를 잔여 또는 DMSO(2.50 ppm)를 참조로 하여 ppm으로 기록하고, 데이터를 s = 단일항, d = 이중항, t = 삼중항, q = 사중항 및 m = 다중항 또는 미해결(unresolved), b = 브로드(broad)로서 기록하였으며, 커플링 상수는 Hz이었다. 단백질 질량을 Ambrx 질량 분광법 설비에서 수득하였다(미국 캘리포니아주 라호이아 소재).

[0248] 실시예 17

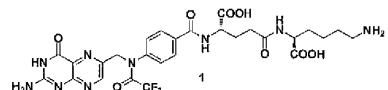
[0249] **발현 플라스미드, 이. 콜라이 세포주 W3110B60의 구축, 단백질 생성**

[0250] 발현 플라스미드(AXID)를 pET-20b(+) 및 pET-24(+) 플라스미드(EMD4Biosciences)로부터 구축하였다. 변형된 엔. 얀나쉬이 tRNA 신서타제(pAcPhe에 특이적임)로 구성된 호박 억제 카세트를 AXID의 BamHI 부위(유형 II 클로

닝) 내에 클로닝하였다. UCHT1 버전.2 Fab CD3 서열을 문헌<sup>1,2</sup>으로부터 수득하고, 개방형 해독틀 내의 phoA 프로모터의 다운스트림에서 AXID 백터 내로 서브클로닝하였다. 중쇄의 라이신 136(HC-Lys136)을 TAG 호박 넌센스 코돈으로 신속 교체하였다(Stratagene). 상동성 재조합<sup>3</sup>에 의해 하기 유전자형을 갖도록 야생형 이. 콜라이 K-12 W3110 세포주(ATCC)를 조작하였다: F-IN(*rrnD-rrnE*) 람다-*araB*::*g1 tetA fhuA*::*dhfr proSW375R*::*cat*. W3110B60 계놈에서 *proS*의 온도 민감성 표현형은 이러한 발현 플라스미드에서 *proS*의 야생형의 기능성 복사체(*cpos*)에 의해 보완되었다. 백터를 W3110B60 세포 내로 형질변환하고, 세포를 발효기 내에서 카나마이신 셀레이트(50 ug/mL)가 보완된 정해진 배지(2.1 L) 내에서 37°C, pH 7 및 480 rpm 내지 1200 rpm(캐스케이드)에서 성장시켰다. OD600 = 30에서, pH를 생성상에 대해 6.8로 이동시키고, 정해진 배지를 첨가하였다. 그런 다음, 물에 용해된 pAcPhe(100 g/L)을 발효기에 첨가하였다. 용존 산소를, 1차 교반(480 rpm 내지 1200 rpm)에 의해 30%를 유지하도록 설정하였다. 24시간 후, 세포를 수합하고, TES 완충제[0.2 M Tris pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.5 M 수크로스]와 4:1(v/w)의 비율로 4°C에서 인큐베이션함으로써 UCHT1을 삼투 쇼크에 의해 세포로부터 추출하였다. 추출물을 원심분리(18000 rpm, 20 min 및 4°C)에 의해 정제하고, 0.22 미크론 필터를 통해 여과시킨 다음, 단백질 G 컬럼(GE healthcare) 상에 로딩하였다. 컬럼을 pH 7.4에서 5 충진 부피(bed volume)의 PBS로 세척하고, 단백질을 10 충진 부피의 0.1 M 글리신-HCl, pH 3.0을 이용하여 용리하였다. 10%의 1 M Tris-HCl, pH 8을 함유하는 튜브 내로 분획을 수합하였다. 풀링된 분획(pooled fraction)을 양이온 교환에 의해 추가로 정제하고[컬럼: SP650S(Tosoh Bioscience), 완충제 A: 0.02 M 포스페이트(pH 6.0), 완충제 B: 0.5 M NaCl과 함께 0.02 M 포스페이트(pH 6.0)], SDS-PAGE 젤 및 질량 분광법에 의해 분석하였다.

### 실시예 18

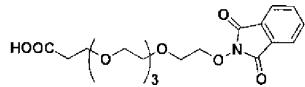
## 플레이트- $N^{10}$ (TFA)-Lys 링커(1)의 합성



플레이트-Lys을 H-Lys-(Boc)-2-ClTrt-수지 수지(Peptide international)로부터 출발하는 표준 고체상 웹타이드 합성을 사용하여 합성하였다<sup>4</sup>. 간략하게는, H-Lys-(Boc)-2-ClTrt-수지(500 mg, 0.89 mM)를 DCM(5 mL)에 의해 팽윤시키고, 후속해서 (다이메틸 포름아미드)(DMF, 5 mL)에 의해 팽윤시켰다. DMF(3 mL) 중 Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH(1.5 당량), HATU(1.5 당량) 및 DIPEA(4.0 당량)의 용액을 첨가하였다. 아르곤을 2시간 동안 벌링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 i-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. 커플링 효율을 카이저(Kaiser) 시험에 의해 평가하였다. DMF(3 mL)에서 수지를 팽윤시킨 후, DMF(3 mL) 중 프테로산(1.5 당량), HATU(1.5 당량) 및 DIPEA(4.0 당량)의 용액을 첨가하였다. 아르곤을 2시간 동안 벌링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 i-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. 커플링 효율을 카이저 시험에 의해 평가하였다. DMF(3 mL)에서 수지를 팽윤시키고 후속해서 아르곤 하에 건조한 후, 최종 화합물을 다이에틸 에테르(300 mL)를 함유하는 둥근 바닥 플라스크에 직접 결합된 트리플루오로아세트산(TFA):H<sub>2</sub>O:트리이소프로필실란(95.5:2.5:2.5) 각테일(3 x 5 mL)을 사용하여 수지로부터 절단하여, 침전된 미정제 생성물을 수득하였다. 여과 및 건조 후, 미정제 생성물을 제조 역상(RP)-HPLC(C18 컬럼, 25분 이내에 0% B - 50% B, 완충제 A: 물 중 0.1 TFA, 완충제 B: 아세토니트릴 중 0.1 TFA,  $\lambda$  = 280 nm)를 사용하여 정제하였다. ACN을 진공 하에 제거하고, 순수한 분획을 동결 건조하여, 1을 담황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1.18 (m, 2H, Pep-H); 1.45 (m, 1H, Pep-H); 1.54 (m, 3H, Pep-H); 1.81 (m, 1H, Pep-H); 1.95 (m, 1H, Pep-H); 2.11 (m, 2H, Pep-H); 2.88 (m, 2H, Pep-H); 3.94 (m, 1H, Lys- $\alpha$ H); 4.12 (m, 1H, Glu- $\alpha$ H); 4.46 (s, 2H, Pte-H); 6.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Pte-Ar-H); 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Pte-Ar-H); 8.60 (s, 1H, Pte-Ar-H). LC-MS (M + H)+: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>에 대해 계산된 값 = 665.6; 확인된 값 = 666.0 g/mol.

실시예 19

### 프탈이미드-PEG4-COOH의 합성

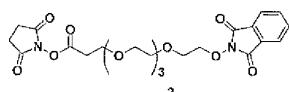


0°C, 아르곤 하에 무수 THF(0.50 mL) 중 트리페닐포스핀(TPP, 216.7 mg, 0.826 mmol) 및 다이에틸 아조다이카

르복실레이트(DEAD, 143.9 mg, 0.826 mmol)의 용액에 무수 THF 중 <sup>t</sup>BuOOC-PEG<sub>4</sub>-OH(200.0 mg, 0.751 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 15분 동안 교반한 후, 무수 THF 중 N-하이드록시 프탈이미드(134.8 mg, 0.826 mmol)의 용액을 10분에 걸쳐 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 아르곤 하에 12시간 동안 교반하였다. 진공 하에 용매를 제거한 후, TFA:트리이소프로필실란:물(95:2.5:2.5; 5 mL)을 미정제 생성물에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 교반하여, tert-부틸기를 탈보호하였다. 최종 생성물을 플래쉬 크로마토그래피(헥산:EtOAc = 1:1)에 의해 정제하였다. 조합된 순수한 분획의 용매를 진공 하에 증발시켜, 최종 생성물을 유성 액체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 2.63 (m, 2H); 3.59~3.65 (m, 14H); 3.88 (m, 2H); 4.38 (m, 2H); 7.75 (m, 2H), 7.84 (m, 2H) LC/MS (ESI) (m/z): (M + H)<sup>+</sup> C19H25N09에 대해 계산된 값, 411.4, 확인된 값, 411.4 g/mol.

[0259] 실시예 20

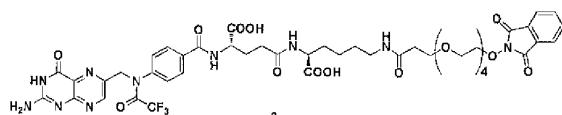
[0260] 프탈이미드-PEG4-NHS(2)의 합성



[0261] 아르곤 하에 무수 DCM(0.5 mL) 중 HOOC-PEG4-O-N-프탈이미드(50 mg, 0.122 mmol), N-하이드록시숙신이미드(NHS, 15.4 mg, 0.134 mmol) 및 4-다이메틸아미노프로필(DMAP, 1.5 mg, 0.0122 mmol)의 용액에 무수 DCM(0.5 mL) 중 에틸(다이메틸아미노프로필) 카르보다이이미드(EDC, 20.8 mg, 0.134 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 아르곤 하에 교반하고, 플래쉬 크로마토그래피(헥산:DCM = 1:1)에 의해 정제하여, NHS-PEG4-O-N-프탈이미드를 수득하였다. 조합된 순수한 분획의 용매를 진공 하에 증발시켜, 최종 생성물을 유성 액체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR: δ 2.90 (t, J=6.4, 2H); 2.75 (bs, 4H); 3.56~3.63 (m, 12H), 3.83~3.87 (m, 4H), 4.37 (t, J=4.5, 2H); 7.75 (m, 2H), 7.83 (m, 2H). LC/MS (ESI) (m/z): (M + H)<sup>+</sup> C23H28N2O11에 대해 계산된 값, 508.5, 확인된 값, 509.0 g/mol.

[0263] 실시예 21

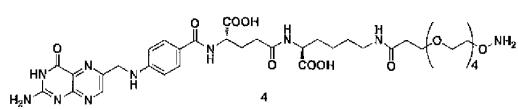
[0264] 폴레이트- Lys-PEG4-프탈이미드(3)의 합성



[0265] 아르곤 하에 무수 DMSO(300  $\mu$ L) 중 NHS-OC-PEG4-O-N-프탈이미드(21 mg, 0.041 mmol) 및 폴레이트-N<sup>10</sup>(TFA)-Lys(25 mg, 0.037 mmol)의 용액에 DIPEA(101.4  $\mu$ L, 0.601 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 계속 교반하고, 반응의 진행을 LC/MS에 의해 확인하였다. 최종 생성물을 RP 제조 HPLC(C18 컬럼, 25분 이내에 0% B - 50% B, 완충제 A: 물 중 0.1 TFA, 완충제 B: 아세토니트릴 중 0.1 TFA,  $\lambda$  = 280 nm)을 사용하여 정제하였다. 진공 하에 ACN을 제거한 후, 순수한 분획을 동결건조하여, 담황색 고체를 수득하였다. LC/MS (ESI) (m/z): (M + H)<sup>+</sup> C46H53F3N10O16에 대해 계산된 값, 1058.9, 확인된 값, 1059.0 g/mol.

[0267] 실시예 22

[0268] 폴레이트- Lys-PEG4-아미노옥시 링커(4)의 합성

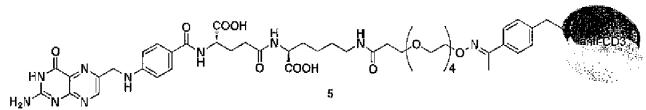


[0269] DMSO(1 mL) 중 폴레이트-N10(TFA)-Lys-PEG-프탈이미드(30 mg, 0.028 mmol)의 용액에, 하이드라진(13  $\mu$ L, 0.42 mmol)을 첨가하고, 반응물의 pH를 9.35에서 유지시켰다. 프탈이미드 및 TFA 기의 탈보호를 LC/MS를 사용하여 모니터링하였다. 폴레이트-Lys-PEG4-아미노옥시 링커를 역상 제조 HPLC(C18 컬럼, 25분 이내에 0% B - 50% B, 완충제 A: 물 중 0.1 TFA, 완충제 B: 아세토니트릴 중 0.1 TFA,  $\lambda$  = 280 nm)를 사용하여 정제하였다. 진공 하에 ACN을 제거한 후, 순수한 분획을 동결건조하여, 황색 고체를 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>/ D<sub>2</sub>O) δ 1.88 (m, 1H, Pep-H); 2.03 (m, 1H, Pep-H); 2.15 (t, J = 7.4, 2H); 2.28 (t, J = 6.4, 2H); 3.05 (m, 4H); 3.20~3.60

(m, xH); 3.94 (m, 1H, Lys- $\alpha$ H); 4.23 (m, 1H, Glu- $\alpha$ H); 4.48 (s, 2H, Ptc-H); 6.64 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ptc-Ar-H); 7.64 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ptc-Ar-H); 8.63 (s, 1H, Pte-Ar-H); LC/MS (ESI) (m/z): (M + H)<sup>+</sup> C36H52N10013에 대해 계산된 값, 832.9 g/mol, 확인된 값, 833.0 g/mol.

실시예 23

### 플레이트-항-CD3 컨쥬게이션



PBS pH 7.4(1 mL) 중 pAcPhe(10 mg, 0.21  $\mu$ mol)을 함유하는 항-CD3 Fab의 용액을 50 nM 소듐 아세테이트 pH 4.0(900  $\mu$ L)으로 완충 교환하였다. 1 M 아세틱 하이드라자이드(100  $\mu$ L)를 첨가한 후, 폴레이트-Lys-PEG4-아미노옥시 텁커(1.7 mg, 2.10  $\mu$ mol)를 반응 혼합물에 첨가하고, 28°C에서 48시간 동안 진탕하면서(50 rpm) 인큐베이션하였다. 반응 진행을 RP-HPLC(Zorbax 300SB C3 컬럼, 4.6x150 mm; Agilent)에 의해 모니터링하였다. 컨쥬게이트를 30% B로부터 90% B까지(A, 물, 0.1% TFA; B, 아세토니트릴, 0.1% TFA) 선형 구배를 이용하여 용리하였다. Agilent 1100 시리즈 HPLC 시스템 및 Chemstation 소프트웨어를 사용하여, 폴레이트-ting커와 컨쥬게이트된 Fab의 퍼센트를 분해(resolve)하고 정량화하였다. 반응을 48시간 이내에 완료하였으며, 전환 효율은 95% 초과이었다. 최종 컨쥬게이트를 양이온 교환 컬럼(SP 650S, Tosoh Biosciences)을 사용하여 정제하고, PBS 내로 완충 교환하였으며, 사용 시까지 4°C에서 저장하였다. 예상된 MS: 48539.64 Da, 관찰된 MS: 48538.89 Da.

### 실시예 24

### 시험관내 효능 연구

표적 세포-KB, OVCAR-3, SKOV-3 및 OV-90 세포들을 10% FBS, 100 단위/ml의 페니실린 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 보완된 폴레이트-무함유 RPMI-1640에서 적어도 5회 계대배양 동안 유지시킨 후, 이를 세포를 검정법에 사용하였다. Jurkat 세포 및 A549 세포를 10% FBS, 100 단위/ml의 페니실린 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 보완된 RPMI-1640에서 유지시켰다. 모든 세포들을 5% 이산화탄소, 95% 공기-보습화된 분위기 하에 37°C에서 단일층으로서 성장시켰다.

FR 발현을 위해, 세포를 R&D systems사의 항-FR-PE 항체(청색) 및 IgG1-아이소타입-PE 대조군(적색)과 함께 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 결합을 유세포분석에 의해 검정하였다. KB 세포 또는 A549 세포를 T75 플라스크 내로 접종하고, 48시간 동안 단일층을 형성하도록 놔두었다. 트립신 절단 후, 세포를 원심분리튜브( $1 \times 10^6$  개 세포/튜브) 내로 옮기고, 원심분리하였다. 배지를, 증가하는 농도의 폴레이트-FITC를 함유하는 신선한 배지로 대체하고, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 신선한 배지( $2 \times 1.0 \text{ mL}$ ) 및 PBS( $1 \times 1.0 \text{ mL}$ )로 헹군 후, 세포를 PBS( $1.0 \text{ mL}$ )에 재현탁시키고, 세포 결합된 형광( $30,000$ 개 세포/시료)을 유세포분석기에 의해 분석하였다. KB 세포를 T75 플라스크 내로 평판배양하고, 48시간 동안 단일층을 형성하도록 놔두었다. 트립신 절단 후, 방출된 세포를 원심분리튜브( $1 \times 10^6$  개 세포/튜브) 내로 옮기고, 원심분리하였다. 각각의 튜브 내의 소모된 배지를 신선한 배지( $0.5 \text{ mL}$ ) 중 증가하는 농도( $0.1 \text{ nM}$  내지  $0.8 \text{ nM}$ )의 항-CD3 Fab-폴레이트의 존재 하에  $100 \text{ nM}$  FA-FITC로 대체하였다. 4°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 배양 배지( $2 \times 1.0 \text{ mL}$ ) 및 PBS( $1 \times 1.0 \text{ mL}$ )로 헹구어서, 임의의 비결합된 방사성 활성을 제거하였다. 그런 다음, 세포를 PBS( $0.5 \text{ mL}$ ) 내에 재현탁하고, 세포 결합 형광을 유세포분석기에 의해 계수하였다.

인간 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를, Ficoll Hypaque Plus(GE Healthcare) 구배 원심분리를 사용하여 연막(buffy coat)(샌디에고 혈액 은행)으로부터 단리하였다. 단일 공여자로부터 충분한 세포가 수득되지 않는 경우, 몇몇 공여자들을 이용하였지만, 시험관내 또는 생체내에서 사용되는 경우 각각을 분리된 채로 유지시켰다(즉, 함께 혼합하지 않았음). PBMC를 rhIL-2(100 ng/ml) 및 GMCSF(100 ng/ml)의 존재 하에 aCD3/aCD28 초자기 비드(Life Technologies)를 이용하여 활성화시켰다.

세포독성을 검정법을 위해, 표적 세포를 아쿠타제(Accutase)를 이용하여 플라스크로부터 탈착시키고, U 바닥 96웰 플레이트 내에 접종하였다. 활성화된 PBMC(효과기 세포) 또는 비-활성화된 PBMC(효과기 세포)를 표적화된 세포에 특정한 표적: 효과기 세포 비율로 첨가하였다. 항-CD3 플레이트를 공동 배양물에 첨가된 완전 배양 배지에서 희석시키고, 간단한 원심분리 후, 플레이트를 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. LDH 방출에 의한 세포독성에 대해, LDH를 Promega사의 키트를 제조업체의 지시에 따라 사용하여 측정하였다. 유세포분석법

에 의한 세포독성에 대해, 세포를 DIO(녹색 원형질막 염색)를 이용하여 표지하고, 프로피디움 요오다이드를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도까지 첨가하였다<sup>9</sup>. ATP 함량에 의한 세포독성에 대해, 24시간 후에 PBMC를 세척하고, KB 세포의 ATP 함량을 Cell Titer Glo(Promega)를 사용하여 측정하였다.

[0281] 실시예 25

[0282] **약물동력학적 연구**

[0283] 항-CD3 Fab-폴레이트 및 비컨쥬케이션된 CD3 Fab를 스프라그-돌리 래트(Charles River Laboratories)에게 단일 볼루스 정맥내 주사로서 투여하였다. 혈액을 정기적인 간격으로 수합하고, 항-CD3 Fab-폴레이트를 래트 혈청에서 ELISA에 의해 정량화하였다. 컨쥬케이트의 약물동력학적 특성을 시간 대 혈청 농도로서 측정하였다.

[0284] 실시예 26

[0285] **생체내 효능 연구**

[0286] 6주령 내지 8주령의 암컷 NOD-SCID 마우스를 TSRI 동물 설비 또는 The Jackson Laboratory로부터 구매하고, 연구 시작 전 적어도 2주 동안 감마-조사된 폴레이트-결핍 특수 식이요법(Teklad)으로 유지시켰다. 동물을 벽이 있는 병원체-무함유 클로키드 랙(cloaked rack) 내에서 1개 케이지 당 5마리씩 사육하였다. 오토클레이브된 수돗물 및 사료를 자유롭게 제공하였다. 마우스를 꼬리 기부(base)에서의 타투 또는 귀 편치에 의해 개별적으로 식별하였다. 모든 동물 절차들은 스크립스 리서치 인스티튜트 동물 케어 및 사용 위원회(The Scripps Research Institute Animal Care and Use Committee) 및 Ambrx, Inc. 동물 케어 및 사용 위원회에 의해 승인을 받았으며, 동물의 인도적인 취급을 위한 국내 및 국제 가이드라인에 따라 수행되었다.

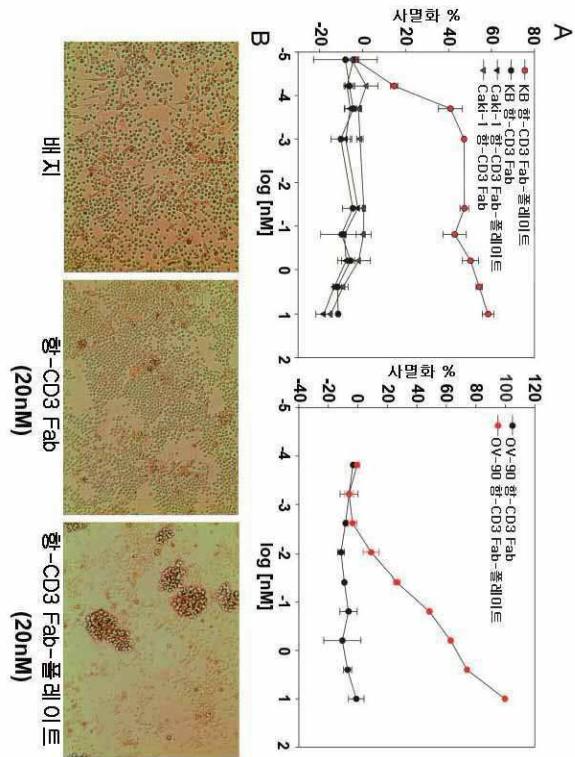
[0287] 종양 세포( $5 \times 10^5$  개의 KB 세포/마우스)를 활성화된 또는 비-활성화된 PBMC(특정한 표적: 효과기 세포 비율)와 혼합하고, 좌측 옆구리에 200  $\mu\text{l}$  주사로서 피하 이식하였다. 동물에게 1.5 mg/kg 항-CD3 Fab-폴레이트 또는 PBS를 종양 세포 이식과 동일한 일자에 시작하여 매일 정맥내로 10회 주사(검정색 화살표)로서 치료하되, 주말이 있는 경우 투약 시 가끔식 2일의 휴지기(break)가 존재하였다. 종양 성장을 1주일에 2회 2개의 수직 방향을 측정함으로써 모니터링하고, 부피를 식  $V = (L \times W \times W)/2$ 를 사용하여 추정하였으며, 여기서,  $V$ 는 부피이며,  $W$  = 최단 직경이고,  $L$ 은 최장 직경이었다. 마우스를 전자 체중계 상에서 침량하여, 체중을 확인하였다. 그룹의 평균 종양 크기가 대략 1,000  $\text{mm}^3$ 에 도달하였을 때, 또는 투약 후 35일째 중 어느 것이 먼저 발생하든지 간에, 실험을 종료하였다.

[0288] 면역조직학적 분석을 위해, 이소플루란을 사용하여 동물을 안락사시키고, 종양뿐만 아니라 다양한 기관들을 단리하고, 포르말린-아연 내에서 밤새 고정하였다. 조직을 파라핀에서 포매시키고, 염색을 위해 박절하였다. 혈마 톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 표준 프로토콜에 따라 수행하고, 슬라이드를 Leica 스캐너를 사용하여 스캐닝하였다.

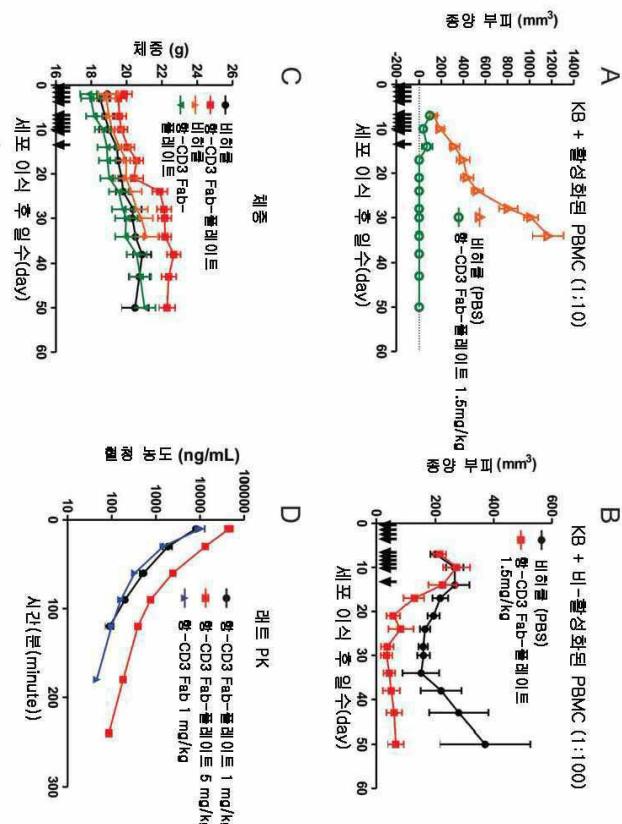
[0289] 본원에 기재된 실시예 및 실시형태는 예시를 목적을 할 뿐이고, 이의 측면에서 다양한 변형 또는 변화들이 당업자에게 제시될 것이고, 본 출원의 사상 및 권한 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되어야 함을 이해한다. 본원에서 인용된 모든 공개, 특허 및 특허 출원들은 이들 전체가 모든 목적을 위해 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

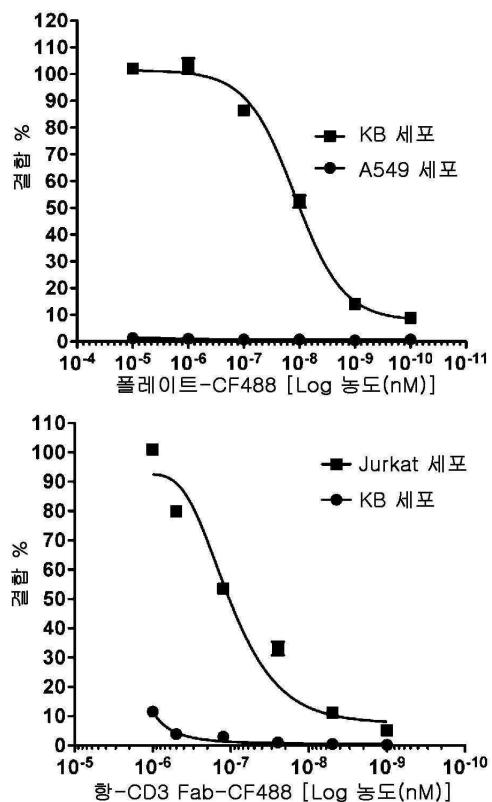
도면1



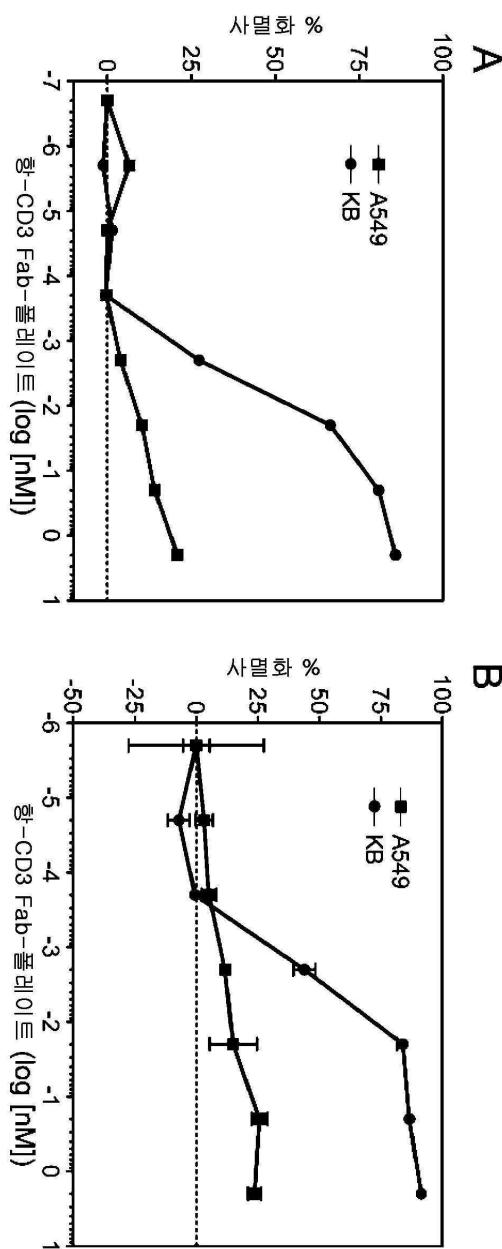
## 도면2



## 도면3

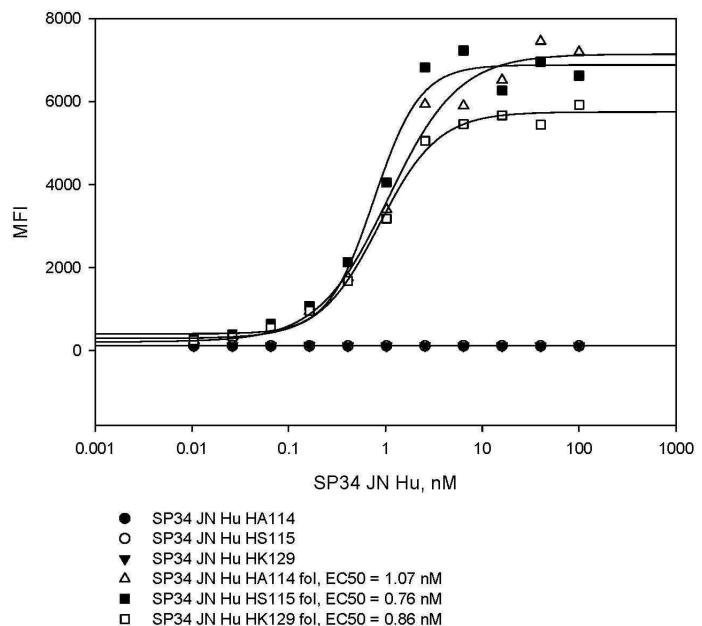


도면4



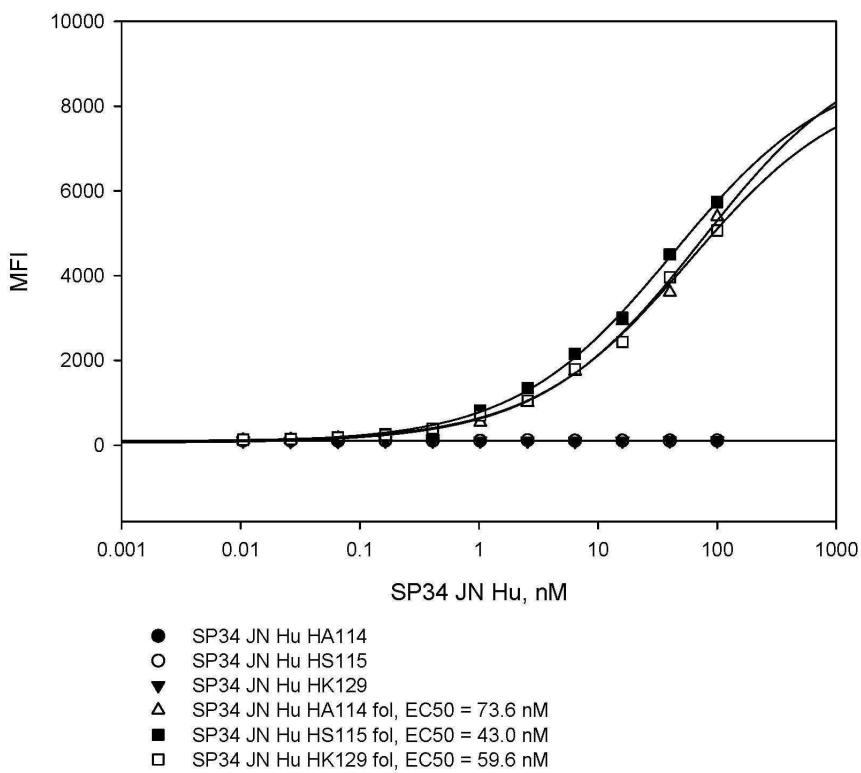
## 도면5

SP34 JN Hu Fab, 및 SKOV-3에의 컨쥬게이트의 결합  
검정법 배지는 플레이트-무함유임



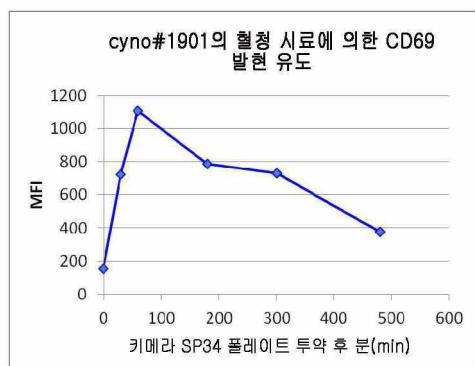
## 도면6

SP34 JN Hu Fab, 및 SKOV-3에의 컨쥬게이트의 결합  
검정법 배지는 50 nM SFA를 함유함

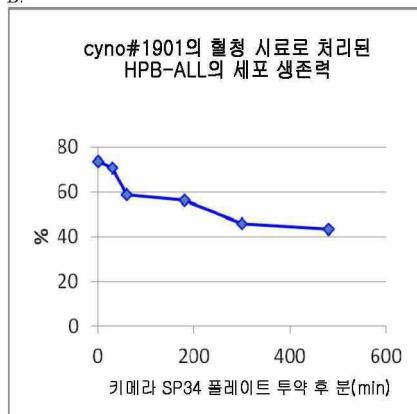


## 도면7

A.

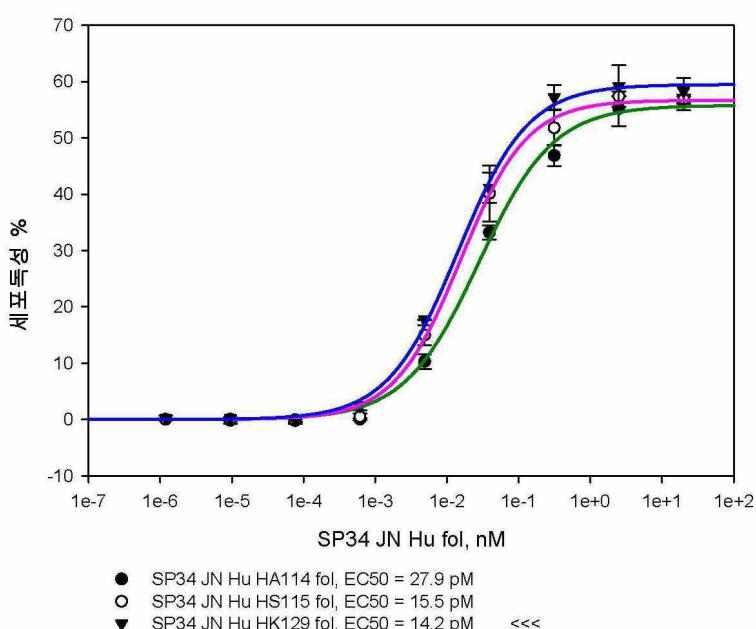


B.



## 도면8

인간 PBMC, 50 nM SFA, 반복



## 서 롤 목 록

## SEQUENCE LISTING

<110> Ambrx, Inc.  
 <120> Anti-CD3-folate conjugates and their uses  
 <130> P072792WO  
 <140> PCT/US2016/060087  
 <141> 2016-11-02  
 <150> 62/374693  
 <151> 2016-08-12  
 <150> 62/250451  
 <151> 2015-11-03  
 <150> 62/267086  
 <151> 2015-12-14  
 <160> 15  
 <170> SeqWin2010, version 1.0  
 <210> 1  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized variable heavy chain sequence of anti-CD3 antibody  
 <400> 1  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr 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	
Gly 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 Asn Ser			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe			

100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 <210> 2  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 ><223> Humanized variable heavy chain sequence of anti-CD3 antibody  
 <400> 2  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 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 Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
  
 115 120 125  
 <210> 3  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized variable heavy chain sequence of anti-CD3 antibody  
 <400> 3  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 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 Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 <210> 4  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized variable light chain sequence of anti-CD3 antibody  
 <400> 4  
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
  
 20 25 30

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

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 7

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 7

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

1 5 10 15

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

Gly 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 Asn Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110	
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gln Ala Val			
115	120	125	
Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr			
130	135	140	
Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala			
145	150	155	160
Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Tyr			
165	170	175	
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
180	185	190	
Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu			
195	200	205	
Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val			
210	215	220	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
225	230	235	
<210> 8			
<211> 235			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody			
<400> 8			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 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	
Gly 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 Asn Ser			

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly

165 170 175

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 9

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly 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 Asn Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gln 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 Gln Ala Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 10

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys 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 Asn Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 11

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

&lt;400&gt; 11

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly

165 170 175

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 12

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 12

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 13

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 13

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140  
 Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala  
  
 145 150 155 160  
 Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr Leu Ile Tyr  
 165 170 175  
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 180 185 190  
 Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu  
 195 200 205  
 Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val  
  
 210 215 220  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230 235  
 <210> 14  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody  
 <400> 14  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 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 Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
  
 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly

165 170 175

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

225 230 235

<210> 15

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized variable heavy and light chain sequence of anti-CD3 antibody

<400> 15

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

1 5 10 15

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