



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월12일

(11) 등록번호 10-2163669

(24) 등록일자 2020년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **C07K 16/00** (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7002803

(22) 출원일자(국제) 2012년07월06일
 심사청구일자 2017년07월06일

(85) 번역문제출일자 2014년02월03일

(65) 공개번호 10-2014-0146040

(43) 공개일자 2014년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/063339

(87) 국제공개번호 WO 2013/004842
 국제공개일자 2013년01월10일

(30) 우선권주장
 61/504,994 2011년07월06일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
 W02006104989 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠맵 비. 브이
 네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 워살라란 15

(72) 발명자
파렌, 폴
 네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60
젠맵 비.브이. 내
보이르스켄스, 프랭크
 네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60
젠맵 비.브이. 내
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 **항체 변이체 및 그의 용도****(57) 요약**

변이체 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드 및 관련 항체를 본원에서 설명한다. 변이체 Fc 도메인은 폴리펩티드 (들) 또는 항체(들)이 세포의 표면 상의 그의 표적, 항원(들)에 결합할 때 안정화된 Fc:Fc 상호작용을 제공하고, 따라서 개선된 이펙터 기능, 예컨대 CDC-반응을 제공한다.

(72) 발명자

데 중, 룽 엔.

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비.브이. 내

랍리즌, 아란 프랭크

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비.브이. 내

슈르만, 야닌

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 유트레흐트 알리란 60 젠
맵 비.브이. 내

(30) 우선권주장

PA 2011 00519 2011년07월06일 덴마크(DK)

PA 2012 00371 2012년05월30일 덴마크(DK)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함하고, 여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K인, 상기 모 폴리펩티드의 이펙터 기능을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 모 폴리펩티드가 모 항체인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 모 항체가 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적 항체인 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 모 항체가 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환은 제2 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환과 상이한 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 기능이 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 이펙터 기능인 방법.

청구항 6

(i) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따라 돌연변이된 모 폴리펩티드 또는 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물을 제공하는 단계; 및

(ii) 단계 (i)의 돌연변이된 모 폴리펩티드의 제제 또는 단계 (i)의 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 돌연변이된 조합물을 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온과 접촉시키는 단계

를 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드가 결합하는 표적을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 이펙터 반응을 유도하는 방법.

청구항 7

(i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하고;

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함하며,

여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 S440K인,

이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물의 특이성을 증가시키는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

(i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 항체에 도입하고;

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 항체에 도입하는 것을 포함하며,

여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 S440K인

적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물의 특이성을 증가시키는 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제2항, 제3항, 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 모 항체 또는 제1 모 항체 및 2 모 항체의 조합물이 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE, 임의로 인간 전장 항체, 또는 인간 전장 IgG1 항체인 방법.

청구항 11

인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K인, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체.

청구항 12

제11항에 있어서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K인, 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 모 항체의 변이체.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택되는 변이체.

청구항 14

제13항에 있어서, 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 제1 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이를 포함하는 변이체.

청구항 15

제14항에 있어서, 이중특이적 항체이고, 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함하고, 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이는 상기 제2 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이와 상이한 것인 변이체.

청구항 16

제11항 또는 제12항에 있어서, 약물, 독소, 또는 방사성표지에 접합되거나, 링커를 통해 독소에 접합되는 변이체.

청구항 17

제11항 또는 제12항에 있어서, 융합 단백질의 일부인 변이체.

청구항 18

제11항 또는 제12항에 있어서, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체, 임의로 인간 전장 항체, 또는 인간 전장 IgG1 항체인 변이체.

청구항 19

모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고,

상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하며, 여기서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 K439E이고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이가 S440K인,

인간에서의 암의 치료를 위한 것인 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 모 폴리펩티드의 제1 변이체가 모 항체의 제1 변이체이고 모 폴리펩티드의 제2 변이체가 모 항체의 제2 변이체이며, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 제1 변이체가 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서 상기 제1 변이체는

- (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
 - (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
 - (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
 - (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
 - (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하고;
- 제2 변이체가 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서 상기 제2 변이체

는

- (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기

의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아닌 것인 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 변이체가 인간IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 변이체 및 제2 변이체가 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체, 임의로 각각 인간 전장 항체, 또는 각각 인간 전장 IgG1 항체인 조성물.

청구항 25

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 변이체 및 제2 변이체가 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 26

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 변이체가 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 조성물.

청구항 27

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두가 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 또는 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두가 링커를 통해 독소에 접합되는 것인 조성물.

청구항 28

제11항 또는 제12항에 따른 변이체 또는 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 조성물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 인간에서의 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

인간에서의 암의 치료를 위한 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한, 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 정의된 제1 변이체 및 제2 변이체를 포함하는 부분들의 키트.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 변이체 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드 및 관련 항체에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 Fc-도메인 내의 하나 이상의 아미노산 변형에 의해 변형된 이펙터 (effector) 기능을 갖는 Fc 도메인-함유 항체 또는 폴리펩티드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체의 Fc 영역에 의해 매개되는 이펙터 기능은 외래 실체 (entity)의 파괴, 예컨대 병원체의 사멸 및 항원의 소실을 허용한다. 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및 항체-의존적 세포-매개된 포식작용 (ADCP)은 Fc 수용체 (FcR)-보유 세포에 대한 Fc 영역의 결합에 의해 개시되는 반면에, 보체-의존적 세포독성 (CDC)은 보체 활성화의 전통적인 경로를 개시하는 C1q에 대한 Fc 영역의 결합에 의해 개시된다.

[0003] 각각의 IgG 항체는 C1q에 대한 2개의 결합 부위 (각각의 중쇄 불변 (Fc) 영역에 하나씩)을 함유한다. 그러나, 용액 내의 IgG의 단일 분자는 단량체성 IgG의 C1q에 대한 친화도가 매우 약하기 때문에 ($K_d \sim 10^{-4}$ M) 보체를 활성화하지 못한다 ([Sledge et al., 1973 J. Biol. Chem. 248,2818-13]; [Hughes-Jones et al., 1979 Mol. Immunol. 16, 697-701]). IgG의 항원-유도 회합은 다가 C1q 분자의 훨씬 더 강한 결합 ($K_d \sim 10^{-8}$ M) 및 보체 활성화를 야기할 수 있다 (Burton et al., 1990 Mol. Immunol. 22, 161-206). 이와 대조적으로, IgM은 천연적으로 공유 결합된 오량체 또는 육량체로 존재하고, 세포 발현된 또는 고정된 항원에 결합시에 IgM 오량체 및 육량체는 CDC를 효율적으로 유도할 수 있다. 항원-결합은 C1q 결합 부위를 노출시키기 위해 IgM 내의 입체형태적 변화를 유도하기 위한 요건이다 (Feinstein et al., 1986, Immunology Today, 169-174).

[0004] 또한, IgG는 Fc 영역의 CH2/CH3 도메인의 상호작용을 통한 육량체 고리 구조의 형성에 의해 보체 활성화를 달성할 수 있다고 제안되었다 (Burton et al., 1990 Trends in Biochem. Sci. 15, 64-69). 그러한 육량체 IgG 구조의 존재를 지지하는 증거가 2차원 ([Reidler et al., 1986 I Handbook of Experimental Immunology 4th edit. (Weir, D. M. ed.), pp17.1-17.5. Blackwell, Edinburgh]; [Pinteric et al., 1971 Immunochem. 8, 1041-5]) 및 3차원 결정에서, 및 용액 내의 IgG1, IgG2a 및 IgG4 및 인간 Fc에 대해서 관찰되었다 (Kuznetsov et al., 2000 J Struct. Biol. 131, 108-115). 육량체 고리 형성은 또한 HIV-1 gp120에 대해 작용하는 b12 인간 IgG1 κ 항체의 결정 구조 (PDB 내의 1HZH)에서 관찰되었다 (Saphire et al., Science 2001 Aug 10; 293(5532), 1155-9). b12 육량체 고리에서, 각각의 6개의 항체로부터 하나씩 6개의 접근가능한 C1q 결합 부위가 육량체 표면에 존재하고, 다른 6개의 결합 부위는 아래로 향한다.

[0005] C1q는 6개의 콜라겐성 줄기에 묶인, 항체 조합 영역을 함유하는 6개의 구상 헤드를 갖는 톨립 다발과 유사하다 ([Perkins et al., 1985 Biochem J. 228, 13-26]; [Poon et al., 1983 J Mol Biol. 168, 563-77]; [Reid et al., 1983 Biochem Soc Trans 11, 1-12]; [Weiss et al., 1986 J. Mol. Biol. 189, 573-81]). C1q는 1HZH 결정 구조의 b12 육량체 회합체에 잘 들어맞아서, 각각의 6개의 구상 헤드가 6개의 C1q 결합 부위와 접촉하는 것으로 밝혀졌다 ([Parren, FASEB Summer Research Conference, Snowmass, Co., 5-10 July 2010]; ["Crystal

Structure of an intact human IgG: implications for HIV-1 neutralization and effector Function", Thesis by Erica Ollmann Saphire, for the Scripps Research Institute, La Jolla, California. November 2000]). 결정 구조에서 대칭 관련 b12 항체 사이에서 관찰된 Fc 계면 내의 선택된 아미노산의 돌연변이는 C1q의 결합력 (avidity)을 감소시키는 것으로 관찰되었고, 이것은 이들 아미노산이 분자간 Fc:Fc 상호작용에 기여함을 나타낸다.

- [0006] US 2011/0123440에는 변경된 항체 Fc-영역 및 그의 용도가 기재되어 있다. 변경된 Fc-영역은 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0007] US 2008/0089892에는 폴리펩티드 Fc-영역 변이체, 및 이들 Fc-영역 변이체를 포함하는 조성물을 설명되어 있다.
- [0008] US 2010/0184959에는 변경된 Fc 리간드 인식 및/또는 이펙터 기능을 갖는 Fc 폴리펩티드 변이체의 제공 방법이 기재되어 있다.
- [0009] US 2010/015133에는 폴리펩티드 회합을 조절함으로써 폴리펩티드를 생산하는 방법을 설명되어 있다.
- [0010] US 2010/105873에는 다중도메인 단백질 치료제의 생성을 위한 조직화된 방법이 기재되어 있다.
- [0011] US 6,737,056에는 변경된 이펙터 기능을 갖는 폴리펩티드 변이체가 설명되어 있다.
- [0012] 이전의 노력은 향상된 이펙터 기능 또는 다른 변형된 특성을 갖는 항체 Fc-변이체를 확인하기 위해 시도되었다. 상기 연구는 예를 들어 키메라 (chimeric) IgG 분자의 생성을 위한 IgG 이소형 사이의 분절 교환 (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72) 또는 힌지 (hinge) 영역 (Dall'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138) 내의 또는 잔기 D270, K322, P329, 및 P331를 중심으로 이루어진 CH2 도메인 내의 C1q-결합 부위 내 또는 근처의 아미노산 치환에 초점을 맞추었다 ([Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575]; [Michaelson et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564] 및 WO 99/51642). 예를 들어, 문헌 [Moore et al. 2010 mAbs 2(2), 181-189]에는 CDC 또는 ADCC를 통한 향상된 이펙터 기능에 대한 S267E, H268F, S324T, S239D, I332E, G236A 및 I332E의 다양한 조합의 시험이 기재되어 있다. Fc-수용체에 대한 결합 (WO 2006/105062, WO 00/42072, 미국 특허 6,737,056 및 미국 특허 7,083,784) 또는 항체의 물리적 특성 (WO 2007/005612 A1)에 영향을 주는 다른 Fc 돌연변이도 제시되었다.
- [0013] 그러나, 관련 기술 분야에서 이들 및 다른 진전에도 불구하고, 새롭고 개선된 항체-기반 치료제에 대한 필요성이 계속 존재한다.

발명의 내용

- [0014] **발명의 개요**
- [0015] 본 발명은 모 폴리펩티드/항체에 비해 향상된 이펙터 기능을 갖는 폴리펩티드 및 항체 변이체를 제공한다. 이론에 제한되지 않지만, 변이체는 2개의 폴리펩티드/항체 분자의 Fc 영역 사이의 보다 안정한 결합 상호작용이 가능하여, 향상된 이펙터 기능, 예컨대 증가된 또는 보다 특이적인 CDC 반응을 유도하는 보다 많은 활발한 표면을 제공할 수 있는 것으로 생각된다. 특정 변이체는 또한 개선된 ADCC 반응, ADCP 반응, 및/또는 다른 향상된 이펙터 기능을 특징으로 한다. 상기 폴리펩티드/항체 조작용의 미세한 메커니즘은 예를 들어 본원에서 설명되는 바와 같은 항체-기반 치료제의 효능 또는 특이성을 증가시키기 위해 적용될 수 있다.
- [0016] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0017] 본 발명은 또한 예를 들어 항원-발현 세포의 표면, 세포막 또는 비리온 상의 항원에 결합할 때 폴리펩티드 또는 항체에 의해 매개되는 이펙터 기능을 증가시키기 위한 적어도 하나의 상기 돌연변이의 용도를 제공한다.
- [0018] 한 측면에서, 본원에서 "단일-돌연변이체"로서 언급되는 변이체는 모 폴리펩티드 또는 항체에 비해 증가된 이펙터 기능을 갖는다.
- [0019] 한 측면에서, 본원에서 "이중-돌연변이체"로서 언급되는 변이체는 상기 분절 내에 적어도 2개의 돌연변이를 포함하고, 2개의 돌연변이 중 하나만 포함하는 변이체, 모 폴리펩티드 또는 항체, 또는 둘 모두에 비해 개선된 이펙터 기능을 갖는다.

- [0020] 한 측면에서, 본원에서 "혼합된-돌연변이체"로서 언급되는 변이체는 하나 이상의 변이체, 제2 변이체, 및 모 폴리펩티드 또는 항체 단독에 비해, 상기 분절 내의 상이한 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 동일하거나 상이한 폴리펩티드 또는 항체의 제2 변이체와 조합 사용될 때 증가된 이펙터 기능을 제공한다.
- [0021] 일반적으로, 돌연변이는 아미노산 치환, 예컨대 모 아미노산 잔기를, 새로운 분자간 Fc:Fc 결합의 형성을 촉진하거나 또는 존재하는 쌍의 상호작용 강도를 증가시키는 상이한 크기 및/또는 물리화학적 특성을 갖는 잔기로 교체하는 돌연변이이다. 본 발명에 따른 돌연변이의 예시적인 아미노산 잔기는 예시적인 아미노산 치환과 함께 표 1과 2A 및 B에 제시된다. 본 발명의 상이한 측면의 비-제한적인 예가 도 1에 제시된다.
- [0022] 본 발명의 이들 및 다른 측면, 특히 항체 변이체의 다양한 용도 및 치료적 적용이 아래에서 보다 상세히 설명된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1: (a) 육량체 형성시의 IgG 분자의 모식도. 점선 원은 2개의 이웃하는 IgG 분자의 2개의 인접한 Fc:Fc 상호작용 쌍을 보여준다. 박스 내의 화살표는 b, c 및 d의 도면이 관찰되는 방향을 보여준다: 2개의 이웃하는 Fc 분자는 90도 회전하고 (도면의 평면에서), Fab-아암 (arm)으로부터 CH3 도메인의 방향으로 관찰된다. (b) CDC에 대한 올리고머화-증진 돌연변이의 관찰된 효과. 본 발명의 단일 돌연변이체 및 이중 돌연변이체 측면에 따라 증가된 효능을 갖는 Fc:Fc 상호작용 쌍을 보여주는 모식도. (c) CDC에 대한 올리고머화-억제성 돌연변이의 관찰된 효과. 본 발명의 이중 돌연변이체 및 혼합된 돌연변이체 측면에 따라 Fc:Fc 상호작용을 회복하거나 증가시키기 위해, 서로 보완하는 적어도 2개의 올리고머화-억제성 돌연변이가 어떻게 하나의 분자로 조합되거나 (이중 돌연변이체 측면), 또는 2개의 분자로 분리될 수 있는지 (혼합된 돌연변이체 측면) 보여주는 모식도. 혼합된 돌연변이체는 상이한 표적을 인식할 수 있는, 두 항체의 결합에 의존적인 특이적인 이펙터 기능 활성화를 달성한다. (d) CDC에 대한 C1q 결합-억제성 돌연변이의 이론적 효과. 돌연변이가 C1q-결합을 억제하면, C1q는 항체에 도입된 결합을 보완할 수 없기 때문에 이들이 CDC 활성을 회복하기 위해 조합되거나 혼합될 수 없음을 보여주는 Fc:C1q 상호작용의 모식도.
- 도 2: 카바트 (Kabat)에서 제시된 EU 인덱스 (index)에 의해 넘버링 (numbering)된, Clustal 2.1 소프트웨어를 사용한, IgG1 중쇄 내의 잔기 P247 내지 K447에 대응하는 인간 IgG1, IgG1f, IgG2, IgG3 및 IgG4 Fc 분절의 서열 정렬. 제시된 서열은 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 (서열 1; UniProt 수탁번호 P01857)의 및 동종이형 변이체 IgG1m(f)의 잔기 130 내지 330; IgG2 중쇄 불변 영역 (서열 2; UniProt 수탁번호 P01859)의 잔기 126 내지 326; 및 IgG3 중쇄 불변 영역 (서열 3; UniProt 수탁번호 P01860)의 잔기 177 내지 377; 및 IgG4 중쇄 불변 영역 (서열 4; UniProt 수탁번호 P01861)의 잔기 127 내지 327을 나타낸다.
- 도 3a 및 b: IgG1 (서열 3), IgG4 (서열 5) 및 (부분적인) IgG3 (서열 6) 백본 내의 항-EGFr 항체 2F8의 서열 정렬. 카바트 및 EU-인덱스에 따른 아미노산 넘버링이 제시된다 (둘 모두 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 설명되어 있다).
- 도 4: 야생형, 비변형된 Fc 및 Fc' 분자 사이의 상호작용을 보여주는, 다량체 (예를 들어, 육량체) 배열에서 인접한 분자의 Fc (각각 Fc 및 Fc') 사이의 K439/S440 상호작용의 상세도.
- 도 5: K439E 및 S440K 돌연변이를 포함하는 변이체 Fc 및 Fc' 분자 사이의 상호작용을 보여주는, 다량체 (예를 들어, 육량체) 배열에서 인접한 분자의 Fc (각각 Fc 및 Fc') 사이의 K439/S440 상호작용의 상세도.
- 도 6: 7D8 Fc:Fc 돌연변이체를 사용한 C1q 결합 ELISA. 나타난 항체의 농도 계열을 미량역가 플레이트의 웰에 코팅하고, 고정된 농도의 C1q와 함께 인큐베이팅하였다. C1q에 결합하는 효율은 I253D를 제외하고 모든 코팅된 돌연변이체에서 야생형 7D8와 대등하였다. 적어도 3개의 대표적인 실험이 제시된다.
- 도 7: CD20-양성 라지 (Raji) 세포에 대해 7D8 변이체에 의해 매개된 CDC. 세포 용해를 측정함으로써 CDC 효능을 시험하기 위해서 라지 세포를 7D8 돌연변이체 (K439E, S440K, K439E/S440K 이중 돌연변이체, K439E + S440K 혼합물) 및 C1q의 농도 계열과 함께 인큐베이팅하였다. 반복 실험의 대표적인 그래프가 제시된다.
- 도 8: CD20-양성 다우디 (Daudi) 세포에 대한 7D8 돌연변이체 (7D8-WT, K439E, S440K, K439E/S440K 이중 돌연변이체, K439E + S440K 혼합물)에 의해 매개된 CDC. 7D8 돌연변이체의 농도 계열을 CDC를 유도하는 그의 효능에 대해 시험하였다.

도 9: CD38-양성 세포에 대한 CD38 항체 HuMAb 005의 돌연변이체에 의해 매개된 CDC. (a) 005 돌연변이체의 농도 계열에 의한 다우디 세포에 대한 CDC 효능. (b) HuMAb 005 돌연변이체의 농도 계열에 의한 라지 세포에 대한 CDC 효능. (c) 빈 (Wien) 133 세포에 대한, 20% 또는 50% NHS를 사용한 HuMAb 005의 E345R 돌연변이체의 CDC 효능. (d) 라지 세포에 대한, 20% 또는 50% NHS를 사용한 HuMAb 005 및 7D8의 E345R 돌연변이체의 CDC 효능. 일시 형질감염으로부터 단리된 비정제된 항체 샘플을 시험하였다. 음성 대조군으로서, 모의 (mock)-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

도 10: Fc-결합 펩티드를 사용한 경쟁 실험에서 CD38 항체 HuMAb 005 (a) 및 CD20 항체 HuMAb 7D8 (b)의 야생형 및 E345R 돌연변이체에 의한 CDC. 세포 용해는 Fc-결합 DCAWHLGELVWCT 펩티드 (서열 7)의 농도 계열과 함께 인큐베이션한 항체-옵소닌 처리된 (opsonized) 다우디-세포에 대한 CDC 후에 측정하였다. 일시 형질감염으로부터 단리된 비정제된 항체 샘플을 사용하였다. 음성 대조군으로서, 모의-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

도 11: 야생형 CD38 항체 HuMAb 005 및 돌연변이체 IgG1-005-E345R에 의한 CD38 발현 다우디 세포의 ADCC. 한 공여자의 PBMC의 ADCC가 % 용해로서 제시된다.

도 12: pH 6에서 ELISA에 의해 결정된, 인간, 시노몰거스 및 마우스 FcRn에 대한 야생형 IgG1-7D8 및 돌연변이체 IgG1-7D8-E345R의 결합.

도 13: SCID 마우스에서 정맥내 주사 후의 야생형 IgG1-7D8 및 -E345R, -S440K 및 K322A 변이체의 혈장 농도.

도 14a, b, c, 및 d: CD20- 및 CD38-양성 빈133 세포에 대한 CDC.

도 15a 및 b: 라지-luc #2D1 세포를 사용한 피하 이종이식 모델에서 IgG1-7D8-E345R의 생체내 효능의 평가.

도 16a 및 b: 라지-luc #2D1 세포를 사용한 피하 이종이식 모델에서 IgG1-005-E345R의 생체내 효능의 평가.

도 17: E345R 돌연변이를 갖는 CD38/EGFR 이중특이적 항체에 의한 CD38-양성, EGFR-음성 빈133 세포에 대한 CDC.

도 18a 및 b: E345R 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 CD20/CD38 이중특이적 항체에 의한 CD20-양성, CD38-음성 빈133 세포 또는 라지 세포에 대한 CDC.

도 19: E345R 돌연변이를 갖는 EGFR 항체 2F8에 의한 EGFR-양성 A431 세포에 대한 CDC.

도 20a 및 b: E345R 돌연변이체 항체에 의해 매개된 CDC.

도 21: 리소좀 마커 LAMP1 (APC)을 사용한 TF 항체 (FITC)의 공존 (colocalization) 분석.

도 22a-d: E345R의 도입은 상이한 B 세포주에 대해 시험된 야생형 리톡시맵에 비해 향상된 CDC-매개된 치사를 유발하였다.

도 22e: E345R의 도입은 대등한 CD20 발현 수준을 갖는 상이한 B 세포주에서 보체 조절 단백질 CD46 (a), CD55 (b) 또는 CD59 (c)의 발현 수준과 무관하게, 야생형 리톡시맵에 비해 증가된 최대 CDC-매개된 치사를 유발하였다.

도 23: CDC 동역학. E345R 항체는 야생형 항체보다 CDC에 의한 보다 신속하고 보다 실질적인 표적 세포 용해를 유발한다.

도 24: CDC 동역학. 이중특이적 CD38xCD20 항체 내의 E345R 돌연변이의 도입은 보다 신속하고 보다 실질적인 CDC-매개된 표적 세포 용해를 유발한다.

도 25a-b: CDC 동역학. EGFR-음성 라지 세포에 일가로 결합하는 이중특이적 항체 CD38xEGFR (a) 및 CD20xEGFR (b) 내의 E345R 돌연변이의 도입은 보다 신속하고 보다 실질적인 CDC-매개된 표적 세포 용해를 유발한다.

도 26a-f: (a-c) E345R 및 Q386K 또는 (d-f) E345R, E430G 및 Q386K를 함유하는 돌연변이체 항체와 야생형 항체의 조합에 의한 빈133 세포에 대한 CDC. IgG1-b12 돌연변이체는 빈133 세포에 결합하지 않고, 음성 대조군 항체로서 사용되었다.

도 27: E345R 돌연변이를 함유하는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 이소형 항체의 CDC 효능.

도 28: 야생형 CD38 항체 005 내의 Fc-Fc 안정화 E345R 돌연변이의 도입은 생체외 CDC 검정 (평균±평균의 표준

오차)에서 1차 CLL 세포의 향상된 치사를 유발한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본원에서 설명되는 바와 같이, 놀랍게도, Fc:C1q 결합에 직접 관여하지 않는 아미노산 내의 돌연변이는 그림에도 불구하고 항체의 CDC를 증가시킬 수 있고, 또한 항체의 다른 Fc-매개된 이펙터 기능을 개선할 수 있다. 이것은 항체 분자, 예컨대 IgG1 항체가 나중에 C1q에 의해 결합되는 올리고머 구조를 형성할 수 있다는 가설을 지지한다. 또한, 일부의 돌연변이는 CDC-유도를 감소시키는 것으로 밝혀졌지만, 동일하거나 상이한 항체 분자 내의 상기 돌연변이의 일부의 조합은 CDC-유도 회복을 유도하였고, 항체의 올리고머화에 대한 추가의 특이성을 보였고, 따라서 보다 특이적인 CDC-유도를 촉진하였다. 또한, CDC-반응을 증가시키는 특정 돌연변이는 실시예에서 제시되는 바와 같이 마우스 종양 모델 시스템에서 개선된 ADCC 반응, 증가된 결합력, 증가된 내재화 및 생체 내 효능을 특징으로 하였다. 이들 발견은 향상된 CDC-유도능, 보다 선택적인 CDC-유도, 및/또는 다른 개선된 이펙터 기능을 갖는 신규한 항체-기반 치료제의 개발을 허용한다.
- [0025] 본 발명의 항체 변이체는 모두 항원-결합 영역 및 IgG1의 아미노산 잔기 P247 내지 K447에 대응하는 분절 내에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 전장 또는 부분적인 Fc 영역을 포함한다. 이론에 제한되지 않지만, 확인된 돌연변이는 도 1에 개략적으로 제시되고 본원에서 "단일 돌연변이체", "이중 돌연변이체" 및 "혼합된 돌연변이체"로서 언급되는 3가지의 상이한 원리를 기초로 하여 보다 효과적인 및/또는 보다 특이적인 CDC-유도를 유발하는 것으로 생각된다.
- [0026] 본 발명의 변이체로부터 개선된 C1q 및/또는 CDC 효과는 항체 올리고머 형성을 허용하는 검정, 예컨대 항원 고정되지 않고 유체 막 내에 존재하는 세포-기반 검정에서만 주로 검출가능하다. 추가로, 이들 효과가 C1q의 직접적인 결합 부위의 변형이 아니라 보다 안정한 항체 올리고머에 의해 발생한다는 사실은 도 1c에 제시된 원리에 따라 확인될 수 있다.
- [0027] 정의
- [0028] 용어 "단일-돌연변이체"는 모 폴리펩티드 또는 항체에 비해 증가된 이펙터 기능을 갖는 본 발명의 변이체로서 이해되어야 한다.
- [0029] 용어 "이중-돌연변이체"는 상기 분절 내에 적어도 2개의 돌연변이를 포함하는 변이체로서 이해되어야 하고, 2개의 돌연변이 중 하나만 포함하는 변이체, 모 폴리펩티드 또는 항체, 또는 둘 모두에 비해 개선된 이펙터 기능을 갖는다.
- [0030] 용어 "혼합된-돌연변이체"는 하나 이상의 변이체, 제2 변이체, 및 모 폴리펩티드 또는 항체 단독에 비해, 상기 분절 내의 상이한 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 동일하거나 상이한 폴리펩티드 또는 항체의 제2 변이체와 조합 사용될 때 증가된 이펙터 기능을 제공하는 변이체로서 이해되어야 한다.
- [0031] 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 본 발명의 측면에서 예를 들어 세포, 세균, 또는 비리온에 존재하는 임의의 분자, 예컨대 폴리펩티드에 결합할 수 있는 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 이뮤노글로불린의 Fc-도메인은 이뮤노글로불린의 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어, 힌지 영역을 포함하는, 일반적으로 파파인에 의한 항체의 소화 (당업자에게 공지됨) 후에 생성되는 항체의 단편으로서 규정된다. 항체 중쇄의 불변 도메인은 항체 이소형, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE를 규정한다. Fc-도메인은 Fc 수용체로 불리는 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 단백질에 대한 항체의 이펙터 기능을 매개한다. 결합 영역은 폴리펩티드 서열, 예컨대 단백질, 단백질 리간드, 수용체, 항원-결합 영역, 또는 세포, 세균, 비리온에 결합할 수 있는 리간드-결합 영역일 수 있다. 결합 영역이 예를 들어 수용체이면, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 이뮤노글로불린의 Fc-도메인과 상기 결합 영역의 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 결합 영역이 항원-결합 영역이면, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 항체, 예를 들어 인간 항체 또는 중쇄 단독 항체 또는 ScFv-Fc-융합체일 수 있다. 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드는 일반적으로 연결 영역, 예를 들어, 힌지 영역, 및 이뮤노글로불린의 중쇄의 2개의 CH2-CH3 영역을 포함할 수 있고, 따라서, "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"는 "적어도 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"일 수 있다. 용어 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인"은 본 발명의 측면에서 연결 영역, 예를 들어, 항체의 아형, 예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2 또는 IgE에 따른 힌지, 및 이뮤노글로불린의 CH2 및 CH3 영역이 존재함을 의미한다.

- [0032] 본원에서 사용되는 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH2 영역을 나타내고자 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 228-340에 대응한다. 그러나, CH2 영역은 또한 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 다른 아형일 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용되는 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH3 영역을 나타내고자 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 341-447에 대응한다. 그러나, CH3 영역은 또한 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 다른 아형일 수 있다.
- [0034] 용어 "이뮤노글로불린"은 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 잠재적으로 상호연결된 한 쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 한 쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어지는, 구조상 관련된 당단백질의 부류를 나타낸다. 이뮤노글로불린의 구조의 특성은 잘 규명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)]을 참조한다. 간단히 설명하면, 각각의 중쇄는 일반적으로 중쇄 가변 도메인 (본원에서 VH로서 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 일반적으로 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3으로 이루어진다. 중쇄는 소위 "힌지 영역"에서 디설피드 결합을 통해 상호-연결된다. 각각의 경쇄는 일반적으로 경쇄 가변 도메인 (본원에서 VL로서 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 일반적으로 하나의 도메인, 즉 CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 언급되는 추가변성 영역 (또는 서열이 추가변이고/이거나 구조적으로 규정된 루프의 형태일 수 있는 추가변 도메인)으로 추가로 세분될 수 있고, 이들 영역에는 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 일반적으로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)] 참조). 달리 나타내지 않거나 문맥상 모순되지 않으면, 불변 영역 서열의 아미노산은 본원에서 EU-인덱스에 따라 넘버링된다 (문헌 [Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)]에 설명되어 있다).
- [0035] 본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 유의한 기간의 시간, 또는 임의의 다른 관련된 기능적으로 정의된 기간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합과 관련된 생리학적 응답을 유도하고/하거나, 촉진하고/하거나, 증강시키고/시키거나 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는데 충분한 시간)의 반감기로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 본 발명의 항체는 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함한다. 항체는 일반적으로 2개의 CH2-CH3 영역 및 연결 영역, 예를 들어, 힌지 영역, 예를 들어, 적어도 Fc-도메인을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체는 Fc 영역 및 항원-결합 영역을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 또는 "Fc" 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체 시스템의 성분, 예컨대 C1q (보체 활성화의 전통적인 경로의 제1 성분)을 비롯하여 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 또한 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 또는 유사한 분자일 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 적어도 2개의 상이한 에피토프, 일반적으로 비-중복 에피토프에 대해 특이성을 갖는 항체를 의미한다. 상기 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에 존재할 수 있다. 에피토프가 상이한 표적 상에 존재할 경우, 상기 표적은 동일한 세포 또는 상이한 세포 또는 세포 종류 상에 존재할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 모순되지 않는 한, 적어도 Fc-영역의 일부를 포함하고 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 상기 단편은 임의의 공지 기술, 예컨대 효소에 의한 절단, 펩티드 합성 및 재조합 발현 기술에 의해 제공될 수 있다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "Ab" 또는 "항체" 내에 포함된 결합 단편의 예는 비제한적으로, 일가 항체 (W02007059782 (젠맵 (Genmab))에 설명됨); 2개의 중쇄로만 이루어지고 예를 들어 낙타류에서 천연 생성되는 중쇄 항체 (예를 들어, [Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446]); 티오맵 (ThioMab) (로슈 (Roche), W02011069104), 비대칭적 및 이중특이적 항체-유사 분자인 가닥-교환 조작된 도메인 (씨드 (SEED) 또는 씨드바디 (Seed-body) (머크 (Merck), W02007110205); 트리오맵 (Triomab) (Fresenius, Lindhofer et al., 1995 J Immunol 155:219); Fc Δ Adp (리제네론 (Regeneron), W02010151792), 아지메트릭 스캐폴드 (Azymetric Scaffold) (자임웍스 (Zymeworks)/머크, W02012/058768), mAb-Fv (젠코르 (Xencor), W02011/028952), 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (애보트 (Abbott), DVD-Ig, 미국 특허 7,612,181); 이중 도

메인 이중 헤드 항체 (유니레버 (Unilever); 사노피 아벤티스, WO20100226923), 디-디아바디 (diabody) (임클론 (ImClone)/일라이 릴리 (Eli Lilly)), 노브-인투-홀 (Knobs-into-holes) 항체 형식 (제넨테크 (Genentech), WO9850431); 듀오바디 (DuoBody) (젠맵, WO 2011/131746); 정전기적 유도 항체 형식 (암젠 (Amgen), EP1870459 및 WO 2009089004; 추가이 (Chugai), US201000155133; 온코메드 (Oncomed), WO2010129304A2); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로사이언시스 코퍼레이션 (Rinat neurosciences Corporation), WO11143545), 크로스맵 (CrossMab) (로슈, WO2011117329), LUZ-Y (제넨테크), 비클로닉 (Biclonic) (메루스 (Merus)), 이중 표적화 도메인 항체 (GSK/도만티스 (Domantis)), 2개의 표적을 인식하는 투-인-원 (Two-in-one) 항체 (제넨테크, 노브임문 (NovImmune)), 가교결합된 Mab (카르마노스 캔서 센터 (Karmanos Cancer Center)), CovX-바디 (CovX/화이자), IgG-유사 이중특이적 (임클론/일라이 릴리, [Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74]), 및 DIG-바디 및 PIG-바디 (파르마신 (Pharmabcine)), 및 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART, 마크로제닉스 (Macrogenics), WO/2008/157379, WO/2010/080538), 자이바디 (Zybody) (자인게니아 (Zyngenia)), 공통 경쇄 (크루셀 (Crucell)/메루스, US7262028) 또는 공통 중쇄를 사용한 방법 (κ λ 바디, 노브임문), 및 Fc-도메인을 함유하는 항체 단편에 융합된 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질, 예를 들어 scFv-융합체, 예를 들어 BsAb (자이모제네틱스 (ZymoGenetics)/BMS), 헤르쿨레스 (HERCULES) (바이오젠 이덱 (Biogen Idec), US007951918), 스콜피온스 (SCORPIONS) (이머전트 바이오셀루션스/트루비온 (Trubion)), Ts2Ab (메드이문 (MedImmune)/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), scFv 융합체 (노바티스 (Novartis)), scFv 융합체 (장저우 아담 바이오테크 인크 (Changzhou Adam Biotech Inc) (CN 102250246)), TvAb (로슈, WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² (f-스타 (Star), WO2008/003116)), 및 이중 scFv-융합체를 포함한다. 또한, 달리 특정되지 않으면, 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (예컨대 인간 모노클로날 항체), 예를 들어 심포젠 (Symplogen) 및 메루스 (올리고클로닉스 (Oligoclomics))에 의해 이용된 기술에 의해 생성된 항체 혼합물 (재조합 폴리클로날 항체), 및 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메릭 항체 및 인간화 항체도 포함함을 이해되어야 한다. 생성된 항체는 잠재적으로 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0036] 용어 "전장 항체"는 본원에서 사용될 때 이소형의 야생형 항체에서 통상적으로 발견되는 것에 대응하는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유하는 항체 (예를 들어, 모 또는 변이체 항체)를 의미한다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 (germline) 이뮤노글로불린 서열로부터 유래한 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이, 삽입 또는 결실)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 생식계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체", "모노클로날 Ab", "모노클로날 항체 조성물", "mAb" 등은 단일 분자 조성의 Ab 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래한 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 Ab를 말한다. 인간 mAb는 기능성 인간 항체를 생산하도록 재배열되고 불멸화 (immortalized) 세포에 융합된, 인간 중쇄 도입유전자 (transgene) 레퍼토리 및 경쇄 도입유전자 레퍼토리를 포함하는 계놈을 갖는 트랜스제닉 (transgenic) 또는 트랜스크로모조멀 (transchromosomal) 비인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 획득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE, 또는 IgM 또는 그의 임의의 동종이형, 예컨대 IgG1m(za) 및 IgG1m(f))를 의미한다. 또한, 각각의 중쇄 이소형은 카파 (κ) 또는 람다 (λ) 경쇄와 조합될 수 있다.

[0040] 용어 "일가 항체"는 본 발명의 측면에서 항체 분자가 항체의 결합 도메인의 하나에 의해서만 항원에 결합할 수 있고, 예를 들어 단일 항원-항체 상호작용을 갖고, 따라서 항원에 가교결합할 수 없음을 의미한다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표적"은 본 발명의 측면에서 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드의 결합 영역이 결합하는 분자로서 이해되어야 하고, 항체의 결합의 측면에서 사용될 때에는 생성된 항체가 작용하는 임의의 항원을 포함한다. 용어 "항원" 및 "표적"은 항체와 관련하여 교환가능하게 사용될 수 있고,

본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에 대해 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, 소정의 항원에 대한 항체의 결합이라는 측면에서 용어 "결합"은 일반적으로 예를 들어 항원을 리간드로, 항체를 분석물로 사용하여 BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정하는 경우, 약 10^{-6} M 이하, 예를 들어 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 이하의 K_D 에 상응하는 친화도의 결합이고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예컨대, BSA, 카제인)에 대한 결합을 위한 그의 결합 친화도보다 10배 이상 낮은, 예컨대 100배 이상 낮은, 예를 들어 1,000배 이상 낮은, 예컨대 10,000배 이상 낮은, 예를 들어 100,000배 이상 낮은 K_D 에 상응하는 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 정도는 항체의 K_D 에 의존적이기 때문에, 항체의 K_D 가 매우 낮으면 (즉, 항체가 고도로 특이적이면), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 정도는 10,000배 이상일 수 있다. 본원에 사용된 용어 " K_D " (M)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0043] 본 발명의 "변이체" 또는 "항체 변이체" 또는 "모 항체의 변이체"는 "모 항체"에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 항체 분자이다. 이와 유사하게, 본 발명의 "변이체" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드의 변이체" 또는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체"는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드"에 비해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 "이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"이다. 상이한 용어가 교환 가능하게 사용될 수 있고, 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태에 대해 동일한 의미 및 목적을 구성할 수 있다. 예시적인 모 항체 형식은 비제한적으로, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 이중특이적 항체, 인간 항체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예시적인 돌연변이는 모 아미노산 서열 내의 아미노산의 아미노산 결실, 삽입, 및 치환을 포함한다. 아미노산 치환은 천연 아미노산을 또다른 자연 발생 아미노산으로, 또는 비-자연 발생 아미노산 유도체로 교환할 수 있다. 아미노산 치환은 보존적 또는 비-보존적 치환일 수 있다. 본 발명의 측면에서, 보존적 치환은 다음 3개의 표 중의 하나 이상에서 반영되는 아미노산의 부류 내에서의 치환에 의해 규정될 수 있다:

[0044] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 부류

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0045]

[0046] 다른 보존적 아미노산 잔기 치환 부류

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0047]

[0048] 아미노산 잔기의 다른 물리적 및 기능적 분류

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

[0049]

[0050] 본 발명의 측면에서, 변이체 내의 치환은 다음과 같이 표시된다:

[0051] 원래의 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산

[0052] 아미노산 잔기를 나타내기 위해 코드 Xaa 및 X를 비롯하여 3 문자 코드, 또는 1 문자 코드가 사용된다. 따라서, 표시 "E345R" 또는 "Glu345Arg"는 변이체가 아래에 나타낸 바와 같이 정렬될 때 모 항체 내의 위치 345의 아미노산에 대응하는 변이체 아미노산 위치에서 글루탐산의 아르기닌으로의 치환을 포함함을 의미한다.

[0053] 상기 위치가 항체 내에 존재하지 않는 경우에도, 변이체는 예를 들어 다음과 같은 아미노산의 삽입을 포함한다:

[0054] 위치 - 치환된 아미노산; 표시, 예를 들어, "448E"가 사용된다.

[0055] 상기 표시는 일련의 상동성 폴리펩티드 또는 항체에서의 변형(들)과 특히 관련된다.

[0056] 유사하게, 치환 아미노산 잔기(들)의 종류가 중요하지 않을 때:

[0057] 원래의 아미노산 - 위치; 또는 "E345".

[0058] 원래의 아미노산(들) 및/또는 치환된 아미노산(들)이 모든 아미노산(들)은 아니지만 하나 초과와 아미노산을 포함할 수 있는 변형에 대해, 위치 345에서 글루탐산의 아르기닌, 라이신 또는 트립토판으로의 치환:

[0059] "Glu345Arg,Lys,Trp" 또는 "E345R,K,W" 또는 "E345R/K/W" 또는 "E345의 R, K 또는 W로의 치환"이 본 발명의 측면에서 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0060] 또한, 용어 "치환"은 다른 19개의 천연 아미노산 중의 임의의 하나로, 또는 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산으로의 치환을 포함한다. 예를 들어, 위치 345에서 아미노산 E의 치환은 각각의 다음 치환을 포함한다: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W, 및 345Y. 이것은 표시 345X와 동등한 것이고, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다. 이들 치환은 또한 E345A, E345C 등 또는 E345A,C, 등, 또는 E345A/C/등으로 지정될 수 있다. 이와 같은 방식은 임의의 하나의 상기 치환을 구체적으로 포함하도록 본원에서 언급되는 각각의 및 모든 위치에 유사하게 적용된다.

[0061] 또다른 서열 내의 아미노산 또는 분절"에 대응하는" 하나의 서열 내의 아미노산 또는 분절은 (i) 일반적으로 디폴트 설정에서 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, ClustalW 등을 사용하여 다른 아미노산 또는 분절과 정렬시키고, (ii) 서열 1에 대해 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 것이다. 예를 들어, 도 2 및 3에 제시된 서열 정렬이, IgG1 Fc 서열 내의 특정 아미노산에 대응하는 IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 서열 내의 임의의 아미노산을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명은 서열 1, 2, 3, 4, 및 5의 아미노산 P247 내지 K447에 대해 특정 정도의 동일성을 갖는 변이체, 즉 모 항체, 및/또는 변이체 항체에 관한 것이고, 상기 모 및/또는 변이체 항체는 이하에서 "상동성 항체"로 지정된다.

[0063] 본 발명의 목적에서, 두 아미노산 서열 사이의 동일성 정도, 및 두 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성 정도는 니들만-분쉬 (Needleman-Wunsch) 정렬 (즉, 전체적인 정렬)인 프로그램 "align"에 의해 결정된다. 프로그램은 폴리펩티드, 및 뉴클레오타이드 서열의 정렬을 위해 사용된다. 디폴트 평가 매트릭스 BLOSUM50은 폴리펩티드 정렬을 위해 사용되고, 디폴트 동일성 매트릭스는 뉴클레오타이드 정렬을 위해 사용되고, 갭 (gap)의 제1 잔기의 페널티는 폴리펩티드의 경우 -12이고, 뉴클레오타이드에 대해서는 -16이다. 갭의 추가의 잔기에 대한 페널티는 폴리펩티드의 경우 -2이고, 뉴클레오타이드에 대해서는 -4이다.

- [0064] "Align"은 FASTA 패키지 버전 v20u6의 일부이다 ([W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448], 및 [W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98] 참조). FASTA 단백질 정렬은 겹 크기에 대한 제한을 두지 않는 스미스-워터맨 (Smith-Waterman) 알고리즘을 이용한다 (["Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197] 참조).
- [0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이펙터 세포"는 면역 반응의 인지 및 활성화 단계와 대조적으로, 면역 반응의 이펙터 단계에 수반되는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포에는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구 (예컨대, 세포용해성 T 세포 (CTL)가 포함되는 B 세포 및 T 세포), 치사 세포, 천연 치사 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예를 들어 호중구, 과립구, 비만 세포 및 호염기구가 포함된다. 일부 이펙터 세포는 Fc 수용체 (FcR) 또는 보체 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포, 예컨대, 예를 들어, 천연 치사 세포는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포 및 쿠퍼 (Kupffer) 세포는 표적 세포의 특이적으로 사멸 및 면역계의 다른 성분에 대한 항원의 제시, 또는 항원을 제시하는 세포에 대한 결합에 관여한다. 일부 실시양태에서, ADCC는 표적 세포 상에 활성화된 C3 단편의 침적을 유발하는 항체 유도 전통적 보체 활성화에 의해 추가로 향상될 수 있다. C3 절단 생성물은 골수 세포 상에 발현된 보체 수용체 (CR), 예컨대 CR3에 대한 리간드이다. 이펙터 세포 상의 CR에 의한 보체 단편의 인식은 향상된 Fc 수용체-매개 ADCC를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 유도 전통적 보체 활성화는 표적 세포 상에 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 직접적인 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDC)을 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원, 표적 입자 또는 표적 세포를 포식할 수 있다. 이펙터 세포 상의 특정 FcR 또는 보체 수용체의 발현은 시토킨과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, Fc γ RI의 발현은 인터페론 γ (IFN γ) 및/또는 G-CSF에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 증강된 발현은 표적에 대한 Fc γ RI-보유 세포의 세포독성 활성을 증가시킨다. 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 서열을 포식하거나 용해시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 유도 전통적 보체 활성화는 표적 세포 상에 C3 단편을 유도한다. 이들 C3 절단 생성물은 이펙터 세포에 의한 직접적인 포식작용을 촉진하거나 또는 항체 매개 포식작용을 증강시킴으로써 간접적으로 촉진할 수 있다.
- [0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 벡터에 라이게이션된 핵산 분절의 전사를 유도할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 의도된다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이는 환상의 이중 가닥 DNA 루프의 형태이다. 또다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 이때 핵산 분절은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제될 수 있다 (예컨대, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피솜형 포유동물 벡터). 기타 벡터 (예컨대 비-에피솜형 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터의 형태이므로 교환가능하게 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예컨대, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하도록 의도된다.
- [0067] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 상기 용어는 특정한 대상 세포뿐만 아니라 그 세포의 자손체도 지칭하도록 의도된다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손체가 실제로는 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어, 트랜스펙토마 (transfectoma), 예컨대 CHO 세포, HEK-293 세포, PER.C6, NSO 세포, 및 림프구 세포, 및 원핵세포, 예컨대 이. 콜라이 (*E. coli*) 및 다른 진핵세포 숙주, 예컨대 식물 세포 및 진균을 포함한다.
- [0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "트랜스펙토마"는 Ab 또는 표적 항원을 발현하는 재조합 진핵 숙주 세포, 예를 들어 CHO 세포, PER.C6, NSO 세포, HEK-293 세포, 식물 세포, 또는 진균, 예를 들어 효모 세포를 포함한다.
- [0069] 용어 "제제"는 세포 (예를 들어, 세포의 표면 상에 발현된 항원), 세포막, 비리온 또는 다른 구조와 연관된 항원과 상호작용할 때 올리고머를 형성하는 증가된 능력을 가져서, 증가된 C1q 결합, 보체 활성화, CDC, ADCC, ADCP, 다른 Fc-매개된 이펙터 기능, 내재화, 하향조절, 아포토시스, 항체-약물-접합체 (ADC) 흡수, 결합력 또는

이들의 임의의 조합을 가능하게 하는 항체 변이체 및 상이한 항체 변이체의 혼합물을 의미한다. 예시적인 검정은 실시예에서, 예를 들어 C1q-결합력 (실시예 4), CDC (실시예 5, 6 및 10, 16, 19, 22, 23, 24, 25); ADCC (실시예 12) 및 생체내 효능 (실시예 20, 21)에 대해 제시된다. "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", 및 "혼합된-돌연변이체"로서 본원에서 언급되는 본원의 측면에 따른 변이체는 그의 예시적인 제조 과정 및 사용 방법과 함께 아래에서 추가로 상세히 설명되어 있다.

- [0070] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "친화도"는 단일 부위에서 하나의 분자, 예를 들어, 항체의 또다른 분자, 예를 들어, 표적 또는 항원에 대한 결합, 예컨대 항체의 개별 항원 결합 부위의 항원에 대한 일가 결합의 강도이다.
- [0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합력"은 2개의 구조 사이의 다중 결합 부위, 예컨대 표적과 동시에 상호 작용하는 항체의 다수의 항원 결합 부위 사이 또는 예를 들어 항체와 C1q 사이의 조합된 강도를 의미한다. 하나 초과 결합 상호작용이 존재할 경우, 2개의 구조는 모든 결합 부위가 해리될 때에만 해리될 것이고, 따라서, 해리 속도는 개별 결합 부위보다 더 느릴 것이고, 따라서 개별 결합 부위의 결합 강도 (친화도)에 비해 더 큰 효과적인 총 결합 강도 (결합력)를 제공할 것이다.
- [0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "올리고머"는 적어도 원칙적으로 비제한된 수의 단량체로 이루어지는 중합체에 비해 하나를 초과하지만 제한된 수의 단량체 단위로 이루어지는 분자 (예를 들어, 항체)를 의미한다. 예시적인 올리고머는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 및 육량체이다. 그리스어 접두사가 종종 올리고머 내의 단량체 단위의 수를 지정하기 위해 사용되고, 예를 들어 사량체는 4개 단위로 이루어지고, 육량체는 6개의 단위로 이루어진다.
- [0073] 본원에서 사용되는 용어 "올리고머화"는 단량체를 한정된 정도의 중합체로 전환하는 과정을 의미하고자 의도된다. 본원에서, Fc-도메인의 올리고머화는 바람직하게는 세포 표면 (이로 제한되지 않음)에서 Fc-도메인 함유 폴리펩티드, 예컨대 항체에 의한 표적 결합 후에 발생하는 것이 관찰된다. 항체의 올리고머화는 예를 들어 세포 표면 C1q-결합 검정 (실시예 4 및 9에 설명된 바와 같이), C1q 효능 검정 (실시예 5에 설명된 바와 같이) 및 보체 의존적 세포독성 (실시예 6, 10 및 19에 설명된)을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0074] 본원에서 사용되는 용어 "C1q 결합"은 그의 항원에 결합된 항체에 대한 C1q의 결합의 측면에서 C1q의 결합을 나타내고자 의도된다. 그의 항원에 결합된 항체는 본원에서 설명되는 측면에서 생체내 및 시험관내 둘 모두에서 발생하는 것으로서 이해되어야 한다. C1q 결합은 예를 들어 인공 표면 (예를 들어, 실시예 3에 설명된 바와 같이 ELISA를 위한 플레이트에서의 플라스틱) 상에 고정된 항체를 사용하여 또는 세포 또는 비리온 표면 상의 소정의 항원에 결합된 항체를 사용하여 (실시예 4 및 9에 설명된 바와 같이) 평가될 수 있다. 항체 올리고머에 대한 C1q의 결합은 본원에서 높은 결합력의 결합을 유발하는 다가 상호작용으로 이해되어야 한다.
- [0075] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보체 활성화"는 그의 항원에 결합된 항체에 대한 보체 성분 C1q의 결합에 의해 촉발되는 전통적인 보체 경로의 활성화를 의미한다. C1q는 보체 성분 C3을 C3b 및 C3a로 절단하는 C3 전환효소로 불리는 효소 활성의 형성으로 끝나는 일련의 절단 반응을 수반하는 전통적인 보체 캐스케이드의 초기 사건의 제1 단백질이다. C3b는 막 상의 C5에 공유 결합하여 C5b를 형성하고, 이것은 다시 말단 보체 성분 C5b, C6, C7, C8 및 C9가 막 공격 복합체 (MAC)로 회합되는 보체 활성화의 후기 사건을 촉발한다. 보체 캐스케이드는 CDC로도 알려진 세포 용해를 야기하는 세공의 생성을 야기한다. 보체 활성화는 C1q 효능 (실시예 5에 설명된 바와 같이), CDC 동역학 (실시예 28, 29, 및 30에 설명된 바와 같이), CDC 검정 (실시예 6, 10, 19, 25, 27, 및 33에 설명된 바와 같이) 또는 문헌 [Beurskens et al April 1, 2012 vol. 188 no. 7 3532-3541]에 기재된 C3b 및 C4b의 세포 침착 방법에 의해 평가할 수 있다.
- [0076] 본원에서 사용되는 용어 "보체-의존적 세포독성" ("CDC")은 MAC 조립체에 의해 생성되는 막 내의 세공의 결과로서 세포 또는 비리온 상의 그의 표적에 결합된 항체의 용해를 야기하는 항체-매개된 보체 활성화의 과정을 나타내고자 의도된다. CDC는 시험관내 검정, 예컨대 정상 인간 혈청이 실시예 6, 10, 19, 25, 27, 및 33에 설명된 바와 같이 보체 공급원으로서 사용되는 CDC 검정 또는 실시예 5에 설명된 바와 같이 정상 인간 혈청이 C1q에서 제한된 C1q 효능 검정에 의해 평가될 수 있다.
- [0077] 본원에서 사용되는 용어 "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" ("ADCC")은 결합된 항체의 불변 영역을 인식하는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온의 치사 메커니즘을 나타내고자 의도된다. ADCC는 예를 들어 실시예 12에 설명된 ADCC 검정과 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0078] 본원에서 사용되는 용어 "항체-의존적 세포성 포식작용" ("ADCP")은 포식세포에 의한 내재화에 의한 항체-코팅

된 표적 세포 또는 비리온의 제거 메커니즘을 나타내고자 의도된다. 내재화된 항체-코팅된 표적 세포 또는 비리온은 파고솜 (phagosome)으로 불리는 소포 (vesicle) 내에 함유된 후, 하나 이상의 리소솜과 융합되어 포식리소솜 (phagolysosome)을 형성한다. ADCP는 이펙터 세포로서 대식세포를 사용하는 시험관내 세포독성 검정 및 문헌 [van Bij et al., Journal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685]에 기재된 비디오 현미경을 사용하여, 또는, 예를 들어, 에스. 아우레우스 (*S. aureus*) 포식작용에 대해 실시예 14에 기재된 바와 같이 PMN에 의해 평가될 수 있다.

[0079] 본원에서 사용되는 용어 "보체-의존적 세포성 세포독성" ("CDCC")은 항체-매개된 보체 활성화의 결과로서 표적 세포 또는 비리온에 공유 결합된 보체 3 (C3) 절단 생성물을 인식하는 보체 수용체를 발현하는 세포에 의한 표적 세포 또는 비리온의 사멸 메커니즘을 나타내고자 의도된다. CDCC는 ADCC에 대해 설명된 바와 유사한 방식으로 평가될 수 있다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "하향조정"은 예를 들어 항체의 수용체에 대한 결합에 의해 세포성 표면 상의 분자, 예컨대 항원 또는 수용체의 수를 감소시키는 과정을 나타내고자 의도된다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "내재화"는 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드가 예를 들어 세포내이입 (endocytosis)을 통해 세포-표면으로부터 및/또는 둘러싸는 매체로부터 표적-발현 세포 내로 내재화되는 임의의 메커니즘을 나타내고자 의도된다. 항체의 내재화는 내재화된 항체의 양을 측정하는 직접 검정 (예를 들어, 실시예 26에서 설명되는 리소솜 공존 검정)을 사용하여 평가될 수 있다.

[0082] 본원에서 사용되는 용어 "항체-약물 접합체"는 적어도 하나의 종류의 악성 세포에 대한 특이성을 갖는 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드, 약물, 및 약물을 예를 들어 항체에 연결하는 링커를 의미한다. 링커는 악성 세포의 존재 하에 절단가능하거나 비-절단가능하고; 여기서 항체-약물 접합체는 악성 세포를 치사시킨다.

[0083] 본원에서 사용되는 용어 "항체-약물 접합체 흡수"는 항체-약물 접합체가 세포 상의 표적에 결합한 후, 세포막에 의해 흡수되고 둘러싸여 세포 내로 유입되는 과정을 의미한다. 항체-약물 접합체 흡수는 WO 2011/157741에 설명된 바와 같이 "시험관내 치사 검정에서 항-TF ADC에 의한 항체-매개된 내재화 및 세포 치사"로서 평가될 수 있다.

[0084] 본원에서 사용되는 용어 "아포토시스"는 세포에서 발생할 수 있는 프로그래밍된 세포 사멸 (PCD)의 과정을 의미한다. 생화학적 사건은 특징적인 세포 변화 (형태) 및 사멸을 유도한다. 이들 변화는 기포 형성 (blebbing), 세포 수축, 핵 단편화, 염색질 농축, 및 염색체 DNA 단편화를 포함한다. 특정 수용체에 대한 항체의 결합은 아포토시스를 유도할 수 있다.

[0085] Fc-수용체 결합은 실시예 12에 설명된 바와 같이 간접적으로 측정할 수 있다.

[0086] 본원에서 사용되는 용어 "FcRn"은 Fc 수용체인 신생아 Fc 수용체를 나타내고자 의도된다. 이것은 모체의 젖으로부터 신생아 설치류의 장의 상피를 가로질러 신생아의 혈류로 IgG를 수송할 수 있는 독특한 수용체로서 설치류에서 처음 발견되었다. 추가의 연구는 인간에서 유사한 수용체를 밝혀내었다. 그러나, 인간의 태반에서, 이것은 모체 IgG의 성장하는 태아로의 수송을 돕는 것이 밝혀졌고, 또한 IgG 이동의 모니터링에서 기능하는 것으로 밝혀졌다. FcRn은 6.0-6.5의 산성 pH에서 IgG에 결합하지만, 중성 또는 보다 높은 pH에서는 결합하지 않는다. 따라서, FcRn은 약산성 pH에서 장강 (창자의 내부)으로부터의 IgG에 결합할 수 있고, pH가 중성 내지 염기성 (pH 7.0-7.5)인 기저층 측면 (신체 내부의)으로의 효율적인 일방향 수송을 보장한다. 상기 수용체는 또한 내피 세포에서 세포내이입의 경로에서의 그의 발생을 통해 IgG의 성체 샐비지 (salvage)에서 기능한다. 산성 엔도솜 내의 FcRn 수용체는 음세포작용 (pinocytosis)을 통해 내재화된 IgG에 결합하여 이를 세포 표면으로 재순환시키고 혈액의 염기성 pH에서 방출하여, 그의 리소솜 분해를 방지한다. 상기 메커니즘은 다른 이소형에 비해 혈액 내의 IgG의 보다 큰 반감기에 대한 설명을 제공할 수 있다. 실시예 13은 ELISA에서 pH 6.0에서 FcRn에 결합하는 IgG를 보여주는 검정을 설명한다.

[0087] 본원에서 사용되는 용어 "단백질 A"는 세균 스탕필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)의 세포벽에서 본래 발견된 56 kDa MSCRAMM 표면 단백질을 나타내고자 의도된다. 이것은 spa 유전자에 의해 코딩되고, 그의 조절은 DNA 토폴로지 (topology), 세포 오스몰농도, 및 Ar1S-Ar1R로 불리는 2-보체 시스템에 의해 제어된다. 이것은 이뮤노글로불린에 결합하는 능력 때문에 생화학적 연구에서 유용하게 사용된다. 이것은 3중-나선 다발로 폴딩되는 5개의 상동성 Ig-결합 도메인으로 이루어진다. 각각의 도메인은 많은 포유동물 종으로부터의 단백질, 가장 특히 IgG에 결합할 수 있다. 이것은 대부분의 이뮤노글로불린의 중쇄 Fc 영역 (FcRn 수용체의 보존된 결합 부위와 중첩됨)에 결합하고, 또한 인간 VH3 패밀리의 Fab 영역과 상호작용한다. 혈청 내에서 이들 상호작

용을 통해, IgG 분자는 세균이 옅소닌화, 보체 활성화 및 포식작용을 파괴하는 그의 Fab 영역을 통하는 대신에 그의 Fc 영역을 통해 세균에 결합한다.

- [0088] 용어 "단백질 G"는 단백질 A와 유사하지만 상이한 특이성을 갖는, 그룹 C 및 G 스트렙토코커스 (Streptococcal) 세균에서 발견되는 이뮤노글로불린-결합 단백질을 나타내고자 의도된다. 이것은 Fc 영역에 대한 그의 결합을 통해 항체를 정제하는데 유용한 65-kDa (G148 단백질 G) 및 58 kDa (C40 단백질 G) 세포 표면 단백질이다.
- [0089] 본원에서 사용되는 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH2 영역을 나타내고자 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 228-340에 대응한다.
- [0090] 본원에서 사용되는 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 이뮤노글로불린의 CH3 영역을 나타내고자 의도된다. 따라서, 예를 들어 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 아미노산 341-447에 대응한다.
- [0091] 본원에서 사용되는 용어 "알로스테릭 (allosteric) 돌연변이"는 카바트에 제시된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 Fc-도메인 함유 폴리펩티드에서 아미노산 P247, 및 E430의 변형, 예를 들어 삽입, 치환 및 결실을 나타내고자 의도된다.
- [0092] 본원에서 사용되는 용어 "소수성 노브 (knob) 돌연변이"는 카바트에 제시된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 폴리펩티드를 함유하는 Fc-도메인에서 아미노산 I253, 및 S254, 및 Q311의 변형, 예를 들어 삽입, 치환 및 결실을 나타내고자 의도된다. 소수성 노브는 문헌 [Delano WL, et al., Science 287, (2000), pages 1279-1283], 예를 들어 페이지 1281에 기재되어 있다.
- [0093] 본원에서 사용되는 용어 "N-말단 CH3 나선 돌연변이"는 카바트에 제시된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 Fc-도메인 함유 폴리펩티드에서 아미노산 R355, 및 D356, 및 E356, 및 E357, 및 M358, 및 L358, 및 T359, 보다 구체적으로 D356, 및 E356, 및 T359의 변형, 예를 들어 삽입, 치환 및 결실을 나타내고자 의도된다.
- [0094] 본원에서 사용되는 용어 "C-말단 CH3 베타 가닥 돌연변이"는 카바트에 제시된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 Fc-도메인 함유 폴리펩티드에서 아미노산 Y436, 및 T437, 및 Q438, 및 K439, 및 S440, 및 L441, 보다 구체적으로 Y436, 및 K439, 및 S440의 변형, 예를 들어 삽입, 치환 및 결실을 나타내고자 의도된다.
- [0095] 항체의 이펙터 기능에 영향을 주는 방법
- [0096] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0097] 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 이펙터 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0098] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 항체일 수 있다.
- [0099] 따라서, 본 발명은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하는 것을 포함하는, 모 항체의 이펙터 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0100] "D/E356"은 본원에서 인간 IgG1의 서열 내의 동종이형 변이체를 의미한다. 인간 IgG1의 IgG1m(za) 동종이형에서 위치 356의 아미노산은 D이고, 인간 IgG1의 IgG1m(f) 동종이형에서 위치 356의 아미노산은 E이다.
- [0101] 본 발명의 방법 또는 용도에 따라 모 항체에 대한 돌연변이의 도입은 변이체 또는 변이체 항체를 생성한다. 따라서, 본 발명의 방법(들)은 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 변이체 또는 변이체 항체를 얻기 위해 수행할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 방법 또는 용도로부터 얻은 변이체 항체는 모 항체에 비해 증가된 이펙터 기능을 갖는다. 일반적으로, 이펙터 기능에 대한 항체의 효과는 EC50 값에 의해 결정될 수 있고, 이것은 최대 용해 값의 1/2을 얻기 위해 필요한 항체의 농도이다.

- [0103] 최대 용해는 포화량의 항체가 사용될 때 얻어지는 용해이고, 여기서 포화는 항체에 대한 모든 항원이 항체에 의해 결합되는 항체의 양을 나타내고자 의도된다.
- [0104] 용어 "이펙터 기능의 증가" 또는 "이펙터 기능의 개선"은 본 발명의 측면에서 모 항체에 비해 변이체 항체의 EC50 값의 감소가 존재함을 의미한다. EC50 값의 감소는 예를 들어 적어도 또는 약 2배, 예컨대 적어도 또는 약 3배, 또는 적어도 또는 약 5배, 또는 적어도 또는 약 10배일 수 있다. 대안적으로, "이펙터 기능의 증가" 또는 "이펙터 기능의 개선"은 모 항체가 모든 세포의 100% 미만을 용해시키는 조건 하에서 용해되는 세포의 최대량 (세포의 총량이 100%로 설정되는 경우에)이 예를 들어 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%로 증가함을 의미한다.
- [0105] 변이체는 IgG1-005 또는 IgG1-7D8 중쇄의 가변 도메인을 변이체 내로 클로닝하고 그의 효능을 예컨대 다우디 (실시예 6) 및 빈 (실시예 10)에 대해 설명된 CDC 검정으로 시험함으로써 증가된 또는 개선된 이펙터 기능에 대해 시험될 수 있다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 다우디 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에서 IgG1-7D8의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 다우디 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에서 IgG1-005의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 빈133 세포를 이용하여, 증가는 연구된 조건 하에서 IgG1-7D8의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 빈133 세포를 이용하여, 증가는 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%의 최대 용해의 증가로 규정될 것이다. 또한, CDC 효능의 증가는 연구된 조건 하에서 IgG1-005의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (빈133 세포의 용해가 검출가능한 조건 하에서 최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 수 있다.
- [0106] 본 발명자들은 놀랍게도 이들 특이적 위치에서의 돌연변이가 본 발명의 방법 (예를 들어, 실시예 19에 제시된)에 따라 모 항체 내로 돌연변이를 도입시킴으로써 얻은 변이체 항체의 이펙터 기능에 대해 개선된 효과를 갖는다는 것을 밝혀내었다. 이론에 제한되지 않지만, 상기한 위치의 군으로부터의 적어도 하나의 아미노산을 치환함으로써 올리고머화가 자극되는 것으로 생각된다. 항체는 보다 큰 결합력 (실시예 2에 설명됨; IgG-7D8-E345R의 직접 표지는 IgG-7D8-WT에 비해 다우디 세포에 대한 결합을 증가시켰다)으로 결합하여, 항체가 보다 긴 시간 동안 세포에 결합할 수 있고, 따라서 상기한 이펙터 기능, 예를 들어, 증가된 C1q 결합, C1q 효능 CDC, ADCC, 내재화, ADCP, 및/또는 생체내 효능이 가능하게 된다. 이들 효과는 실시예 4 (세포 상의 C1q 결합), 실시예 5 (CDC 검정에서 C1q 효능), 실시예 6, 7, 27, 28 및 29 (CDC 검정), 실시예 12 (ADCC), 실시예 26 (내재화) 및 실시예 21 및 22 (생체내 효능)에 의해 예시된다. 따라서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 잔기로부터 선택된 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 또한 본 발명의 측면에서 "단일 돌연변이체" 또는 "이펙터-증진 돌연변이"로 언급될 수 있다.
- [0107] 또다른 측면에서, 본 발명은 또한 예를 들어, 세포, 세포막, 비리온 또는 또다른 입자 상의 항체의 항원에 결합할 때 항체의 다음 중 하나 이상의 이펙터 기능을 증가시키기 위한, 표 1의 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이의 용도를 제공한다: (i) C1q-결합, (ii) 보체 활성화, (iii) CDC, (iv) 올리고머 형성, (v) 올리고머 안정성, (vi) 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), (vii) FcRn-결합, (viii) Fc-감마 수용체 결합, (ix) 단백질 A-결합, (x) 단백질 G-결합, (xi) 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), (xii) 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), (xiii) 보체-증강 세포독성, (xiv) 항체에 의해 매개된 옥소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, (xv) 내재화, (xvi) 하향조절, (xvii) 아포토시스의 유도, (xviii) 옥소닌화 및 (xix) (i) 내지 (xviii) 중의 임의의 조합. (iv) 또는 (v)의 한 실시양태에서, 올리고머는 육량체이다. 한 실시양태에서, 항체의 적어도 하나의 다른 이펙터 기능, 예컨대 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 항체에 의해 매개된 옥소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 항체 매개된 포식작용 (ADCP), 내재화, 아포토시스, 및/또는 옥소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 예컨대 특히 FcRn 결

합, ADCC, Fc 감마 수용체 결합, 단백질 A 결합, 단백질 G 결합, ADCP, CDCC, 보체 향상된 세포독성, 옹소닌화 및 이들의 임의의 조합이 또한 또는 대안적으로 증가된다.

- [0108] 한 실시양태에서, 모 항체의 이펙터 기능은 모 항체가 항원-발현 세포, 세포막, 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합할 때 증가한다.
- [0109] 본 발명자들은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하면 모 항체의 이펙터 기능이 감소함을 밝혀내었다 (실시예 5, 6 및 10).
- [0110] 또다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 이펙터 기능을 감소시키는 방법에 관한 것이고, 이 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.
- [0111] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드는 항체일 수 있다.
- [0112] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하는 것을 포함하는, 모 항체의 이펙터 기능을 감소시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.
- [0113] 실시예 6에 제시된 바와 같이, "단일-돌연변이체"로서 위치 K439E 또는 S440K의 아미노산 치환은 본 발명의 방법에 따른 제1 돌연변이 중의 임의의 하나에 비해 CDC를 감소시켰다.
- [0114] 이펙터 기능을 감소시키는 상기 방법에 의해 얻은 변이체 항체는 모 항체에 비해 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 일반적으로, 이펙터 기능에 대한 항체의 효과는 EC50 값에 의해 측정될 수 있고, 이것은 최대 용해 값의 1/2을 얻기 위해 필요한 항체의 농도이다.
- [0115] 최대 용해는 포화량의 항체가 사용될 때 얻어지는 용해이고, 여기서 포화는 항체에 대한 모든 항원이 항체에 의해 결합되는 항체의 양을 나타내고자 의도된다.
- [0116] 용어 "이펙터 기능의 감소"는 모 항체에 비해 변이체 항체의 EC50 값의 증가가 존재함을 의미한다. EC50 값의 증가는 예를 들어 적어도 또는 약 2배, 예컨대 적어도 또는 약 3배, 또는 적어도 또는 약 5배, 또는 적어도 또는 약 10배일 수 있다. 대안적으로, "이펙터 기능의 감소"는 모 항체가 모든 세포의 100% 미만을 용해시키는 조건 하에서 용해되는 세포의 최대량이 예를 들어 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%로 감소함을 의미한다.
- [0117] 변이체는 IgG1-005 또는 IgG1-7D8 중쇄의 가변 도메인을 변이체 내로 클로닝하고 그의 효능을 예컨대 다우디 (실시예 6) 및 빈 (실시예 10)에 대해 설명된 CDC 검정으로 시험함으로써 감소된 이펙터 기능에 대해 시험될 수 있다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 다우디 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에서 IgG1-7D8의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 다우디 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에서 IgG1-005의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-7D8 HC 가변 도메인 및 빈133 세포를 이용하여, 감소는 연구된 조건 하에서 IgG1-7D8의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 것이다. IgG1-005 HC 가변 도메인 및 빈133 세포를 이용하여, 감소는 모든 세포의 10% 내지 100%, 예컨대 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 및 약 100%의 최대 용해의 감소로 규정될 것이다. 또한, CDC 효능의 감소는 연구된 조건 하에서 IgG1-005의 EC50보다 2배 초과로 더 낮은 EC50 (빈133 세포의 용해가 검출가능한 조건 하에서 최대 용해의 1/2이 관찰되는 농도), 예컨대 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배 또는 10배 초과로 더 낮은 EC50 값에 의해 규정될 수 있다.
- [0118] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 모 항체가 항원-발현 세포, 세포막, 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합할 때 감소한다.

- [0119] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명은 항원-발현 세포, 세포막 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합할 때 항체 변이체의 이펙터 기능을 회복하기 위한, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 하나의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 항체 변이체 내의 적어도 하나의 추가의 돌연변이의 용도에 관한 것이고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고,
- [0120] 여기서 제1 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하고, 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하거나, 또는
- [0121] 제1 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하고, 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0122] 한 실시양태에서, 모 항체는 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적 항체이다.
- [0123] 모 항체가 2개의 CH2-CH3 영역을 포함하는 단일특이적 항체이면, 본 발명에 따른 돌연변이는 원칙적으로 CH2-CH3 영역 중 하나 내에만 존재할 수 있지만, 대부분의 가장 실제적인 목적을 위해 본 발명에 따른 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시키는 돌연변이는 두 CH2-CH3 영역 모두에 존재한다.
- [0124] 모 항체가 2개의 CH2-CH3 영역을 포함하는 이중특이적 항체이면, 본 발명에 따른 돌연변이는 원칙적으로 CH2-CH3 영역 중 하나; 즉, 제1 또는 제2 CH2-CH3 영역에만 존재할 수 있지만, 대부분의 실제적인 목적을 위해 본 발명에 따른 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시키는 돌연변이는 이중특이적 항체의 제1 및 제2 CH2-CH3 영역 둘 모두에 존재한다.
- [0125] 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적 항체의 적합한 예는 본원에서 설명되는 임의의 것을 포함한다.
- [0126] 특정 실시양태에서, 모 또는 제1 및/또는 제2 항체는 이중특이적 항체, 예컨대 본원에 참조로 포함된 WO 11/131746에 설명된 이종이량체 (heterodimeric) 단백질일 수 있다.
- [0127] 한 실시양태에서, 모 항체는 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0128] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환은 제2 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환과 상이하다.
- [0129] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다.
- [0130] 한 실시양태에서, 상기 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 각각의 제1 및 제2 CH2-CH3 영역에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0131] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 CH2-CH3 영역에 도입된, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이 (단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임)는 동일한 아미노산 잔기 위치 또는 상이한 위치에 존재할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 이것은 동일한 아미노산 잔기 위치에서의 동일하거나 상이한 돌연변이일 수 있다.
- [0132] 또다른 실시양태에서, 상기 방법은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 또는 제2 CH2-CH3 영역에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0133] 표 1에 열거된 임의의 돌연변이를 이중특이적 항체에 도입할 수 있다. 실시예 24는 E345R 돌연변이를 이중특이

적 CD20xEGFR 항체에 도입하면 CDC 효능이 향상됨을 보여준다. 실시예 23, 29 및 30도 본 발명에 따른 돌연변이를 포함하는 상이한 이중특이적 항체의 일부를 설명한다.

- [0134] 한 실시양태에서, 상기 방법은 S440 및 K447 이외의 다른 하나 이상의 위치에 돌연변이를 도입하고,
- [0135] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에 돌연변이 (단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님),
- [0136] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447 및 448에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에 돌연변이 (예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448E/D, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K 및 448E), 또는
- [0137] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447, 448 및 449에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에 돌연변이 (예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E, 448K/R/H 및 449P, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447E, 448K 및 449P)
- [0138] 를 추가로 도입하는 것을 포함한다.
- [0139] 한 실시양태에서, 상기 방법은 S440 이외의 다른 하나 이상의 위치에 돌연변이를 도입하고, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에 돌연변이를 추가로 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0140] 모 항체에서 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 두 아미노산 잔기 모두에 돌연변이의 도입 (단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아님)은 본원에서 "이중 돌연변이체" 측면으로 언급된다. S440Y 및 S440W 돌연변이는 다른 부분에서 설명되는 바와 같이 모 항체 내로 도입될 때 이펙터 기능을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0141] 다른 부분에서도 설명되는 바와 같이, 본 발명자들은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 확인된 돌연변이를 도입하면 이펙터 기능이 감소함을 밝혀내었다 (실시예 5, 6, 10). 그러나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기 둘 모두에 역제 돌연변이가 도입될 때, 이펙터 기능의 감소가 회복되고, 이에 의해 이펙터 기능은 K439 및 S440 돌연변이가 없는 모 항체의 이펙터 기능과 유사하게 된다. 그러나, 임의의 이론에 매이지 않으면서, K439 및 S440 돌연변이의 존재는 이펙터 기능의 유도를, K439 및 S440 돌연변이를 모두 포함하는 항체만으로 이루어진 올리고머성 복합체로 제한하는 것으로 생각된다. 따라서, K439 및 S440 돌연변이가 치료 항체에 포함되면, 임의의 이론에 매이지 않지만, 상기 치료 항체가 환자에게 투여될 때, 이펙터 기능의 유도는 K439 및 S440 돌연변이를 포함하지 않는 환자 자신의 항체가 아니라 K439/S440 돌연변이를 포함하는 치료 항체를 포함하는 올리고머성 항체 복합체로 제한되고, 따라서 치료 항체와 환자 자신의 항체의 상호작용에 의해 야기되는 임의의 잠재적인 부작용이 제한되는 것으로 생각된다.
- [0142] 위치 K439 및/또는 S440에서의 돌연변이를 제1 돌연변이와 조합할 때, CDC의 향상이 얻어지고, CDC의 특이성이 증가된다.
- [0143] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0144] A)
- [0145] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하고;
- [0146] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나, 또는
- [0147] B)
- [0148] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하고;
- [0149] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하거나; 또는
- [0150] C)

- [0151] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 폴리펩티드에 도입하고;
- [0152] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것
- [0153] 을 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물의 특이성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0154] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드, 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드는 각각 항체일 수 있다.
- [0155] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 또한
- [0156] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 항체에 도입하고;
- [0157] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제2 모 항체에 도입하는 것
- [0158] 을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아닌 것인, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물의 특이성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0159] 제1 및 제2 변이체 항체는 실시예 10에 제시된 바와 같이 임의의 야생형 또는 천연 생성 항체에 비해 서로간의 올리고머를 더 선호할 것이다.
- [0160] 특이성의 증가는 "이펙터 기능의 유도"에 대한 것이다. 따라서, 상기 방법은 한 실시양태에서 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물에 의한 이펙터 기능 유도의 특이성을 증가시키는 방법이다.
- [0161] 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물에 의한 이펙터 기능의 특이성 또는 유도의 특이성을 증가시키는 방법을 수행함으로써, 제1 변이체 및 제2 변이체 항체의 조합물이 얻어진다.
- [0162] 모 항체의 K439 또는 S440에 돌연변이를 도입함으로써, 얻어진 변이체 항체는 모 항체에 비해 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 그러나, 본원의 다른 부분에서도 설명되는 바와 같이, K439 및 S440에서의 돌연변이는 서로 보완하거나 또는 두 돌연변이를 포함하는 항체의 이펙터 기능을 회복시킬 수 있다. 서로 보완하는 K439 및 S440에서의 돌연변이의 상기 능력은 두 항체에서 유사하게 이용될 수 있다. 따라서, K439의 돌연변이가 제1 모 항체 내로 도입되고 S440에서의 돌연변이가 제2 모 항체 내로 도입되거나, 또는 그 반대로 도입될 때, 이펙터 기능의 감소는 제1 및 제2 변이체 항체가 조합 사용될 때처럼 더 이상 관찰되지 않는다. 용어 "특이성 증가" 또는 "특이성 개선"은 상기 측면에서 K439에 돌연변이를 포함하는 제1 변이체 항체 및 S440에 돌연변이를 포함하는 제2 변이체 항체의 조합물에 의해 유도되는 이펙터 반응이 K439에 돌연변이를 포함하는 제1 변이체 항체 또는 S440에 돌연변이를 포함하는 제2 변이체 항체에 의해 유도된 이펙터 반응보다 더 높음을 의미한다.
- [0163] K439 및 S440에 대한 아미노산 치환의 도입에 의해 올리고머화의 특이성이 증가된다.
- [0164] 위치 K439 및/또는 S440에서의 돌연변이를 제1 돌연변이와 조합할 때, CDC의 향상이 얻어지고, CDC의 특이성이 증가된다.
- [0165] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0166] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0167] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0168] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일하거나 상이한 VL 및 VH 서열을 갖는다.
- [0169] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물은 하나의 제1 모 항체 및 하나의 제2 항체를 포함한다.
- [0170] 한 실시양태에서, 특이성은 제1 및 제2 모 항체의 조합물이 항원-발현 세포, 세포막, 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합할 때 증가된다.
- [0171] 따라서, 또다른 측면에서 본 발명은 또한 항원-발현 세포, 세포막 또는 비리온 상의 그의 항원에 결합할 때 항체의 특이성, 예를 들어 항체에 의해 유도된 이펙터 기능을 증가시키기 위한, 항체의 2개 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이의 용도에 관한 것이고, 여기서 제1 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하

는 아미노산 잔기에 존재하고, 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.

- [0172] 추가의 측면에서, 본 발명은 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물의 이펙터 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 제1 및 제2 모 폴리펩티드는 각각 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고, 여기서 상기 방법은
- [0173] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0174] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0175] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0176] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0177] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0178] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 적어도 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드에 도입하는 것을 포함한다.
- [0179] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드는 각각 항체일 수 있다.
- [0180] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물의 이펙터 기능을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 제1 및 제2 모 항체는 각각 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 방법은
- [0181] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0182] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0183] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0184] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0185] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0186] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 적어도 제1 및/또는 제2 모 항체에 도입하는 것을 포함한다.
- [0187] 상기 방법을 수행함으로써 적어도 제1 및 제2 변이체 항체의 조합물이 얻어진다. 상기 방법에 의해 얻어진 적어도 제1 및 제2 변이체 항체는 조합될 때 제1 및 제2 모 항체의 조합물에 비해 증가된 이펙터 기능을 갖는다.
- [0188] 용어 "증가된 이펙터 기능"은 본원에서 설명되는 바와 같이 이해되어야 한다.
- [0189] 제1 및/또는 제2 모 항체는 본원에서 설명되는 임의의 모 항체일 수 있다.
- [0190] 제1 및 제2 항체의 조합물의 이펙터 기능을 증가시키는 방법은 특히 본원에서 설명되는 바와 같은 변이체 항체의 임의의 특징을 갖는 제1 및/또는 제2 변이체 항체를 얻기 위해 수행될 수 있다. 본 발명자들은 (a), (b), (c), (d) 및/또는 (e)로부터 선택되는 아미노산 잔기 내로 돌연변이를 도입하면 제1 및 제2 모 항체의 조합에 비해 증가된 이펙터 기능을 갖는 제1 및 제2 변이체 항체의 조합물이 생성됨을 밝혀내었다.
- [0191] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0192] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0193] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0194] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일하거나 상이한 VL 및 VH 서열을 갖는다.
- [0195] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물은 하나의 제1 모 항체 및 하나의 제2 항체를 포함한다.
- [0196] 한 실시양태에서, 적어도 제1 및 제2 모 항체의 조합물은 추가의 모 항체, 예컨대 제3, 제4 또는 제5 모 항체를 포함한다.

- [0197] 한 실시양태에서, (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 P247 또는 E430에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.
- [0198] 한 실시양태에서, (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 I253, S254 및 Q311에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.
- [0199] 한 실시양태에서, (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 D/E356 및 T359에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.
- [0200] 한 실시양태에서, (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기는 Y436 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기이다.
- [0201] (b), (c), (d) 및 (e)에서 아미노산 잔기는 두 항체의 Fc:Fc 계면에 위치하는 아미노산 잔기이고, 따라서, 한 항체의 Fc 부분은 또다른 항체의 Fc 부분과 상호작용할 수 있고, 두 항체는 서로 근접하여 존재한다.
- [0202] 따라서, 추가의 실시양태에서, 적어도 제1 및/또는 제2 모 항체 내의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이이고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0203] 한 실시양태에서, (i)는 제1 및 제2 모 항체 둘 모두에 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다.
- [0204] 또다른 실시양태에서, 상기 방법은
- [0205] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 제1 모 항체에 도입하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고,
- [0206] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하지 않는 제2 모 항체를 제공하는 것을 포함한다.
- [0207] 한 실시양태에서, 상기 방법은 S440 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에 돌연변이를 도입하는 것을 포함하고, 상기 방법은 S440 이외의 다른 하나 이상의 위치에 돌연변이를 도입하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 방법은
- [0208] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 위치 K439에 대응하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제1 모 항체에 도입하는 단계; 및
- [0209] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 위치 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제2 모 항체에 도입하는 단계
- [0210] 를 추가로 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고; 단계 (ii) 및 (iii)은 대안적으로
- [0211] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 위치 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제1 모 항체에 도입하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아닌 단계; 및
- [0212] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 위치 K439에 대응하는 아미노산 잔기에서의 제2 돌연변이를 제2 모 항체에 도입하는 단계일 수 있다.
- [0213] 제2 모체가 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 본 발명의 실시양태에 대해, 단계 (ii)에서 용어 "제2 돌연변이"는 제1 돌연변이일 수 있고, 예를 들어, 제2 모 항체는 단계 (ii)에서 도입된 돌연변이 이외의 다른 돌연변이를 포함하지 않을 수 있다. 또한, 단계 (i) 및 (ii)에서 용어 "제2 돌연변이"는 제1 및/또는 제2 모 항체 내로 도입될 수 있는 돌연변이의 수를 제한하고자 의도되지 않는다.
- [0214] 한 실시양태에서, 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 각각 단일특이적, 이중특이적 및 다중특이적 항체로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다. 이중특이적 항체는 예를 들어, 이중이량체 단백질일 수 있다.
- [0215] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 예를 들어 동일하거나 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 단일특이적

항체이다. 제1 및 제2 모 항체가 상이한 에피토프에 결합하면, 이것은 동일하거나 상이한 항원 상에 존재할 수 있다.

[0216] 또다른 실시양태에서, 제1 모 항체는 단일특이적 항체이고, 제2 모 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이거나, 또는 그 반대이다.

[0217] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 이중특이적 또는 다중특이적 모 항체는 동일하거나 상이한 항체이다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 이중특이적 또는 다중특이적 모 항체는 동일하거나 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 적어도 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다.

[0218] 또다른 실시양태에서, 제1 모 항체는 단일특이적 항체이고 제2 모 항체는 이중특이적 항체이거나, 또는 그 반대이다. 단일특이적 항체는 이중특이적 항체 (이중특이적 항체의 한 부분)와 동일한 에피토프에 결합할 수 있거나 또는 단일특이적 및 이중특이적 항체는 동일하거나 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 동일하거나 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0219] 한 실시양태에서, 상기 적어도 제1 및 제2 모 항체는 각각 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407, 및 K409에 대응하는 위치로부터 선택되는 위치에 추가의 아미노산 치환을 포함하고, 제1 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환은 제2 CH2-CH3 영역 내의 상기 추가의 아미노산 치환과 상이하다.

[0220] 추가의 실시양태에서, 상기 제1 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 위치에 아미노산 치환을 포함하고, 상기 제2 CH2-CH3 영역은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다.

[0221] 본 발명의 방법 및/또는 용도의 한 실시양태에서, 모 항체이든 제1 모 항체이든 또는 제2 모 항체이든 상관없이, 모 항체는 이펙터 기능에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 다른 돌연변이는 이펙터 기능에 영향을 주는 본 발명의 돌연변이와 동시에 도입될 수 있거나 또는 순차적으로 도입될 수 있고, 본 발명의 방법 또는 용도는 돌연변이의 동시 또는 순차적인 도입으로 제한되지 않는다. 이중특이적 항체는 임의의 이중특이적 항체일 수 있고, 본 발명의 방법 및 용도는 상이한 방식이 사용될 수 있다고 예상되기 때문에 임의의 특정 이중특이적 방식으로 제한되지 않는다.

[0222] 이펙터 기능을 증가시킬 수 있는 상기 돌연변이 중의 하나를 포함하는 제1 항체를 상기 돌연변이를 포함하지 않는 제2 항체와 조합하는 방법은 실시예 31에 제시된 바와 같이 조합물의 이펙터 기능을 증가시킬 수 있다. 따라서, 이론에 매이지 않지만, 예를 들어, 상기 방법은 안전한 것으로 증명되었지만 충분히 효율적이지 않은 제2 항체로서의 치료 항체를 돌연변이를 포함하는 제1 항체와 조합하여 효능있는 조합물을 생성하기 위해 사용될 수 있는 것으로 생각된다.

[0223] 따라서, 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 제2 모 항체는 치료 항체이다. 특정 실시양태에서, 이 항체는 적합한 안전성 프로파일을 갖는 치료 항체이다. 한 실시양태에서, 이 항체는 적합한 안전성 프로파일을 갖지만 충분한 효능을 보이지 않는 치료 항체일 수 있다.

[0224] 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는 적합한 제2 항체의 예는 다음 중 임의의 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다: (90Y) 클리바투주맙 테트라세탄; (90Y) 타카투주맙 테트라세탄; (99mTc) 파놀레스맙; (99mTc) 노페투모맙 메르펜탄; (99mTc) 핀투모맙; 3F8; 8H9; 아바고보맙; 아바타셉트; 압식시맙; 약톡수맙; 아달리무맙; 아테카투무맙; 아펠리모맙; 아플리베르셉트; 아푸투주맙; 알라치주맙 페골; 알비글루티드; ALD518; 알레파셉트; 알렘투주맙; 알리로쿠맙; 알투모맙; 알투모맙 펜테테이트; 알비르셉트 수도톡스; 아마톡시맙; AMG714/HuMax-IL15; 아나투모맙 메페나톡스; 안루킨주맙 (=

IMA-638); 아폴리주맵; 아크시투모맵; 아셀리주맵; 아탈시셉트; 아티누맵; 아틀리주맵 (= 토실리주맵); 아토콜리무맵; 바미네르셉트; 바피네우주맵; 바실릭시맵; 바비톡시맵; 벡투모맵; 벨라타셉트; 벨리무맵; 벤칼리주맵; 베르틸리무맵; 베실레소맵; 베바치주맵; 베즐로톡수맵; 비치로맵; 비파르셉트; 비바투주맵; 비바투주맵 메르탄신; 블리나투모맵; 블로소주맵; 브렌톡시맵 베도틴; 브리아키누맵; 브리오바셉트; 브로달루맵; 카나키누맵; 칸투주맵 메르탄신; 칸투주맵 라브탄신; 카플라치주맵; 카프로맵; 카프로맵 펜데티드; 카를루맵; 카투막소맵; CC49; 세텔리주맵; 세르톨리주맵 페골; 세톡시맵; Ch.14.18; 시타투주맵 보가톡스; 식수투무맵; 클라자키주맵; 클레놀릭시맵; 클리바투주맵 테트라세탄; 코나투무맵; 콘베르셉트; CR6261; 크레네주맵; 다세투주맵; 다클리주맵; 달란테르셉트; 달로투주맵; 다라투무맵; 템시주맵; 데노수맵; 데투모맵; 도를리모맵 아리톡스; 드로지투맵; 둘라글루티드; 에크로벡시맵; 아쿨리주맵; 에도바코맵; 에드레콜로맵; 에팔리주맵; 에폰구맵; 엘로투주맵; 엘실리모맵; 에나바투주맵; 엔리모맵; 엔리모맵 페골; 에노키주맵; 엔시톡시맵; 에피투모맵; 에피투모맵 시톡세탄; 에프라투주맵; 에를리주맵; 에르투막소맵; 에타네르셉트; 에타라시주맵; 에트롤리주맵; 엑스비비루맵; 파놀레소맵; 파랄리모맵; 파를레투주맵; 파시누맵; FBTA05; 펠비주맵; 페자키누맵; 피클라투주맵; 피기투무맵; 플란볼루맵; 폰톨리주맵; 포탈루맵; 포라비루맵; 프레솔리무맵; 플라누맵; 갈릭시맵; 가니투맵; 간테네루맵; 가빌리모맵; 겐투주맵; 겐투주맵 오조가미신; 게보키주맵; 기렌톡시맵; 글렘바투무맵; 글렘바투무맵 베도틴; 골리무맵; 고밀릭시맵; GS6624; 항-CD74 항체; WO 2011/110642에 개시된 바와 같은 항-cMet 항체; WO 2011/147986 또는 WO 2011/147982에 개시된 바와 같은 항-Her2 항체; WO 2004/058797에 개시된 바와 같은 항-IL8 항체; WO 2004/045512에 개시된 바와 같은 항-TAC 항체; WO 2010/066803 또는 WO 2011/157741에 개시된 바와 같은 항-조직 인자 (TF) 항체; 이발리주맵; 이브리투모맵 티옥세탄; 이크루쿠맵; 이고보맵; 임시로맵; 인클라쿠맵; 인다톡시맵 라브탄신; 인플릭시맵; 이놀리모맵; 이노투주맵 오조가미신; 인테투무맵; 요오드 (124I) 기렌톡시맵; 이필리무맵; 이라투무맵; 이톨리주맵; 익세키주맵; 켈릭시맵; 라베투주맵; 레브리키주맵; 레말레소맵; 레네르셉트; 레르텔리무맵; 렉사투무맵; 리비비루맵; 린투주맵; 로르보투주맵 메르탄신; 루카투무맵; 루밀릭시맵; 마파투무맵; 마슬리모맵; 마투주맵; 마브릴리무맵; 메폴리주맵; 메텔리무맵; 밀라투주맵; 민레투모맵; 미로코셉트; 미투모맵; 모가몰리주맵; 모몰리무맵; 모타비주맵; 목세투모맵; 파수도톡스; 무로모넬-CD3; 나콜로맵 타페나톡스; 나밀루맵; 나프투모맵 에스타페나톡스; 나르나투맵; 나탈리주맵; 네바쿠맵; 네시투무맵; 네텔리모맵; 니모투주맵; 니블루맵; 노페투모맵; 메르펜탄; 오비누투주맵; 오카라투주맵; 오크텔리주맵; 오둘리모맵; 오파투무맵; 올라라투맵; 올로키주맵; 오말리주맵; 오나르투주맵; 오네르셉트; 오포르투주맵 모나톡스; 오레고보맵; 오텔릭시주맵; 옥셀루맵; 오조랄리주맵; 파키박시맵; 팔리비주맵; 파니투무맵; 파노바쿠맵; 파스콜리주맵; 파테클리주맵; 파트리투맵; 페그수네르셉트; 펜투모맵; 페르투주맵; 펙셀리주맵; 핀투모맵; 파클라쿨루맵; 포네주맵; 프릴릭시맵; 프리투무맵; PRO 140; 켈리주맵; 라코투모맵; 라드레투맵; 라피비루맵; 라무치루맵; 라니비주맵; 락시바쿠맵; 레가비루맵; 레슬리주맵; RG1507/HuMax-IGF1R; RG1512/HuMax-pSelectin; 릴로나셉트; 릴로투무맵; 리톡시맵; 로바투무맵; 롤레두맵; 로모소주맵; 룬탈리주맵; 로벨리주맵; 루폴리주맵; 사말리주맵; 사릴루맵; 사투모맵; 사투모맵 펜데티드; 세쿠키누맵; 세비루맵; 시브로투주맵; 시팔리무맵; 실톡시맵; 시폴리주맵; 시루쿠맵; 솔라네주맵; 솔리토맵; 소넵치주맵; 손투주맵; 소타테르셉트; 스타물루맵; 술레소맵; 수비주맵; 타발루맵; 타카투주맵 테트라세탄; 타도치주맵; 탈리주맵; 타네주맵; 타플리투모맵 팜톡스; 테피바주맵; 텔리모맵 아리톡스; 테나투모맵; 테넬릭시맵; 테폴리주맵; 테프로투무맵; TGN1412; 티실리무맵 (= 트레텔리무맵); 티가투주맵; TNX-650; 토실리주맵 (= 아틀리주맵); 토랄리주맵; 토랍셀; 토시투모맵; 트랄로키누맵; 트라스투주맵; 트라스투주맵 엠탄신; TRBS07; 트레바나닙; 트레갈리주맵; 트레텔리무맵; 투코투주맵 셀물류킨; 투비루맵; 우블리톡시맵; 우렐루맵; 우르톡사주맵; 우스테키누맵; 바팔릭시맵; 바텔리주맵; 베둘리주맵; 벨투주맵; 베팔리모맵; 베센쿠맵; 비실리주맵; 볼로식시맵; 보르세투주맵 마포도틴; 보투무맵; 잘루투무맵; 자놀리무맵; 지탈리무맵; 및 줄리모맵 아리톡스.

[0225] 본 발명의 방법 및 용도의 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기들의 돌연변이 (단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다)는 표 1에 열거된 임의의 예시적인 및 바람직한 아미노산 위치에 존재할 수 있다. 따라서, 표 1에 열거된 각각의 아미노산 위치는 적어도 하나의 아미노산의 돌연변이에 대한 별개의 비-제한적인 실시양태이다.

[0226] 본원에서 설명되는 임의의 돌연변이 또는 그의 조합이 본 발명의 방법에 따라 도입될 수 있다.

[0227] 예시적인 또는 바람직한 아미노산 치환으로부터 선택된 돌연변이는 항원-결합된 항체의 올리고머 형성 및 향상된 C1q-결합, 보체 활성화, CDC, ADCC 및/또는 내재화의 검출을 허용하는 적절한 검정, 예컨대 실시예에 설명된 검정에서 시험될 수 있다. 예를 들어, C1q-결합력은 항체 변이체에 대해 항원을 발현하는 세포를 사용하여 실시예 4에 설명된 것과 유사한 검정에 따라 결정될 수 있다. 예시적인 CDC 검정을 실시예 5, 6, 10, 16, 19,

22, 23, 24, 또는 25에 제시한다. 예시적인 ADCC 검정을 실시예 12에 제시한다. 예시적인 내재화 검정을 실시예 26에 제시한다. 마지막으로, C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이와 올리고머 형성에 영향을 주는 돌연변이를 구별하기 위해, 예를 들어, 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합은 예를 들어, 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교될 수 있다.

- [0228] 추가의 실시양태에서, 상기 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440 및 Q386에 대응하는 잔기로부터 선택되고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0229] 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E382 및 H433에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0230] 특정 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0231] 특정 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E430에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0232] 특정 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하고, 단 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0233] 특정 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 Q386에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0234] 대안적 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E382 또는 H433에 대응하는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0235] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 치환, 아미노산 결실 또는 아미노산 삽입일 수 있다.
- [0236] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 결실이다.
- [0237] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 삽입이다.
- [0238] 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 치환이다.
- [0239] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 표 1에 열거된 임의의 아미노산 치환, 아미노산 결실로부터 선택될 수 있다. 또한, 표 1에 열거된 각각의 구체적인 아미노산 잔기에서 각각의 바람직한 아미노산 치환은 상기 용도를 위한 별개의 구체적인 비-제한적인 실시양태이다. 예시적인 아미노산 치환은 E 잔기를 R 잔기로 교환하고, H 잔기를 R 잔기로 교환하는 것을 포함한다.
- [0240] 추가의 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440Y 또는 W, 및 Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예를 들어, 임의의 천연 아미노산 또는 비-자연 발생 아미노산을 나타낸다. X는 특히 임의의 20개의 자연 발생 아미노산을 나타낼 수 있다.
- [0241] 따라서, 한 실시양태에서, 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440(Y 또는 W), 및 Q386에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 존재하고, 바람직하게는 돌연변이는 E345(R, Q, N, 또는 K), E430(T, S, 또는 G), S440(Y 또는 W), 또는 Q386(K) 중 적어도 하나의 아미노산 치환이다.
- [0242] 따라서, 한 실시양태에서, E345X는 E345R, Q, N, K, Y, A, C, D, F, G, H, I, L, M, P, S, T, V, W, 또는 Y; 특히 E345A, D, G, H, K, N, Q, R, S, T, Y 또는 W, 또는 보다 특히 E345D, K, N, Q, R, 또는 W; 또는 훨씬 더 특히 E345R, Q, N, K, 또는 Y일 수 있다. 또다른 추가의 실시양태에서, E430X는 E430T, S, G, F, H, A, C, D, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, 또는 Y; 특히 E430T, S, G, F, 또는 H일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 아미노산 치환은 E345R, E345Q, E345N, E345K, E345Y, E430T, E430S, E430G, E430F, E430H, S440W 및 S440Y를 포함하는 군으로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 E345R 및 E430G로부터 선택된다. 추가의 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 E345R이다. 추가의 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 E430G이다.
- [0243] 대안적 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 I253,

H310, Q311, E382, G385, H433, N434, Y436, 및 Q438, 예컨대 E382 또는 H433에 대응하는 잔기로 이루어진 군 으로부터 선택된다. 추가의 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 I253E, N, Q, S 또는 T, 예를 들어, I253N 또는 Q; H310N, Q, W 또는 Y, 예를 들어, H310Q; Q311E 또는 R, E382D, H, K, R, N, Q, S, T, W 또는 Y, 예를 들어, E382D, Q, K, 또는 R; G385E, H, K, N, Q, R, S, T, W 또는 Y, 예를 들어, G385D, E, K 또는 R; H433R; N434D, E, H, K, Q, R, S, T, W 또는 Y, 예를 들어, N434H, K, Q 또는 R; Y436A, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T 또는 V, 예를 들어, Y436N, Q, S 또는 T; Q438A, E, G, H, K, N, Q, R, S, T, W 또는 Y, 또는 예를 들어, Q438 N, S 또는 T에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환일 수 있다.

[0244] 따라서, 추가의 또다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 P247G, I253V, S254L/V, Q311L/W, D/E356G/R, T359R, E382L/V, 및 Y436I, 예를 들어, 특히 E382L, V, D, Q, K, 또는 R 또는 H433R에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환일 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 E382R 및 H433R로부터 선택된다. 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 E382R이다. 또다른 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 H433R이다.

[0245] 또다른 실시양태에서, 돌연변이는 임의로 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합을 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교함으로써 결정되는, C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에 존재하지 않는다.

[0246] 한 실시양태에서, 돌연변이는 I253, N434, 또는 Q311에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하지 않고, 임의로 H433에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하지 않거나, 또는 아미노산 치환은 H433A가 아니다.

[0247] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 돌연변이는 하나의 돌연변이이고, 즉, 단지 하나의 돌연변이가 모 항체에 도입된다.

[0248] 또다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 표 1 내의 적어도 2개, 예컨대 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과 아미노산 잔기에 돌연변이를 도입하는 것을 포함한다.

[0249] 본원에서 설명되는 돌연변이의 임의의 조합이 본 발명의 방법에 따라 도입될 수 있다.

[0250] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.

[0251] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법 또는 용도는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 모 항체에 도입하는 것을 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고, 예컨대 적어도 2개의 아미노산에서의 돌연변이는 다음으로부터 선택된다: E345(R, Q, N, 또는 K), E430(T, S, 또는 G), S440(Y 또는 W), 또는 Q386(K).

[0252] 대안적 실시양태에서, 제1 돌연변이의 위치는 위치 I253, H310, Q311, E345, E382, G385, H433, N434, Y436, 및 Q438로 이루어진 군 으로부터 선택될 수 있다.

[0253] 한 실시양태에서, 방법은 제1 및/또는 제2 Fc-영역 내의 E345, E430, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 또는 K447에 대응하는 아미노산 잔기에서의 추가의/제3 돌연변이를 항체에 도입하는 것을 추가로 포함한다.

[0254] 예를 들어, 1개 초과, 예컨대 2, 3, 4, 또는 5개, 특히 2 또는 3개의 돌연변이가 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 모 항체에 도입된다. 예를 들어, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430 및 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기, 예컨대 E345, E430 및 S440 중의 2개 또는 전부가 임의로 표 1에 열거된 하나 이상의 다른 아미노산의 돌연변이와 조합되어 돌연변이될 수 있다. 적어도 2개의 돌연변이는 위치 E430 또는 S440의 임의의 아미노산 잔기 치환과 조합된 위치 E345의 임의의 아미노산 잔기 치환일 수 있거나, 또는 위치 S440의 임의의 아미노산 잔기와 조합된 위치 E430의 임의의 아미노산 치환일 수 있다.

[0255] 추가의 실시양태에서, 2 또는 3개의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440 및 Q386에 대

응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 모 항체에 도입된다.

- [0256] 한 실시양태에서, 하나 초과와 돌연변이는 특히 아미노산 치환일 수 있다.
- [0257] 따라서, 본 발명에 따르면, 방법 또는 용도는 항체에 P247G, I253V, S254L, Q311L/W, E345X, D/E356G/R, T359R, E382L/V, Q386K, E430X, Y436I, 및 S440Y/W로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1개, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 아미노산 치환을 도입하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 아미노산 치환은 E345X, E430X, S440Y/W, 및 Q386K로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0258] 대안적 실시양태에서, 적어도 2개의 돌연변이, 예컨대 2, 3, 4 또는 5개의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 H310, G385, H433, N434, 및 Q438에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 존재한다.
- [0259] 또다른 대안적 실시양태에서, 적어도 하나의 돌연변이, 임의로 2 또는 3개의 돌연변이는 E345R, E382R, 및 H433R로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 대안적 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E382 및 H433에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기, 예컨대 둘 모두는 임의로 표 1에 열거된 하나 이상의 다른 아미노산의 돌연변이와 조합하여 돌연변이될 수 있다.
- [0260] 본 발명의 방법 및/또는 용도의 일부 실시양태에서, K439 및/또는 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 모 항체, 제1 모 항체, 제2 모 항체 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체에 도입된다. 상기 설명된 바와 같이, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 도입하면 항체 사이의 분자간 상호작용은 상기 돌연변이를 포함하는 항체로 제한되는 것으로 밝혀졌다 (실시예 4, 5, 6, 10). K439 및 S440이 동일한 모 항체에 또는 각각 제1 및 제2 모 항체 내에 도입되는지의 여부에 따라, 이들 측면은 "이중 돌연변이체" 및 "혼합된 돌연변이체" 측면으로도 언급된다.
- [0261] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 치환이다.
- [0262] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 아미노산 치환이다.
- [0263] 본 발명의 모든 실시양태에서, 동일한 폴리펩티드 또는 항체 내이든, 또는 제1 및 제2 폴리펩티드 또는 항체이든 상관없이 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는
- [0264] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447 및 448에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에서의 돌연변이, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448E/D, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K 및 448E, 또는
- [0265] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447, 448 및 449에 대응하는 각각의 아미노산 잔기에서의 돌연변이, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E, 448K/R/H 및 449P, 바람직하게는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447E, 448K 및 449P로 교체될 수 있다.
- [0266] 따라서, 상기 돌연변이의 조합은 표 2A 및 2B에 기재된 임의의 것을 포함한다.
- [0267] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 두 아미노산의 치환이다.
- [0268] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환이다.
- [0269] 또다른 실시양태에서, 돌연변이는 K439E이다.
- [0270] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환이다.
- [0271] 또다른 실시양태에서, 돌연변이는 S440K이다.
- [0272] 따라서, 추가의 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서 모 항체에 도입되는 돌연변이는 K439E 및 D 및 S440K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환이다.
- [0273] 따라서, 추가의 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기에서 모

항체에 도입되는 돌연변이는 아미노산 치환 K439E 및 S440K이다.

[0274] 본 발명의 일부 방법 및 용도는 제1 및 제2 모 항체를 포함한다.

[0275] 따라서, 추가의 실시양태에서, K439에 대응하는 아미노산 잔기에서 제1 모 항체에 도입된 돌연변이는 K439E 및 D로부터 선택되는 아미노산 치환, 예를 들어, K439E이고, S440에 대응하는 아미노산 잔기에서 제2 모 항체에 도입된 돌연변이는 S440K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산 치환, 예를 들어, S440K이다. 제1 및 제2 모 항체 내의 돌연변이는 그 반대로 도입될 수 있고, 즉, S440에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 제1 모 항체 내에 도입되고, K439에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이가 제2 모 항체 내에 도입될 수 있고, 여기서 돌연변이는 상기한 바와 같은 바람직한 아미노산 치환일 수 있다.

[0276] 본 발명에 따른 방법 또는 용도의 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체가 그의 항원에 결합할 때 증가한다.

[0277] 추가의 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체가 그의 항원에 결합할 때 증가하고, 여기서 항원은 항원-발현 세포, 세포막, 또는 비리온 상에 존재한다. 한 실시양태에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330의 서열을 포함한다.

[0278] 모 항체는 본원에서 설명되는 임의의 모 항체일 수 있다. 상기 측면에서 모 항체는 또한 제1 모 및 제2 모 항체도 의도된다.

[0279] 한 실시양태에서, 모 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체이다.

[0280] 한 실시양태에서, 모 항체는 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.

[0281] 한 실시양태에서, 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 서열 1 또는 5를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 항체 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1m(za) 또는 IgG1m(f) 동종이형이다.

[0282] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 2를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG2 항체이다.

[0283] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 3을 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG3 항체이다.

[0284] 한 실시양태에서, 모 항체는 서열 4를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG4 항체이다.

[0285] 한 실시양태에서, 모 항체는 이중특이적 항체이다.

[0286] 한 실시양태에서, 모 항체는 본원에서 설명되는 임의의 항체, 예를 들어 Fc-영역의 적어도 일부를 포함하는 항체 단편, 일가 항체 (WO2007059782 (젠맵)에 설명됨); 2개의 중쇄로만 이루어지고 예를 들어 낙타류에서 천연 생성되는 중쇄 항체 (예를 들어, [Hamers-Casterman (1993) Nature 363:446]); 티오맵 (로슈, WO2011069104), 비대칭적 및 이중특이적 항체-유사 분자인 가닥-교환 조작된 도메인 (씨드 또는 씨드바디 (머크, WO2007110205)); 트리오맵 (Fresenius, Lindhofer et al., 1995 J Immunol 155:219); Fc Δ Adp (리제네론, WO2010151792), 아지메트릭 스캐폴드 (자임웁스/머크, WO2012/058768), mAb-Fv (젠코르, WO2011/028952), 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (애보트, DVD-Ig, 미국 특허 7,612,181); 이중 도메인 이중 헤드 항체 (유니레버; 사노피 아벤티스, WO20100226923), 디-디아바디 (임클론/일라이 릴리), 노브-인투-홀 항체 형식 (제넨테크, WO9850431); 듀오바디 (젠맵, WO 2011/131746); 정전기적 유도 항체 형식 (암젠, EP1870459 및 WO 2009089004; 추가, US201000155133; 온코메드, WO2010129304A2); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로싸이언시스 코퍼레이션, WO11143545), 크로스맵 (로슈, WO2011117329), LUZ-Y (제넨테크), 비클로닉 (메루스), 이중 표적화 도메인 항체 (GSK/도만티스), 2개의 표적을 인식하는 투-인-원 항체 (제넨테크, 노브임문), 가교결합된 Mab (카르마노스 캔서 센터), CovX-바디 (CovX/화이자), IgG-유사 이중특이적 (임클론/일라이 릴리, [Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74]), 및 DIG-바디 및 PIG-바디 (파르맵신), 및 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART, 마크로제닉스, WO/2008/157379, WO/2010/080538), 자이바디 (자인게니아), 공통 경쇄 (크루셀/메루스, US7262028) 또는 공통 중쇄를 사용한 방법 (κ λ 바디, 노브임문), 및 Fc-도메인을 함유하는 항체 단편에 융합된 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질, 예를 들어 scFv-융합체, 예를 들어 BsAb (자이모제네틱스/BMS), 헤르쿨레스 (바이오젠 이텍, US007951918), 스포피언스 (이머전트 바이오솔루션스/트루비온), Ts2Ab (메드이문/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), scFv 융합체 (노바티스), scFv 융합체 (장저우 아담 바이오테크 인크 (CN 102250246)), TvAb (로슈, WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² (f-스타, WO2008/003116), 및 이중 scFv-융합체이다. 또한, 달리 특정되지 않으면, 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (예컨대 인간 모노클로날 항체), 예를 들어 심포겐 및 메루스 (올리고클로닉스)에 의해 이용된 기술에 의해 생성된 항체 혼합물 (재조합 폴리클로날 항체), 및 항체-유사

폴리펩티드, 예컨대 키메릭 항체 및 인간화 항체도 포함함을 이해되어야 한다. 생성된 항체는 잠재적으로 임의의 이소형을 가질 수 있다.

- [0287] 일가 항체, 중쇄 항체, 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED), 트리오맵, 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (DVD-Ig), 노브-인투-홀 항체, 미니-항체, 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART); LUZ-Y 항체, 비클로닉 항체, 이중 표적화 (DT)-Ig 항체, 투-인-원 항체, 가교결합된 Mab, mAb², CovX-바디, IgG-유사 이중특이적 항체, Ts2Ab, BsAb, 헤르쿨레스 항체, TvAb, ScFv/Fc 융합 항체, 스콜피언, Fc 도메인에 융합된 scFv 단편, 및 Fc 도메인에 융합된 이중 scFv 단편으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택된다.
- [0288] 또다른 실시양태에서, 항원은 세포의 표면 상에 발현된다.
- [0289] 또다른 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포이다.
- [0290] 추가의 실시양태에서, 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrVIII, IGF α , L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0291] 또다른 실시양태에서, 항원은 세포막과 회합된다.
- [0292] 또다른 실시양태에서, 항원은 비리온과 회합되고, 임의로 항원은 비리온의 단백질 코트 또는 지질 외피에 포함된다.
- [0293] 또다른 실시양태에서, 항체는 CD20 및 CD38로부터 선택되는 적어도 하나의 항원에 임의로 결합하는 인간 항체이다.
- [0294] 또다른 실시양태에서, 항체는 7D8 및 005 중의 적어도 하나와 동일한 에피토프에 결합하고, 임의로 7D8 및 005 중 적어도 하나의 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함한다.
- [0295] 개시된 발명에 따른 임의의 용도에서, 본 발명의 임의의 돌연변이를 갖지 않는 항체는 임의의 모 항체일 수 있다. 따라서, 본원에서 용도는 상기 모 항체의 임의의 변이체를 제공한다.
- [0296] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 이펙터 기능은 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옉소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조절, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 이펙터 기능이다.
- [0297] 특정 실시양태에서, 이펙터 기능은 C1q-결합, 보체 활성화 (C1q 효능), 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), Fc-수용체 결합, 예를 들어 Fc-감마 수용체 결합, Fc-함유 폴리펩티드 내재화 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0298] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 C1q-결합이다.
- [0299] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 보체 활성화 (C1q 효능)이다.
- [0300] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 보체 의존적 세포독성 (CDC)이다.
- [0301] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)이다.
- [0302] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 예를 들어 Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합이다.
- [0303] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 Fc-함유 폴리펩티드 내재화이다.
- [0304] 한 실시양태에서, 이펙터 기능은 보체 의존적 세포독성 (CDC) 및 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)의 조합이다.
- [0305] 또다른 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이는 FcRn-결합, ADCC, Fc-감마 수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-향상된 세포독성, 항체에 의해 매개된 옉소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 추가의 이펙터 기능을 증가시킨다.
- [0306] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 Fc-영역 내의 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키는 단계를 포함하는,

C1q에 대한 모 항체 제제의 결합력을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0307] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "C1q-결합"은 모 항체의 변이체 또는 항체의 측면에서 사용될 때 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 변이체 또는 항체의 결합에 의해 매개된 보체 활성화의 전통적인 경로에 대한 제1 성분의 임의의 메카니즘을 포함한다. 항체의 C1q-결합은 ELISA (예컨대 예를 들어, 실시예 3 및 4에 사용된 C1q-결합 ELISA)를 사용하여 평가할 수 있거나, 또는 C1q 효능은 CDC 검정 (예컨대 예를 들어, 실시예 5에 사용된 CDC 검정)에 의해 평가될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 항체의 C1q-결합력은 실시예 4에 설명된 검정에 따라 결정한다.
- [0308] 개시된 발명에 따른 모든 방법에서, 본 발명의 임의의 돌연변이를 갖지 않는 항체는 임의의 모 항체일 수 있다. 따라서, 본원의 방법은 상기 모 항체의 임의의 변이체를 제공한다.
- [0309] 본 발명의 방법 및/또는 용도에 의해 얻어진 모 항체, 제1 모 항체, 제2 모 항체, 또는 그의 변이체는 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 표적에 결합할 수 있다.
- [0310] 본 발명이 작용할 수 있는 항원 또는 표적의 예는 다음과 같다: 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM 17; AFP; AXL; ANGPT2 탄저 항원; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; 암종 연관 항원 CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; 클라우딘4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; 크립토; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; 엔도텔린 B 수용체; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP 알파; Fc 감마 RI; FCER2; FGFR3; 피브린 II 베타 사슬; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; GD3 강글리오시드; GDF2; GLP1R; 글리피칸-3; GPNMB; HBV (B형 간염 바이러스); HCMV (인간 사이토메갈로바이러스); 열 충격 단백질 90 상동체 [칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)]; 단순 포진 바이러스 gD 당단백질; HGF; HIV-1; HIV-1 IIIB gp120 V3 루프; HLA-DRB (HLA-DR 베타); 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 이중특이적; IgE Fc; IGF1R; IGHE 연결 영역; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; 인터루킨-2 수용체 베타 서브유닛; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; 루이스-y; 지질 A, 지다당체 LPS의 도메인; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; NCA-90 과립구 세포 항원; 넥틴 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; 포스포티달세린; PTK-7; 슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 혈청형 IATS 011; RSV (인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; 시가-유사 독소 II B 서브유닛 [에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*)]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; 스탕필로코쿠스 에피데르미디스 (*Staphylococcus epidermidis*) 리포테이코산; T 세포 수용체 알파-베타; TF; TGFBI; TGFBI; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; 및 비덴틴.
- [0311] 이펙터 반응의 유도 방법
- [0312] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0313] 추가의 주요 측면에서, 본 발명은
- [0314] (i) 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따라 돌연변이된 모 폴리펩티드 또는 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 조합물을 제공하고;
- [0315] (ii) 단계 (i)의 돌연변이된 모 폴리펩티드의 제제 또는 단계 (i)의 적어도 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드의 돌연변이된 조합물을 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온과 접촉시키는 것
- [0316] 을 포함하는, 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드가 결합하는 표적을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 이펙터 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0317] 한 실시양태에서, 임의의 또는 모든 모 폴리펩티드, 제1 모 폴리펩티드 및 제2 모 폴리펩티드는 항체일 수

있다.

- [0318] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 세포, 세포막, 비리온 또는 항원(들)과 회합하는 다른 입자에 대한 이펙터 반응, 예를 들어 보체 활성화, CDC 또는 다른 이펙터 반응을 유도하기 위해 본원에서 설명되는 항체 변이체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한
- [0319] (i) 본원에서 설명되는 임의의 방법에 따라 돌연변이된 모 항체 또는 적어도 제1 모 항체 및 제2 모 항체의 조합물을 제공하고;
- [0320] (ii) 단계 (i)의 돌연변이된 모 항체의 제제 또는 단계 (i)의 적어도 제1 모 항체 및 제2 모 항체의 돌연변이된 조합물을 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온과 접촉시키는 것
- [0321] 을 포함하는, 모 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 이펙터 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0322] 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 각각 본원에서 설명되는 임의의 모 항체, 특히 항체의 이펙터 기능에 영향을 주는 방법과 관련하여 상기 설명한 임의의 것으로부터 선택될 수 있다.
- [0323] 한 실시양태에서, 항원은 세포의 표면 상에 발현된다.
- [0324] 한 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포이다.
- [0325] 추가의 실시양태에서, 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFrvIII, IGF α , L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0326] 또다른 실시양태에서, 항원은 세포막과 회합된다.
- [0327] 또다른 실시양태에서, 항원은 비리온과 회합되고, 임의로 항원은 비리온의 단백질 코트 또는 지질 외피에 포함된다.
- [0328] 또다른 실시양태에서, 항체는 CD20 및 CD38로부터 선택되는 적어도 하나의 항원에 임의로 결합하는 인간 항체이다.
- [0329] 또다른 실시양태에서, 항체는 7D8 및 005 중의 적어도 하나와 동일한 에피토프에 결합하고, 임의로 7D8 및 005 중 적어도 하나의 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함한다.
- [0330] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 유도된 이펙터 반응은 보체 의존적 세포독성 (CDC), C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), Fc γ -결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아폴토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지로부터 선택되는 Fc-매개된 이펙터 반응, 및 이들의 임의의 조합이다.
- [0331] 특정 실시양태에서, 이펙터 반응은 C1q-결합, 보체 활성화 (C1q 효능), 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), Fc-수용체 결합, 예를 들어 Fc-감마 수용체 결합, Fc-함유 폴리펩티드 내재화 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0332] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 C1q-결합이다.
- [0333] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 보체 활성화 (C1q 효능)이다.
- [0334] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 보체 의존적 세포독성 (CDC)이다.
- [0335] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)이다.
- [0336] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 예를 들어 Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합이다.
- [0337] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 Fc-함유 폴리펩티드 내재화이다.
- [0338] 한 실시양태에서, 이펙터 반응은 보체 의존적 세포독성 (CDC) 및 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)의 조합이다.

- [0339] 또다른 실시양태에서, 방법은 FcRn-결합, ADCC, Fc-감마 수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 항체에 의해 매개된 옵소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 추가의 이펙터 기능을 증가시킨다.
- [0340] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 Fc-영역 내의 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키는 단계를 포함하는, C1q에 대한 모 항체 제제의 결합력을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0341] 본 발명이 작용할 수 있는 항원 또는 표적의 예는 다음과 같다: 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM 17; AFP; AXL; ANGPT2 탄저 항원; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; 암종 연관 항원 CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; 클라우딘4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; 크립토; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; 엔도텔린 B 수용체; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP 알파; Fc 감마 RI; FCER2; FGFR3; 피브린 II 베타 사슬; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; GD3 강글리오시드; GDF2; GLP1R; 글리피칸-3; GPNMB; HBV (B형 간염 바이러스); HCMV (인간 사이토메갈로바이러스); 열 충격 단백질 90 상동체 [칸디다 알비칸스]; 단순 포진 바이러스 gD 당단백질; HGF; HIV-1; HIV-1 IIIB gp120 V3 루프; HLA-DRB (HLA-DR 베타); 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 이중 특이적; IgE Fc; IGF1R; IGHE 연결 영역; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; 인터루킨-2 수용체 베타 서브유닛; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; 루이스-y; 지질 A, 지다당체 LPS의 도메인; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; NCA-90 과립구 세포 항원; 넥틴 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; 포스포티딜세린; PTK-7; 슈도모나스 애틀레노사 혈청형 IATS 011; RSV (인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; 시가-유사 독소 II B 서브유닛 [에스케리치아 콜라이]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; 스타필로코쿠스 에피데르미디스 리포테이코산; T 세포 수용체 알파 _베타; 조직 인자 (TF); TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; 및 비멘틴.
- [0342] 한 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포 또는 세균 세포이다.
- [0343] 또다른 실시양태에서, 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFRvIII, IGF1R, L1-CAM, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0344] 추가의 실시양태에서, 항원은 CD20 또는 CD38이다.
- [0345] 또다른 실시양태에서, IgG1 모 항체는 인간 IgG1 항체이다.
- [0346] 또다른 실시양태에서, 모 항체는 7D8 및 005로부터 선택된다.
- [0347] 한 실시양태에서, 세포는 인간 종양 세포이다.
- [0348] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFRvIII, IGF1R, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), EpCAM 및 MRP3으로부터 별개로 선택된다.
- [0349] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 완전 인간 항체이고, 임의로 제1 및 제2 모 항체는 CD20 및 CD38로부터 별개로 선택된 항원에 결합한다.
- [0350] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 7D8 및 005로부터 별개로 선택된다.
- [0351] 추가의 실시양태에서, 세포는 세균 세포이다.
- [0352] 또다른 실시양태에서, 세균 세포는 에스. 아우레우스, 에스. 에피데르미디스, 에스. 뉴모니아 (*S. pneumonia*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 슈도모나스 애틀레노사, 클라미디아 (*Chlamydia*), 이. 콜라이, 살모넬라 (*Salmonella*), 시겔라 (*Shigella*), 예르시니아 (*Yersinia*), 에스. 티피무리움 (*S. typhimurium*), 네이세리아 메닝기티데스 (*Neisseria meningitides*) 및 미코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium*

tuberculosis)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0353] 또다른 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항원은 리포테이코산 (LTA)이고, 임의로 제1 및 제2 항체 중의 적어도 하나는 파기박시맵이다.
- [0354] 또다른 실시양태에서, 항원은 비리온 상에 발현된다.
- [0355] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 동일한 항원에 결합한다.
- [0356] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 동일한 VH 서열, VL 서열, 또는 VH 및 VL 서열 둘 모두를 포함한다.
- [0357] 본 발명의 목적을 위해, 항원을 발현하거나 항원과 다른 방식으로 회합된 표적 세포는 임의의 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 예시적인 항원-발현 세포는 포유동물 세포, 특히 인간 세포, 예컨대 인간 암 세포; 및 단세포성 유기체, 예컨대 세균, 원생동물, 및 단세포성 진균, 예컨대 효모 세포를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 항원을 포함하거나 항원과 다른 방식으로 회합된 세포막은 항원-발현 세포로부터 유래한 부분적인 및/또는 파괴된 세포막을 포함한다. 비리온 또는 바이러스 입자와 회합된 항원은 비리온의 단백질 코트 및/또는 지질 외피에 포함되거나 다른 방식으로 회합될 수 있다.
- [0358] 표적 세포는 예를 들어 인간 종양 세포일 수 있다. 적합한 종양 항원은 본원에서 설명되는 임의의 표적 또는 항원, erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD25, CD32, CD37, CD38, CD74, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, EGFRvIII, IGFR, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), EpCAM 및 MRP3를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 바람직한 항원은 CD20, CD38, HER2, EGFR, IGFR, CD25, CD74 및 CD32를 포함한다. 예시적인 항체는 WO 2004/035607에 개시된 바와 같은 항-CD20 항체 7D8, WO 06/099875에 개시된 바와 같은 항-CD38 항체 005, WO 2004/035607에 개시된 바와 같은 항-CD20 항체 11B8, WO 06/099875에 개시된 바와 같은 항-CD38 항체 003, WO 02/100348에 개시된 바와 같은 항-EGFR 항체 2F8을 포함한다. 다른 특정 항체의 예를 본원에서 제공한다.
- [0359] 대안적으로, 표적 세포는 세균 세포, 예컨대, 예를 들어, 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 뉴모니아, 바실러스 안트라시스, 슈도모나스 에루기노사, 클라미디아, 이. 콜라이, 살모넬라, 시겔라, 예르시니아, 에스. 티피무리움, 네이세리아 메닝기티데스 및 미코박테리움 투베르쿨로시스일 수 있다. 예시적인 항원은 리포테이코산 (LTA)을 포함하고, 예시적인 항체는 파기박시맵을 포함한다.
- [0360] 대안적으로, 표적은 바이러스, 진균 세포 또는 다른 입자, 예컨대, 예를 들어, 웨스트 나일 바이러스, 뎅기 바이러스, C형 간염 바이러스 (HCV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 인간 유두종 바이러스, 엡스타입-바 (Epstein-Barr) 바이러스, 포진 바이러스, 수두 바이러스, 조류 인플루엔자 바이러스, RVS, 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 크립토크커스 (*Cryptococcus*), 및 히스토플라스마 (*Histoplasma*)의 표면 상에 존재할 수 있다.
- [0361] 한 실시양태에서, 접촉 단계 (ii)는 시험관 내에서 일어난다.
- [0362] 한 실시양태에서, 접촉 단계 (ii)는 생체 내에서 일어난다.
- [0363] 또다른 실시양태에서, 단계 (ii)는 대상체에게 변이체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0364] 추가의 실시양태에서, 대상체는 암, 세균 감염, 또는 바이러스 감염으로 고통받고 있다. 상기 언급된 실시양태의 접촉 단계 (ii)는 시험관 내에서 또는 생체 내에서 일어날 수 있다. 후자의 경우에, 단계 (ii)는 제제(들)을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 대상체는 임의로 암 또는 세균 감염으로 고통받고 있다. 치료 용도에 대한 추가의 상세한 내용을 아래에 제공한다.
- [0365] 제1 및 제2 항체는 동일하거나 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함한다. 상기 에피토프는 동일하거나 상이한 표적 상에 존재할 수 있다.
- [0366] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 상기 표적은 동일한 세포 또는 세포 종류 상에 발현될 수 있거나, 또는 상이한 세포 또는 세포 종류 상에 발현될 수 있다. 상기 실시양태에서, 이펙터 기능의 향상은 두 표적을 모두 발현하는 세포 또는 세포 종류에 대해서만 유도되어, 치료되는 질병의 원인이 아닌 세포 또는 세포 종류의 임의의 부수적인 손상 위험을 감소시킨다.
- [0367] 임의의 이론에 매이지 않지만, 제1 및 제2 항체가 동일한 세포 상에서 발견되는 에피토프에 결합한다면 CDC의 향상은 2개의 특이적 표적/항원을 동시에 발현하는 표적 세포로 제한될 수 있고, 따라서 향상된 CDC 유도의 선

택성을 개선하기 위해 표적의 조합된 발현을 이용하는 것으로 생각된다.

- [0368] 표적이 상이한 세포 또는 세포 종류 상에 발현되는 경에, 이론에 매이지 않지만, 제1 및 제2 항체의 임의의 순서의 투여는 CDC 향상 및 가능하게는 또한 제2 표적을 발현하는 제2 세포 또는 세포 종류의 "동원"에 의해 다른 이펙터 기능을 개선할 것으로 생각된다.
- [0369] 제1 및 제2 항체의 조합물이 사용되는 한 실시양태에서, 단계 (ii)는 세포를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 돌연변이된 제1 및 제2 항체와 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 접촉시킴으로써 수행될 수 있다.
- [0370] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 Fc-영역 내의 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키는 단계를 포함하는, 모 항체 제제의 CDC-유도능을 개선하는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0371] 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0372] (i) IgG1 중체의 Fc 영역 내의 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 항체를 제공하고;
- [0373] (ii) 항체의 제제를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포, 세포막, 또는 비리온과 접촉시키는 것
- [0374] 을 포함하는, IgG1 모 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 이펙터 반응, 임의로 CDC-반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0375] 또다른 대안적 실시양태에서, 방법은
- [0376] 제1 항체의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 제1 돌연변이를 포함하는 제1 항체를 투여하고;
- [0377] 제2 항체의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 제2 돌연변이를 포함하는 제2 항체를 투여하는 것
- [0378] 을 추가로 포함하고; 여기서 제1 및 제2 항체는 동시에, 따로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 제1 및 제2 항체는 동일하거나 상이한 표적 상의 동일하거나 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 표적(들)은 동일하거나 상이한 세포 또는 세포 종류 상에서 발견될 수 있다.
- [0379] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 Fc-영역 내의 E345, E382 및 H433으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키는 것을 포함하는, IgG1 모 항체 제제의 CDC-유도능을 개선하는 방법에 관한 것이다.
- [0380] 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0381] (i) 항체의 Fc-영역 내의 E345, E382 및 H433으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산에 돌연변이를 포함하는 모 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및
- [0382] (ii) 변이체의 제제를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계
- [0383] 를 포함하는, IgG1 모 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 이펙터 반응, 임의로 CDC-반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0384] 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0385] (i) 항체의 Fc-영역에 K439E 및 S440K 돌연변이를 포함하는 모 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및
- [0386] (ii) 변이체의 제제를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계
- [0387] 를 포함하는, IgG1 모 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 대해 이펙터 반응, 임의로 CDC-반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0388] 또다른 측면에서, 본 발명은
- [0389] (i) K439E 돌연변이를 포함하는 제1 모 항체의 제1 변이체 및 S440K 돌연변이를 포함하는 제2 모 항체의 제2 변

이체를 제공하는 단계; 및

- [0390] (ii) 세포를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 제1 및 제2 변이체와 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 접촉시키는 단계
- [0391] 를 포함하는, 제1 IgG1 모 항체가 결합하는 제1 항원 및 제2 모 항체가 결합하는 제2 항원을 발현하는 세포, 세포막, 또는 비리온에 대해 CDC-반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0392] 또다른 측면에서, 본 발명은 (i) IgG1 항체의 Fc-영역 내의 E345, E430 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산에 돌연변이를 포함하는 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 변이체의 제제를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, IgG1 또는 IgG3 항체가 결합하는 항원과 회합하는 표적 세포, 세포막, 비리온 또는 다른 입자에 대해 CDC- 또는 다른 이펙터 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0393] 또다른 추가의 측면에서, 본 발명은 (i) IgG1 항체의 Fc-영역 내의 E345, E430 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산에 돌연변이를 포함하는 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 변이체 제제를 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, IgG1 또는 IgG3 항체가 결합하는 항원과 회합하는 표적 세포, 세포막, 비리온 또는 다른 입자에 대해 ADCC 또는 ADCP를 유도하거나 이들의 포식작용을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0394] 본 발명은 또한 (i) 항체의 Fc-영역 내의 K439E인 K439의 돌연변이 및 S440K 또는 S440R인 S440에서의 돌연변이를 포함하는 항체의 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 변이체의 제제를 인간 보체 및/또는 이펙터 세포의 존재 하에 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, IgG1 또는 IgG3 항체가 결합하는 항원과 회합하는 표적 세포, 세포막, 비리온 또는 다른 입자에 대해 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0395] 본 발명은 또한 (i) K439E 돌연변이를 포함하는 제1 항체인 제1 변이체 및 S440K 또는 S440R 돌연변이를 포함하는 제2 항체인 제2 변이체를 제공하는 단계; 및 (ii) 세포를 인간 보체 또는 이펙터 세포의 존재 하에 제1 및 제2 변이체의 제제와 동시에, 따로 또는 순차적으로 접촉시키는 단계를 포함하는, 제1 IgG1 항체가 결합하는 제1 항원 및 제2 항체가 결합하는 제2 항원을 발현하는 표적 세포, 세포막 또는 비리온에 대해 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0396] 별개의 구체적인 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 (i) 상이한 항원; (ii) 동일한 항원 상의 상이한 에피토프, (iii) 항원 상의 동일한 에피토프, 및 (iv) 항원 상의 동일한 에피토프에 결합하고, 동일한 VH 및/또는 VL 서열을 포함한다.
- [0397] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 하나 이상의 E345, E430 및 S440 내의 돌연변이, 예컨대 E345R을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체는 하나 이상의 E345, E382 및 H433 내의 돌연변이, 예컨대 E345R을 추가로 포함한다.
- [0398] 다른 방법
- [0399] 또다른 주요 측면에서, 본 발명은 C1q에 결합하는 항체의 이펙터 기능을 향상시키는 항체 내의 돌연변이를 확인하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은
- [0400] (i) E345, E430, S440, K439, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산에 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 항체를 제공하는 단계;
- [0401] (ii) 모 항체에 비해 항원-발현 세포의 표면에 결합될 때 항체의 C1q-활성을 평가하는 단계; 및
- [0402] (iii) 증가된 C1q-결합력을 갖는 임의의 변이체의 돌연변이를 선택하는 단계
- [0403] 를 포함한다.
- [0404] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 항체는 E345R, E345Q, E345N, E345K, E345Y, E430T, E430S, E430G, E430F, E430H, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0405] 또다른 주요 측면에서, 본 발명은 CDC-반응을 유도하는 항체의 능력을 증가시키는 모 항체 내의 돌연변이를 확인하는 방법에 관한 것이고, 이 방법은
- [0406] (i) E345, E430, S440, K439, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Q386, Y436, 및 K447로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산에 돌연변이를 포함하는 적어도 하나의 모 항체의 변이체를 제조하

는 단계;

[0407] (ii) 모 항체에 비해 이펙터 세포 또는 보체의 존재 하에 항원-발현 세포의 표면에 결합할 때 변이체에 의해 유도된 CDC-반응을 평가하는 단계; 및

[0408] (iii) 증가된 CDC-반응을 갖는 임의의 변이체의 돌연변이를 선택하는 단계

[0409] 를 포함한다.

[0410] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산은 E345, E382 및 H433으로부터 선택된다.

[0411] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 항체는 E345R, E345Q, E345N, E345K, E345Y, E430T, E430S, E430G, E430F, E430H, S440W 및 S440Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0412] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 Fc-영역 내의 적어도 하나의 아미노산을 돌연변이시키는 것을 포함하는, C1q에 대한 IgG1 모 항체의 결합력을 증가시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 적어도 하나의 아미노산은 E345, E382 및 H433으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0413] 본 발명의 항체

[0414] 모 항체

[0415] 본원에서 설명되는 바와 같이, 본 발명은 특히 이뮤노글로불린의 CH2 및/또는 CH3 영역, 예를 들어 항체 중쇄에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 모 항체의 변이체에 관한 것이다. 변형 전의 본 발명의 출발 물질로서 사용되는 야생형 항체일 수 있는 "모" 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624 628 (1991) 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 597 (1991)]에 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항체는 관심있는 항원, 예를 들어 표면에 항원을 발현하는 세포, 또는 관심있는 항원을 코딩하는 핵산의 형태로 면역화된 마우스로부터 얻은 뮤린 비장 B 세포로부터 제조된 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 토끼, 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 얻을 수 있다.

[0416] 모 항체는 예를 들어, 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조말 마우스, 예를 들어, HuMAb 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. HuMAb 마우스는 내인성 μ 및 κ 사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 비재배열된 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니로커스 (minilocus)를 보유한다 (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856 859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 보이고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입유전자는 고친화도 인간 IgG, κ 모노클로날 항체를 생성하기 위해 부류 전환 및 체세포 돌연변이를 겪는다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌]; [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49 101 (1994)], [Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65 93 (1995)] 및 [Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536 546 (1995)]). HuMAb 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287 6295 (1992)], [Chen, J. et al., International Immunology 5, 647 656 (1993)], [Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912 2920 (1994)], [Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579 591 (1994)], [Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845 851 (1996)]에 상세히 설명되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187 참조. 이들 트랜스제닉 마우스로부터의 비장세포는 공지된 기술에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0417] 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 본 발명의 항체는 비제한적으로, 파지 디스플레이, 레트로 바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 포유동물 디스플레이, 효모 디스플레이 및 당업계에 공지된 다른 기술을 포함하는 디스플레이-타입 기술을 통해 확인될 수 있고, 생성되는 분자는 추가의 성숙, 예컨대 친화도 성숙에 적용될 수 있고, 그러한 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다. 실시예 17에 설명된 특정 전략은 파지-디스

플레이를 사용하여 본 발명의 변이체를 제조하고 얻기 위해 임의의 항체에 적용될 수 있다.

[0418] 모 항체는 천연, 예를 들어, 인간 Fc 도메인을 갖는 항체로 제한되지 않고, 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이, 예를 들어 글리코실화에 영향을 주거나 또는 항체가 이중특이적 항체가 되도록 할 수 있는 돌연변이를 포함하지 않는 임의의 항체를 의미한다. 천연적으로 발생한 변형, 예를 들어, 상이한 동종이형을 포함하는 항체는 따라서 본 발명의 의미에서 "천연 항체"로서 이해되어야 하고, 모 항체로서 이해될 수 있다. 상기 항체는 본 발명에 따른 하나 이상의 돌연변이에 대한 주형 (template)으로서 기능할 수 있고, 따라서 본 발명의 변이체 항체를 제공한다. 본 발명의 돌연변이 이외의 다른 돌연변이를 포함하는 모 항체의 예는 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 2개의 항체의 1/2-분자 교환을 촉진하고, 따라서, 응집체의 형성을 수반하지 않으면서 이중특이적 항체를 형성하는 환원 조건을 이용하는, WO2011/131746 (젠맵)에 설명된 바와 같은 이중특이적 항체이다. 모 항체의 다른 예는 이중특이적 항체, 예컨대 이중이량체 이중특이적 항체: 트리오맵 (Fresenius); 이중특이적 IgG1 및 IgG2 (리나트 뉴로싸이언시스 코퍼레이션); Fc Δ Adp (리제네론); 노브-인트루-홀 (제넨테크); 정전기적 유도 (암젠, 추가이, 온코메드); 씨드바디 (머크); 아지메트릭 스캐폴드 (자임웁스); mAb-Fv (젠코르); 및 LUZ-Y (제넨테크)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 예시적인 모 항체 형식은 비제한적으로, 야생형 항체, 전장 항체 또는 Fc-함유 항체 단편, 인간 항체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0419] 모 항체는 임의의 표적에 결합할 수 있고, 본 발명이 작용할 수 있는 표적 또는 항원의 예는 다음과 같고, 이로 제한되지 않는다: 5T4; ADAM-10; ADAM-12; ADAM 17; AFP; AXL; ANGPT2 탄저 항원; BSG; CAIX; CAXII; CA 72-4; 암종 연관 항원 CTAA16.88; CCL11; CCL2; CCR4; CCR5; CCR6; CD2; CD3E; CD4; CD5; CD6; CD15; CD18; CD19; CD20; CD22; CD24; CD25; CD29; CD30; CD32B; CD33; CD37; CD38; CD40; CD40LG; CD44; CD47; CD52; CD56; CD66E; CD72; CD74; CD79a; CD79b; CD80; CD86; CD98; CD137; CD147; CD138; CD168; CD200; CD248; CD254; CD257; CDH3; CEA; CEACAM5; CEACAM6; CEACAM8; 클라우딘4; CS-1; CSF2RA; CSPG-4; CTLA4; 크립토; DLL4; ED-B; EFNA2; EGFR; 엔도텔린 B 수용체; ENPP3; EPCAM; ERBB2; ERBB3; FAP 알파; Fc 감마 RI; FCER2; FGFR3; 피브리린 II 베타 사슬; FLT1; FOLH1; FOLR1; FRP-1; GD3 강글리오시드; GDF2; GLP1R; 글리코판-3; GPNMB; HBV (B형 간염 바이러스); HCMV (인간 사이토메갈로바이러스); 열 충격 단백질 90 상동체 [칸다다 알비칸스]; 단순 포진 바이러스 gD 당단백질; HGF; HIV-1; HIV-1 IIIB gp120 V3 루프; HLA-DRB (HLA-DR 베타); 인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F; ICAM1; IFNA1; IFNA1; IFNB1 이중특이적; IgE Fc; IGF1R; IGHE 연결 영역; IL12B; IL13; IL15; IL17A; IL1A; IL1B; IL2RA; IL4; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL9; 인터루킨-2 수용체 베타 서브유닛; ITGA2; ITGA2B ITGB3; ITGA4 ITGB7; ITGA5; ITGAL; ITGAV_ITGB3; ITGB2; KDR; L1CAM; 루이스-y; 지질 A, 지단 당체 LPS의 도메인; LTA; MET; MMP14; MMP15; MST1R; MSTN; MUC1; MUC4; MUC16; MUC5AC; NCA-90 과립구 세포 항원; 넥틴 4; NGF; NRP; NY-ESO-1; OX40L; PLAC-1; PLGF; PDGFRA; PD1; PDL1; PSCA; 포스포타일세린; PTK-7; 슈도모나스 애틀기노사 혈청형 IATS 011; RSV (인간 호흡기 세포융합 바이러스, 당단백질 F); ROR1; RTN4; SELL; SELP; STEAP1; 시가-유사 독소 II B 서브유닛 [에스케리치아 콜라이]; SLAMF7; SLC44A4; SOST; 스타필로코쿠스 에피테르미디스 리포테이코산; T 세포 수용체 알파-베타; TF; TGFB1; TGFB2; TMEFF2; TNC; TNF; TNFRSF10A; TNFRSF10B; TNFRSF12A; TNFSF13; TNFSF14; TNFSF2; TNFSF7; TRAILR2; TROP2; TYRP1; VAP-1; 및 비멘틴.

[0420] 모 항체는 임의의 이소형의 임의의 인간 항체, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, 및 IgD, 임의로 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체일 수 있다. 모 항체는 임의의 서열 1, 2, 3, 4, 및 5에 따른 서열을 포함할 수 있다.

[0421] 본 발명에서 사용하기 위한 모노클로날 항체, 예컨대 모 항체 및/또는 변이체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생산될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]에 설명된 기술을 사용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항체는 관심있는 항원, 예를 들어 표면에 항원을 발현하는 세포, 또는 관심있는 항원을 코딩하는 핵산의 형태로 면역화된 마우스로부터 얻은 클론 B 세포로부터 제조된 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화된 인간 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 래트, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 얻을 수 있다.

[0422] 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 임의의 항원에 대해 작용하는 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계 보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조말 마우스를 사용하여 생성될 수 있다.

그러한 트랜스제닉 및 트랜스크로모조말 마우스는 본원에서 각각 HuMAb[®] 마우스 및 KM 마우스로 언급되는 마우스를 포함하고, 본원에서 "트랜스제닉 마우스"로서 집합적으로 언급된다.

[0423] HuMAb[®] 마우스는 내인성 μ 및 κ 사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께 비재배열된 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자 미니로커스를 보유한다 (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 보이고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입유전자는 고친화도 인간 IgG, κ 모노클로날 항체를 생성하기 위해 부류 전환 및 체세포 돌연변이를 겪는다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌]; [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)], [Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)] 및 [Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)]). HuMAb[®] 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)], [Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)], [Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)], [Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)], [Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 상세히 설명되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187 참조.

[0424] HCo7, HCo12, HCo17 및 HCo20 마우스는 그의 내인성 경쇄 (카파) 유전자의 JKD 파괴 ([Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)]에 설명된 바와 같이), 그의 내인성 중쇄 유전자의 CMD 파괴 (WO 01/14424의 실시예 1에 설명된 바와 같이), 및 KCo5 인간 카파 경쇄 도입유전자 ([Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 설명된 바와 같이)를 갖는다. 추가로, HCo7 마우스는 HCo7 인간 중쇄 도입유전자를 갖고 (US 5,770,429에 설명된 바와 같이), HCo12 마우스는 HCo12 인간 중쇄 도입유전자를 갖고 (WO 01/14424의 실시예 2에 설명된 바와 같이), HCo17 마우스는 HCo17 인간 중쇄 도입유전자를 갖고 (WO 01/09187의 실시예 2에 설명된 바와 같이), HCo20 마우스는 HCo20 인간 중쇄 도입유전자를 갖는다. 생성되는 마우스는 내인성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 로커스의 파괴에 동형접합성인 배경에서 인간 이뮤노글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 도입유전자를 발현한다.

[0425] KM 마우스 종에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 설명된 바와 같이 동형접합 방식으로 파괴되었고, 내인성 마우스 중쇄 유전자는 WO 01/09187의 실시예 1에 설명된 바와 같이 동형접합 방식으로 파괴되었다. 상기 마우스 종은 문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 설명된 바와 같이 인간 카파 경쇄 도입유전자인 KCo5를 보유한다. 상기 마우스 종은 또한 WO 02/43478에 설명된 바와 같이 염색체 14 단편 hCF (SC20)로 이루어진 인간 중쇄 트랜스염색체 (transchromosome)를 보유한다. HCo12-Balb/C 마우스는 WO/2009/097006에 설명된 바와 같이 HCo12를 KCo5[J/K](Balb)에 교배시킴으로써 생성할 수 있다. 이들 트랜스제닉 마우스로부터의 비장세포는 공지된 기술에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0426] 또한, 임의의 항원-결합 영역은 비제한적으로, 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 당업계에 공지된 다른 기술을 포함하는 디스플레이-타입 기술을 통해 확인된 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 항체로부터 얻을 수 있고, 생성되는 분자는 추가의 성숙, 예컨대 친화도 성숙에 적용될 수 있고, 그러한 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991)] (파지 디스플레이), [Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996)] (파지 디스플레이), [Hanes and Pluthau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997)] (리보솜 디스플레이), [Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988)] (파지 디스플레이), [Scott TIBS 17, 241-245 (1992)], [Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)], [Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993)], [Hogenboom et al., Immun J. Reviews 130, 43-68 (1992)], [Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)], 및 US 5,733,743 참조). 디스플레이 기술이 인간 항체가 아닌 항체를 생산하기 위해 이용될 경우, 상기 항체는 인간화될 수 있다.

[0427] 또다른 측면에서, 본 발명은 Fc 도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 측면에서, 모 항체에 관한 모든 실시양태는 "모 폴리펩티드"에 유사하게 적용됨이 이해된다.

[0428] 본 발명에 따른 돌연변이는 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 상기 아미노산 치환은 임의의 천연 생성 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다.

[0429] "단일-돌연변이체"

[0430] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.

[0431] 본 발명의 "단일-돌연변이체" 측면에 따른 항체 또는 폴리펩티드 변이체는 IgG2, IgG3, 및 IgG4 모 항체 내의 대응하는 위치의 아미노산 및 "예시적인" 및 "바람직한" 아미노산 치환과 함께 인간 IgG1 항체의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 각각의 아미노산 잔기를 열거한 표 1에 제시된 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이, 일반적으로 아미노산 치환을 포함한다. IgG1의 잔기 P247 내지 K447에 대응하는 IgG2 분절, 잔기 P247 내지 K447에 대응하는 IgG3 Fc-분절 및 잔기 P247 내지 K447에 대응하는 IgG4 분절은 도 2에 제시된다.

표 1

"단일-돌연변이체" 측면에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

아미노산 (IgG1)	아미노산 (IgG2)	아미노산 (IgG3)	아미노산 (IgG4)	예시적인 치환	바람직한 치환
P247	P247	P247	P247	ACDFGHIKLMNRSTVW	G
I253	I253	I253	I253	ADKLMNRSV, 대안적으로 EQT	LV, 대안적으로 QN
S254	S254	S254	S254	EFGHIKLPVW	L
H310	H310	H310	H310	AGFKLPRTVW, 대안적으로 NQY	PW, 대안적으로 Q
Q311	Q311	Q311	Q311	ACEGHFIKLNPRSTWY	LW, 대안적으로 ER
E345	E345	E345	E345	ACDGHFIKLMNPQRSTVWY	ADGHFIKLMNPQRSTVWY
D356/E356	E356	E356	E356	GILRTV	R
T359	T359	T359	T359	GNPR	R
E382	E382	E382	E382	FKLMPVW, 대안적으로 DHNQSTY	LV, 대안적으로 DQKR
G385	G385	G385	G385	ADHILNPQRSTV, 대안적으로 EKWY	NR, 대안적으로 DEKR
Q386	Q386	Q386	Q386	ACDEGHFIKLNPRSTVWY	K
E430	E430	E430	E430	ACDFGHIKLMNPQRSTVWY	ADGHFIKLMNPQRSTVWY
H433	H433	H433	H433	R	R
N434	N434	N434	N434	DEGKRVS, 대안적으로 HQT	W, 대안적으로 QHQR
Y436	Y436	F436	Y436	IKLRSTVW, 대안적으로 AEFHMQ	IV, 대안적으로 NQST
Q438	Q438	Q438	Q438	CEIKLSTVWY, 대안적으로 AGHNQR	CL, 대안적으로 NST
K439	K439	K439	K439	ADEHLPRTY, 대안적으로 QW	DEHR, 대안적으로 Q
S440	S440	S440	S440	ACDEGHFIKLMNPQRTVWY	WY, 대안적으로 DEQ
K447	K447	K447	K447	DENQ, 결실	DENQ, 결실

[0432]

[0433] 표 1에 제시된 바와 같이, 실시예 19에서 빈133 세포의 세포 용해의 증가를 일으킨 아미노산 치환이 "바람직한 치환"으로서 포함된다.

[0434] 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.

[0435] 한 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 변이체 항체일 수 있다.

[0436] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명은 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 모 항체의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다. 대안적으로, 아미노산 잔기는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 H310, G385, H433, N434, Q438, 및 K439에 대응하는 잔기로부터 선택된다.

[0437] 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기는 상기한 바와 같이 다음에 따라 분류될 수 있다:

[0438] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,

[0439] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,

[0440] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,

- [0441] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0442] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기.
- [0443] 본 발명에 따른 돌연변이는 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입 또는 치환일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 그러한 아미노산의 치환은 임의의 천연 생성 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 것일 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 결실이다. 또다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 삽입이다. 또다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 치환이다.
- [0444] 한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, Q386K, P247G, I253V, S254L, Q311L/W, D/E356R, E382V, Y436I, 및 K447D/E/결실에 대응하는 돌연변이로부터 선택되고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이다.
- [0445] 하나의 특정 한 실시양태에서, 항체 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, 및 Q386으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0446] 추가의 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이다.
- [0447] 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R,Q,N,K,A,C,D,F,G,H,I,L,M,P,S,T,V,W,Y; E430T,S,G,A,C,D,F,H,I,L,K,M,N,P,Q,R,V,W,Y; S440W,Y, 및 Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이다.
- [0448] 추가의 바람직한 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R/Q/N/K, E430T/S/G, S440Y/W, 및 Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이다.
- [0449] 대안적으로, 적어도 하나의 아미노산 잔기는 E382 및 H433으로부터 선택된다. 추가로, 대안적으로, 아미노산 치환은 E345Y,D,W; 및 E430F,H를 포함한다. 대안적으로, E382D,Q,K,R; 및 H433R.
- [0450] 하나의 특정한 실시양태에서, 아미노산 치환은 E345R이다. 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 I253(E, N, Q, S 또는 T); H310(N, Q, W 또는 Y); Q311(E 또는 R); E382(D, H, K, R, N, Q, S, T, W 또는 Y); G385(E, H, K, N, Q, R, S, T, W 또는 Y); H433R; N434(D, E, H, K, Q, R, S, T, W 또는 Y); Y436(A, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T 또는 V); Q438(A, E, G, H, K, N, Q, R, S, T, W 또는 Y); K439(D, H, Q, R, W 또는 Y); 및 S440(D, E, H, F, N, Q, W 또는 Y)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0451] 또다른 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 I253(N 또는 Q); H310Q; Q311(E 또는 R); E382(D, Q, K, 또는 R); G385(D, E, K 또는 R); H433R; N434(H, K, Q 또는 R); Y436(N, Q, S 또는 T); Q438(N, S 또는 T); K439Q; 및 S440(D, E 또는 Q)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0452] 또다른 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 E382(D, Q, K, 또는 R); 및 H433R로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0453] 한 실시양태에서, 변이체는 E382R 돌연변이를 포함한다.
- [0454] 한 실시양태에서, 변이체는 H433R 돌연변이를 포함한다.
- [0455] 실시예에 제시되는 바와 같이, 이들 아미노산 치환 중의 하나를 포함하는 CD38 항체 HuMab-005 및 -003 및/또는 CD20 항체 HuMab-7D8 및 -11B8 및 리툭시맙 및/또는 EGFR 항체 HuMab-2F8의 변이체는 각각 야생형 HuMab 005 및 7D8보다 더 높은 C1q-결합, 보체 활성화 및/또는 CDC를 보였다.
- [0456] 변이체가 표 1에 열거된 "예시적인 치환"의 단지 하나의 돌연변이만을 포함할 수 있음도 이해되어야 한다. 또한, 변이체는 1개 초과와 돌연변이, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6개의 표 1에 열거된 임의의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0457] 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태는 상기 측면에서 열거된 것으로부터 선택되는 아미노산 잔기의 하나의 돌연변이를 포함하는 변이체를 제공한다. 특정 아미노산 돌연변이는 P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D,

E430F, E430G, E430H, E430I, E430K, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환될 수 있다. 이들은 실시예 19, 표 17에 제시된 바와 같이 증가된 세포 용해 (빈133 세포에 대한 >39%)를 보인다.

- [0458] 대안적 실시양태에서, 변이체는 E382R, H433R, H435R, 및 H435A에 대응하는 돌연변이로부터 선택되는 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0459] 지시된 돌연변이 외에, 변이체는 모 항체에 대해 설명된 임의의 특징을 가질 수 있다. 특히, 변이체는 인간 항체일 수 있다. 변이체는 추가로 상기 돌연변이 이외에, 임의의 IgG1 아형의 변이체일 수 있다.
- [0460] 항원-발현 세포의 표면, 세포막, 비리온 또는 또다른 입자 상의 그의 항원에 결합하거나, 또는 항원이 비리온과 회합할 때 (여기서, 임의로, 항원은 비리온의 단백질 코트 또는 지질 외피임), 상기 항체 변이체는 모 항체에 비해 증가된 (i) C1q-결합, (ii) 항체에 의해 매개된 보체 활성화, (iii) 항체에 의해 매개된 CDC, (iv) 올리고머 형성, (v) 올리고머 안정성, 또는 임의의 (i) 내지 (v)의 조합 중의 적어도 하나를 가질 수 있다. (iv) 또는 (v)의 한 실시양태에서, 올리고머는 육량체이다. 한 실시양태에서, 변이체는 또한 또는 대안적으로 유지된 또는 개선된 다른 이펙터 기능, 예컨대 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옵소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조절, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합을 갖는다.
- [0461] 임의의 특정한 이론에 제한되지 않으면서, 지시된 위치의 아미노산을 표 1의 아미노산 잔기로 치환함으로써 발생하는 효과는 예를 들어 효과 그 자체를 야기하거나, 또다른 분자의 Fc 도메인에 직접 접촉할 때 관련되거나, 또는 또다른 Fc 도메인과 직접 상호작용하거나 또는 분자간 Fc:Fc 상호작용에 간접적으로 영향을 주기 위해 돌연변이될 수 있다. 따라서, 이론에 매이지 않으면서, 치환은 올리고머 형태의 항체 분자 사이의 결합 강도를 직접 또는 간접적으로 향상시켜, 올리고머 구조, 예컨대 육량체, 오량체, 사량체, 삼량체, 또는 이량체 구조의 안정성을 향상시키는 것으로 생각된다. 예를 들어, 아미노산 치환은 새로운 분자간 Fc:Fc 결합의 형성, 비제한적인 예를 들어 반 데르 발스 (Van der Waals) 상호작용, 수소 결합, 전하-전하 상호작용, 또는 방향족 적층 (stacking) 상호작용을 촉진하거나 강화시키는 것, 또는 물 분자의 방출에 의해 Fc:Fc 상호작용시에 증가된 엔트로피를 촉진하는 것일 수 있다. 표 1을 참고로 하면, "예시적인 치환"은 분자간 Fc:Fc 상호작용 또는 분자내 상호작용 (알로스테릭 돌연변이)에 참여하거나 이를 촉진하는 크기 및 물리화학적 특성을 기초로 하여 선택될 수 있다. "바람직한 치환"은 분자간 Fc:Fc 상호작용 또는 분자내 상호작용 (알로스테릭 돌연변이)에 참여하거나 자극하기에 최적의 크기 및 물리화학적 특성을 기초로 하여 선택될 수 있다.
- [0462] 표 1에 열거된 아미노산의 "예시적인 치환"은 E 잔기의 R 잔기로의 교환, 및 H 잔기의 R 잔기로의 교환을 포함한다. 표 1에 열거된 각각의 특이적 아미노산 잔기에서 아미노산의 각각의 "예시적인 치환"은 본 발명에 따른 별개의 구체적인 비-제한적인 실시양태이다. 또한, 표 1에 열거된 각각의 특이적 아미노산 잔기의 각각의 "바람직한 치환"은 본 발명에 따른 별개의 구체적인 비-제한적인 실시양태이다.
- [0463] 또다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는
- [0464] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0465] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0466] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0467] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0468] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0469] 의 군으로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 아미노산 돌연변이는 상이하다.
- [0470] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드 및 또한 그의 변이체는 항체일 수 있다.
- [0471] 따라서, 본 발명은 또한 항원-결합 영역 및 Fc-도메인을 포함하는 모 항체의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변

이체는

- [0472] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0473] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0474] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0475] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0476] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0477] 의 군으로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 아미노산 돌연변이는 상이하다.
- [0478] 따라서, 상기 실시양태의 변이체는 표 1 내의 적어도 2개, 예컨대 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 아미노산에 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0479] 상기 적어도 2개의 아미노산의 돌연변이가 변이체에 포함되는 임의의 실시양태에서, 돌연변이는 변이체의 각각의 중쇄에 존재할 수 있거나, 또는 둘 중 하나는 중쇄의 하나에 포함될 수 있고, 다른 하나는 다른 중쇄에 포함될 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다.
- [0480] 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다. 대안적으로, 변이체는 H310, G385, H433, N434, Q438, 및 K439로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 잔기에 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0481] 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, Q386K, P247G, I253V, S254L, Q311L/W, D/E356R, E382V, 및 Y436I에 대응하는 돌연변이로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이다.
- [0482] 예를 들어, 항체 변이체는 E345, E430, S440, 및 Q386, 대안적으로 E382 및 H433 중의 적어도 하나, 예컨대 E345, E430, S440, 및 Q386, 대안적으로 E382 및 H433 중의 2개 또는 전부에 돌연변이를 포함할 수 있고, 임의로 표 1에 열거된 하나 이상의 다른 아미노산의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 추가의 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, 및 Q386K의 돌연변이에 대응하는 군으로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이다.
- [0483] 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이의 예시적인 조합은 E345X/E430X, E345X/S440Y 또는 W, E345X/Q386K, E430X/S440Y 또는 W, 및 E430X/Q386K이다.
- [0484] 한 실시양태에서, 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 상기 아미노산의 치환은 임의의 천연 생성 또는 인공 아미노산에 의한 치환일 수 있다.
- [0485] 특정 실시양태에서, 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 다음으로 이루어진 군에 대응하는 아미노산 치환일 수 있다: P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430K, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W.
- [0486] 바람직한 실시양태에서, 변이체는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 아미노산 치환은 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R,Q,N,K,A,C,D,F,G,H,I,L,M,P,S,T,V,W,Y; E430T,S,G,A,C,D,F,H,I,L,K,M,N,P,Q,R,V,W,Y; S440W,Y; 및 Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이다.
- [0487] 대안적으로, 추가의 돌연변이는 I253E,N,Q,S,T; H310N,Q,W,Y; Q311E,R; E382D,H,K,R,N,Q,S,T,W,Y; G385E,H,K,N,Q,R,S,T,W,Y; H433R; N434D,E,H,K,Q,R,S,T,W,Y; Y436,A,E,F,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V; Q438A,E,G,H,K,N,Q,R,S,T,W,Y; K439D,H,Q,R,W,Y; 및 S440D,E,H,F,N,Q에 대응하는 돌연변이로부터 선택된다.
- [0488] 바람직한 실시양태에서, 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의

E345R/Q/N/K, E430T/S/G, S440Y/W, 및 Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이다. 대안적으로, 추가의 돌연변이는 I253N,Q; H310Q; Q311E,R; E382D,Q,K,R; G385D,E,K,R; H433R; N434H,K,Q,R; Y436N,Q,S,T; Q438N,S,T; K439Q; 및 S440D,E,Q에 대응하는 돌연변이로부터 선택된다.

- [0489] 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이의 예시적인 구체적인 조합은 E345R/E430T, E345R/S440Y, E345R/S440W, E345R/Q386K, E345R/E430G, E345Q/E430T, E345Q/S440Y, E345Q/S440W, E430T/S440Y, E430T/S440W, E430T/Q386K, 및 S440Y/Q386K이다.
- [0490] 하나의 특정한 실시양태에서, 돌연변이는 I253, N434, 또는 Q311에 대응하는 아미노산 잔기에 존재하지 않는다. 하나의 추가의 또는 대안적 실시양태에서, 돌연변이는 H433에 존재하지 않거나, 또는 아미노산 치환은 H433A가 아니다.
- [0491] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0492] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0493] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0494] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0495] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이를 포함하지 않음, 및
- [0496] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0497] 의 군으로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하는 변이체에 관한 것이고, 여기서 적어도 3개의 아미노산 돌연변이는 상이하다.
- [0498] 한 특정 실시양태에서, 변이체는 변이체의 중쇄 중의 하나 또는 둘 모두에 존재할 수 있는, E345R, Q396K 및 E430G에 대응하는 아미노산 치환인 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함한다.
- [0499] 적어도 3개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 표 1에 열거된 치환으로부터 개별적으로 선택될 수 있다. 적어도 3개의 돌연변이를 포함하는 변이체의 비-제한적인 예는 다음과 같다: E345R/E430G/S440Y, E345R/E430G/S440W, E345K/E430G/S440Y, E345K/E430G/S440W, E345Q/E430G/S440Y, E345Q/E430G/S440W, E345N/E430G/S440Y, E345N/E430G/S440W, E345R/E430T/S440Y, E345R/E430T/S440W, E345K/E430T/S440Y, E345K/E430T/S440W, E345Q/E430T/S440Y, E345Q/E430T/S440W, E345N/E430T/S440Y, E345N/E430T/S440W, E345R/E430S/S440Y, E345R/E430S/S440W, E345K/E430S/S440Y, E345K/E430S/S440W, E345Q/E430S/S440Y, E345Q/E430S/S440W, E345N/E430S/S440Y, E345N/E430S/S440W, E345R/E430F/S440Y, E345R/E430F/S440W, E345K/E430F/S440Y, E345K/E430F/S440W, E345Q/E430F/S440Y, E345Q/E430F/S440W, E345N/E430F/S440Y, 및 E345N/E430F/S440W.
- [0500] 표 1 또는 2A 및 B 내의 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 이외에, IgG 중쇄는 당업계에 공지된 추가의 돌연변이, 예를 들어, 이펙터 기능을 추가로 개선하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 추가의 돌연변이는 CDC, Fc-감마 수용체 결합 또는 FcRn-결합을 향상시키는 및/또는 Fc-감마 수용체-매개된 이펙터 기능을 개선하는 공지의 돌연변이를 포함한다.
- [0501] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 공지의 CDC 향상 변형, 예를 들어 키메릭 IgG 분자의 생성을 위한 IgG 이소형 사이의 분절 교환 (Natsume et al., 2008 Cancer Res 68(10), 3863-72); 힌지 영역 (Daill'Acqua et al., 2006 J Immunol 177, 1129-1138) 내의 하나 이상의 아미노산 치환 또는 잔기 D270, K322, P329, 및 P331를 중심으로 이루어진 CH2 도메인 내의 C1q-결합 부위 내 또는 근처의 아미노산 치환을 추가로 포함한다 ([Idusogie et al., 2001 J Immunol 166, 2571-2575]; [Michaelsen et al., 2009 Scand J Immunol 70, 553-564] 및 WO 99/51642). 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 CDC 또는 ADCC를 통한 향상된 이펙터 기능을 제공하는, 아미노산 치환 S267E, H268F, S324T, S239D, G236A 및 I332E의 임의의 조합을 추가로 포함한다 [Moore et al. 2010 mAbs 2(2), 181-189]. Fc-수용체에 대한 결합 (WO 2006/105062, WO 00/42072, 미국 특허 6,737,056 및 미국 특허 7,083,784) 또는 항체의 물리적 특성 (WO 2007/005612 A1)에 영향을 주는 다른 Fc 돌연변이도 본 발명의 변이체에 사용될 수 있다.
- [0502] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 Fc-감마 수용체 결합 및/또는 Fc-감마 수용체-매개된 이펙터 기능을 향상시키는 변형을 추가로 포함한다. 상기 변형은 (i) CH2 부착 글리코실화에서 푸코스의 양의 감소 (당-조작)

([Umana P, et al., Nat Biotechnol 1999; 17: 176-80]; [Niwa R, et al., Clin Cancer Res 2004; 10: 6248-55]), 및 (ii) 항체의 힌지 또는 CH2 영역에서 아미노산의 부위-지정 돌연변이 유발 (단백질-조작) (Lazar GA, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 4005-10)을 포함한다.

[0503] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체는 예를 들어 IgG 항체의 반감기 ($t_{1/2}$)를 연장하기 위해서 FcRn 결합 부위에서 추가로 조작된다. 상기 변형은 (i) N434A 및 T307A/E380A/N434A 돌연변이 (Petcova et al. Int Immunol. 2006 Dec; 18(12): 1759); (ii) FcRn 결합을 개선하는 하나 이상의 Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382, 및 Asn434의 알라닌 잔기로의 치환 (Shields RL, et al. J. Biol. Chem. 2001; 276: 6591); 및 (iii) FcRn에 대한 친화도를 증가시키는 IgG1 내의 M252Y/S254T/T256E, M252W, M252Y, M252Y/T256Q, M252F/T256D, V308T/L309P/Q311S, G385D/Q386P/N389S, G385R/Q386T/P387R/N389P, H433K/N434F/Y436H, N434F/Y436H, H433R/N434Y/Y436H, M252Y/S254T/T256E-H433K/N434F/Y436H 또는 M252Y/S254T/T256E-G385R/Q386T/P387R/N389P로부터 선택되는 아미노산 치환 또는 아미노산 치환의 조합 (Dall'Acqua et al., 상기 문헌)을 포함한다.

[0504] "이중-돌연변이체"

[0505] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.

[0506] 상기 및 추가로 아래에 설명된 바와 같이, 본 발명은 또한 2개의 돌연변이가 개별적으로 각각 이펙터 기능을 감소시키지만 이펙터 기능을 모 항체의 수준으로 함께 회복시키는 "이중-돌연변이체" 측면에 관한 것이다. 함께 사용될 때, 변이체의 특이성은 증가한다. "이중-돌연변이체" 측면에 따른 항체 변이체는 특이적 아미노산 잔기 상호작용 쌍 K439 및 S440에 2개의 돌연변이, 일반적으로 아미노산 치환을 포함한다.

[0507] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는

[0508] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이 - 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R임;

[0509] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이; 또는

[0510] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이

[0511] 를 포함한다.

[0512] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드, 및 또한 그의 변이체는 항체일 수 있다.

[0513] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 모 항체의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니고, 예컨대 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다. 표 2A 및 B는 "이중-돌연변이체" (표 2A) 및 "혼합된-돌연변이체" (표 2B) 측면에 대한 "예시적인" 및 "바람직한 치환"을 보여준다.

표 2

표 2A: "이중-돌연변이체" 측면에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

아미노산 쌍 (IgG1, 2, 3, 4)	예시적인 치환	바람직한 치환
K439/S440	K439ED, 대안적으로 R/S440KR, 대안적으로 ED	K439E/S440K
K447/448/449	K447ED/448KRH/449P	K447E/448K/449P
K447/448	K447KRH/448ED	K447K/448E

표 2B: "혼합된-돌연변이체" 측면 (Ab1 + Ab2) 에 대한 예시적인 돌연변이 부위 및 아미노산 치환

아미노산 쌍 (IgG1)	예시적인 치환	바람직한 치환
K439 + S440	K439DER + S440DEKR	K439E + S440K
K447 + K447/448	K447DE + K447KRH/448P	K447E + K447/448P
K447 + K447/448/449	K447DE + K447KRH/448KRH/449P	K447E + K447/448K/449P

[0514]

[0515]

[0516]

[0517]

[0518]

[0519]

[0520]

[0521]

[0522]

[0523]

[0524]

[0525]

[0526]

[0527]

[0528]

[0529]

[0530]

변이체의 한 실시양태에서, 돌연변이는 S440 및 K447 이외의 다른 위치(들)에 존재하고, 변이체는

(i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이 - 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아님;

(ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이; 또는

(iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이

를 추가로 포함한다.

따라서, 본 발명은 K439에 대응하는 인간 IgG1 중쇄의 CH2 및/또는 CH3 영역 내의 잔기에서의 제1 돌연변이, 및 S440에 대응하는 인간 IgG1 중쇄의 CH2 및/또는 CH3 영역 내의 잔기에서의 제2 돌연변이를 포함하는 항체의 변이체를 제공한다.

변이체는 또한 아미노산 잔기 치환 중의 하나, 예컨대 K439E 또는 S440K만을 포함할 수 있고, 예컨대 변이체는 임의로 S440에 돌연변이가 존재하지 않으면서 K439에 돌연변이를 포함함이 본 발명에 의해 고려된다.

한 실시양태에서, 본 발명은 K439의 돌연변이가 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 K439E인 변이체에 관한 것이다.

또다른 실시양태에서, 변이체는 임의로 K439에 돌연변이가 존재하지 않으면서 S440에 돌연변이를 포함한다.

한 실시양태에서, 본 발명은 S440에서의 돌연변이가 K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 S440K인 변이체에 관한 것이다.

한 실시양태에서, 변이체는 K439 및 S440 둘 모두에 돌연변이를 포함한다.

또다른 실시양태에서, K439의 돌연변이는 K439(D, E 또는 R)로부터 선택되고, S440에서의 돌연변이는 S440(D, E, K, H 및 R)로부터 선택된다.

또다른 실시양태에서, K439의 돌연변이는 K439D 및 K439E로부터 선택되고, S440에서의 돌연변이는 S440K, S440R, 및 S440H로부터 선택된다.

또다른 실시양태에서, 변이체는 K439E 및 S440K 돌연변이를 포함한다.

실시예 4-6에서 설명되는 바와 같이, K439E 및 S440K 돌연변이 중의 하나만을 포함하는 항체 변이체는 C1q에 대해 급격하게 증가된 K_D 를 가졌고, 이것은 감소된 보체 활성화 및/또는 CDC 능력을 반영한다. 놀랍게도, 두 돌연변이를 포함하는 HuMAb 7D8 또는 005의 항체 변이체는 회복된 또는 증가된 C1q-결합 또는 CDC를 갖는 것으로 밝혀졌다. 임의의 특정한 이론에 매이지 않으면서, 근본적인 메커니즘은 아마도 도 4 및 5에 예시된 바와 같이, 서로에 대해 입체적으로 보완하는 각각의 돌연변이에 의해 설명될 수 있다.

본원에서 설명되는 바와 같이, 임의의 "이중-돌연변이체"는 또한, 단독으로 이펙터 기능을 증가시킬 수 있는 돌연변이와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, "이중-돌연변이체" 측면은 "단일-돌연변이체" 측면과 조합될 수 있고, 예를 들어, 변이체는 표 1에 열거된 임의의 아미노산 위치에서의 돌연변이 또는 상기 "단일-돌연변이체" 측면에 대해 설명된 임의의 다른 실시양태의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 돌

연변이는 S440 이외의 다른 위치(들)에 존재하고, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 추가로 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아니다.

- [0531] 한 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는
- [0532] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0533] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0534] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0535] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이를 포함하지 않음, 및
- [0536] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0537] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고,
- [0538] 변이체는
- [0539] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이 - 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아님;
- [0540] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이; 또는
- [0541] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이
- [0542] 를 추가로 포함한다.
- [0543] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드, 및 그의 변이체는 항체일 수 있다.
- [0544] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 모 항체의 변이체에 관한 것이고, 여기서 변이체는
- [0545] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0546] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0547] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0548] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이를 포함하지 않음, 및
- [0549] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0550] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고,
- [0551] 변이체는
- [0552] (i) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이 - 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아님,
- [0553] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이; 또는
- [0554] (iii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 또는 K447K/R/H 및 448K/R/H 및 449P에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이
- [0555] 를 추가로 포함한다.
- [0556] 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에

서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 추가의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아니다.

[0557] 추가의 실시양태에서, 변이체는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내에 돌연변이를 포함하고, 이 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이고, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 추가의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아니다.

[0558] 한 실시양태에서, 변이체는 IgG1 중쇄의 Fc 영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 두 위치 모두에 아미노산 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.

[0559] 추가의 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.

[0560] 추가의 실시양태에서, 제1 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386, 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 존재하고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고; 제2 및 제3 돌연변이는 위치 K439E 또는 S440K의 아미노산 치환이다.

[0561] 한 실시양태에서, 제1 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 상기 치환은 임의의 천연 생성 또는 비-자연 발생 아미노산에 의한 치환일 수 있다.

[0562] 추가의 실시양태에서, 제1 돌연변이는 E345R,Q,N,K,A,F,G,H,I,L,M,P,S,T,V,W,Y,C,D; E430T,S,G,A,F,H,L,P,R,V,C,D,I, K,M,N,Q,W,Y; 및 S440W,Y,D의 군으로부터 선택되고, 제2 및 제3 돌연변이는 위치 K439E 또는 S440K의 아미노산 치환이다.

[0563] 바람직한 실시양태에서, 하나의 돌연변이는 E345R,Q,N,K,Y; E430T,S,G,F,H; S440W,Y; 및 Q386K의 군으로부터 선택된다.

[0564] 또다른 예로서, 본 발명의 한 실시양태에서, 변이체는 E345R, K439E 및 S440K 돌연변이를 포함하고, 따라서, 증가되고 보다 특이적인 CDC-반응의 매개를 제공한다.

[0565] 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 추가의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아니다.

[0566] 추가의 실시양태에서, 변이체는 적어도 2개의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고, 이 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345X, E430X, S440W/Y, Q386K에 대응하는 치환으로부터 선택되는 아미노산 치환이고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 예컨대 자연 발생 아미노산이고, 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 또는 S440에 대응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 추가의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440W 또는 S440Y가 아니다.

[0567] 한 실시양태에서, 변이체는 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439 및 S440에 대응하는 위치 둘 모두에 아미노산 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.

[0568] 추가의 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.

[0569] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 돌연변이는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386, 및 S440에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 존재하고, 여기서 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이고; 제3 및 제4 돌연변이는 위치 K439E 또는 S440K의 아미노산 치환이다.

[0570] 또다른 실시양태에서, 본원에서 설명되는 바와 같이 두 위치 K439 및 S440에 돌연변이를 포함하는 변이체는 모 항체 또는 K439 및 S440 중의 하나에만 돌연변이를 포함하는 항체 변이체에 비해, C1q-결합, 보체 활성화, 보체의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세

포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옅소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 Fc-매개된 이펙터 기능의 증가를 갖는다.

[0571] 본 발명은 또한 모 항체, 예를 들어 야생형 항체이거나 또는 K439E 또는 S440K 돌연변이 중의 하나만을 포함하는 항체 변이체에 비해, (i) C1q-결합력, (ii) 항체에 의해 매개된 보체 활성화, (iii) 항체에 의해 매개된 CDC, (iv) 올리고머 형성, (v) 올리고머 안정성, 또는 (i) 내지 (v)의 임의의 조합 중 하나 이상을 회복하기 위한, 항체 내의 K439E 및 S440K 돌연변이의 용도를 제공한다. (iv) 또는 (v)의 한 실시양태에서, 올리고머는 욱량체이다.

[0572] 한 실시양태에서, 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.

[0573] 혼합된 돌연변이체

[0574] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.

[0575] 상기한 바와 같이, 본 발명자들은 또한 단독으로는 이펙터 기능을 감소시키지만 함께 사용될 때에는 이펙터 기능이 회복되는 돌연변이, 예를 들어, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 위치 K439 및 S440에서의 돌연변이가 존재함을 밝혀내었다. 상기 개념은 또한 한 항체에 K439를 도입하고 다른 항체에 S440을 도입함으로써 2개의 상이한 항체의 쌍 형성을 보장하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, "혼합된-돌연변이체" 측면에 따른 항체 변이체는, 일반적으로 동일한 Fc-분자 사이의 감소된 또는 상당히 감소된 Fc:Fc 상호작용을 야기하는 것을 제외한 돌연변이를 포함한다. 그러나, "혼합된-돌연변이체" 항체로서 본 발명의 변이체는 서로 쌍을 형성하여, 예를 들어, 각각의 변이체 단독 또는 모 항체 또는 모 항체들의 혼합물에 비해 특이적 항체 변이체 쌍에 대해 회복된 또는 심지어 증가된 C1q-결합, 보체 활성화, CDC, 올리고머 형성, 및/또는 올리고머 안정성을 제공할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 올리고머는 욱량체이다. 한 실시양태에서, 항체 변이체 쌍은 또한 또는 대안적으로 유지된 또는 개선된 다른 이펙터 기능, 예컨대 C1q-결합, 보체 활성화, 보체 의존적 세포독성 (CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC), FcRn-결합, Fc-감마 수용체 결합을 포함하는 Fc-수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, 항체-의존적 세포성 포식작용 (ADCP), 보체-의존적 세포성 세포독성 (CDCC), 보체-증강 세포독성, 옅소닌화, Fc-함유 폴리펩티드 내재화, 표적 하향조정, ADC 흡수, 아포토시스의 유도, 세포 사멸, 세포 주기 정지, 및 이들의 임의의 조합을 갖는다. 본 발명의 상기 측면은 C1q-결합, 보체 활성화, CDC 또는 다른 이펙터 기능의 강도뿐만 아니라 선택성이 조절될 수 있는 많은 용도를 제공한다.

[0576] "혼합된-돌연변이체" 쌍 내의 각각의 항체 변이체에 대한 예시적인 돌연변이 부위는 표 2에 제시된다. 구체적으로, 본 발명은 항원-결합 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인을 포함하는 항체의 변이체를 제공하고, 여기서 변이체는 K439 및 S440 중의 하나에 대응하는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 잔기에 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 K439에 존재하고, E 또는 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 K439E이다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 S440에 존재하고, K, R 또는 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환, 예컨대 S440K이다.

[0577] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 또한

[0578] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,

[0579] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,

[0580] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,

[0581] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및

[0582] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기

[0583] 로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기; 및

[0584] 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 변이체에 관한 것이다.

[0585] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 또한

- [0586] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0587] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0588] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0589] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0590] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0591]로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기; 및
- [0592] 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 변이체에 관한 것이다.
- [0593] 한 실시양태에서, 2개의 상기 실시양태는 본 발명에 따른 "혼합된-돌연변이체" 쌍 측면에서 조합될 수 있다.
- [0594] "혼합된-돌연변이체" 쌍 내의 각각의 변이체는 표 1에 나열된 아미노산의 돌연변이를 추가로 포함할 수 있다.
- [0595] 본 발명의 한 실시양태에서, "혼합된-돌연변이체" 쌍은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는
- [0596] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0597] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0598] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0599] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0600] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0601]의 군으로부터 선택되는 K439의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 제1 돌연변이, 및
- [0602] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하고;
- [0603] 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0604] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0605] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0606] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0607] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0608] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0609]의 군으로부터 선택되는 S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 제1 돌연변이, 및
- [0610] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0611] 다른 예시적인 "혼합된-돌연변이체" 쌍은 임의의 다음 쌍을 추가로 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다: 돌연변이 K447E를 포함하는 제1 변이체 및 돌연변이 K447/P448을 포함하는 제2 변이체; 돌연변이 K447E를 포함하는 제1 변이체 및 돌연변이 K447/K448/P449를 포함하는 제2 변이체.
- [0612] 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 그러한 아미노산의 치환은 임의의 천연 생성 또는 비-천연적 생성 아미노산 치환일 수 있다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실이다. 또다른 실시양태에서, 돌연변이는 삽입이다. 또다른 실시양태에서, 돌연변이는 아미노산의 치환이다.
- [0613] 특정 실시양태에서, 제1 변이체 및/또는 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0614] 특정 실시양태에서, 제1 변이체 및/또는 제2 변이체는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고, 상

기 돌연변이는 P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430K, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W로 이루어진 군에 대응하는 아미노산 치환일 수 있고, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 제2 돌연변이를 포함하고; 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 제2 돌연변이를 포함한다.

[0615] 예를 들어, 한 실시양태에서, "혼합된-돌연변이체" 쌍의 하나의 변이체는 E345R 및 K439E 돌연변이를 포함하고, 다른 변이체는 E345R 및 S440K 돌연변이를 포함하고, 따라서, 증가되고 보다 특이적인 C1q-결합력, 보체 활성화, CDC, 올리고머 형성, 올리고머 안정성, 및/또는 다른 이펙터-관련 기능, 예컨대 FcRn-결합, ADCC, Fc-감마 수용체 결합, 단백질 A-결합, 단백질 G-결합, ADCP, CDCC, 보체-증강 세포독성, 항체 매개된 포식작용, 내재화, 아포토시스, 옵소닌 처리된 항체의 보체 수용체에 대한 결합, 및/또는 이들의 조합을 제공한다.

[0616] "혼합된-돌연변이체" 측면은 또한 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 표 1에 열거된 각각의 하나 초과 돌연변이를 포함하는 2개의 변이체, 예컨대 돌연변이 S440K/K447E를 포함하는 제1 변이체, 및 돌연변이 K439E/K447/P448을 포함하는 제2 변이체; 예컨대 돌연변이 K439E/K447E를 포함하는 제1 변이체, 및 돌연변이 S440K/K447/P448을 포함하는 제2 변이체를 포함할 수 있다.

[0617] 본원에서 설명되는 바와 같이, "혼합된-돌연변이체" 쌍 내의 변이체는 동일한 또는 상이한 모 항체로부터 유래될 수 있다. 또한, "혼합된-돌연변이체" 측면은 이중특이적 또는 비대칭적 항체에 사용될 수 있다. 또한, 제1, 제2 및 제3 항체는 동일하거나 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0618] 또한, "혼합된-돌연변이체" 측면은 K439E 돌연변이를 갖는 제1 항원에 대한 제1 항체 및 S440K 또는 S440R 돌연변이를 갖는 제2 항원에 대한 제2 항체를 이용함으로써 2개의 특이적 종양 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 보다 특이적으로 작용하는 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 제공할 수 있다. 임의로 이중특이적 항체인 3개의 변이체를 포함하는 "혼합된-돌연변이체" 측면을 이용함으로써 적어도 2개, 예컨대 2, 3, 4, 5 또는 6개의 특이적 종양 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 보다 특이적으로 작용하는 CDC 또는 다른 이펙터 반응을 제공할 수 있다.

[0619] 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체" 및 "혼합된-돌연변이체" 측면의 한 실시양태에서, 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.

[0620] "혼합된-돌연변이체" 측면의 임의의 실시양태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 변이체는 표 1에 열거된 임의의 아미노산 치환의 동일하거나 상이한 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0621] 다중특이적 항체

[0622] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.

[0623] 본원에서 설명되는 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체" 및 "혼합된-돌연변이체" 측면의 임의의 실시양태는 아래에서 설명되는 다중특이적 항체 측면에 사용될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0624] 한 주요 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 제1 CH2-CH3 영역 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 이뮤노글로불린의 제2 CH2-CH3 영역 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체인 변이체에 관한 것이고, 여기서 제1 및 제2 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하고,

[0625] 제1 및 제2 CH2-CH3 영역은 각각 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.

[0626] 한 실시양태에서, 돌연변이는 결실, 삽입 또는 치환이다. 그러한 아미노산의 치환은 임의의 천연 또는 비-천연 아미노산에 의한 치환일 수 있다.

[0627] 본 발명의 이중특이적 항체는 특정 방식으로 제한되지 않고, 상기 및 본원에서 설명되는 임의의 것일 수 있다.

- [0628] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 하나의 제1 돌연변이를 포함한다.
- [0629] 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이는 P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W로 이루어진 군 중의 임의의 것에 대응하는 아미노산 치환될 수 있다.
- [0630] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 WO 2011/131746에 설명된 방식을 갖는다. 따라서, 한 실시양태에서, 변이체는 이중특이적 항체이고, 여기서 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409, T366, L368, K370, D399, F405, 및 Y407에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함하고; 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405, T366, L368, K370, D399, Y407 및 K409에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함하고, 상기 제1 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이는 상기 제2 폴리펩티드 내의 추가의 돌연변이와 상이하다.
- [0631] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체에서 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함하고, 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함한다. 본 발명에 따른 그러한 이중특이적 항체는 실시예 22에 설명된 바와 같이 생성할 수 있다. 또한, 생성된 이중이량체 단백질에 의한 CDC 치사에 대한 효과는 실시예 23에 설명된 바와 같은 검정을 이용함으로써 시험할 수 있다.
- [0632] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 아미노산 치환 E345R에 대응하는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 포함한다.
- [0633] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 아미노산 치환 E345R 및 Q386K에 대응하는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 각각 포함한다. 상기 추가의 돌연변이는 제1 및 제2 폴리펩티드 둘 모두에 존재할 수 있거나, E345R은 제1 폴리펩티드에, Q386K는 제2 폴리펩티드에 존재할 수 있거나; 또는 그 반대일 수 있다.
- [0634] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K409에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 F405에 대응하는 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하고; 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 아미노산 치환 E345R, Q386K, 및 E430G에 대응하는 아미노산 잔기에 추가의 돌연변이를 각각 포함한다. 상기 돌연변이는 제1 및 제2 폴리펩티드 둘 모두에 존재할 수 있거나, 제1 폴리펩티드는 돌연변이 E345R 및 E430G를 포함할 수 있고 제2 폴리펩티드는 돌연변이 Q386K를 포함할 수 있거나; 또는 그 반대일 수 있다.
- [0635] 이중특이적 항체는 예를 들어 CD20 항체의 항원-결합 영역 및 CD38 항체의 항원-결합 영역, 및 표 1 및/또는 2에 열거된 하나 이상의 아미노산의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예시적인 CD20-결합 영역은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO2004/035607에 기재된 오파투무맙 (2F2), 7D8 및 11B8, 및 리톡시맙 (WO 2005/103081)의 것을 포함한다. 예시적인 CD38-결합 영역은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO2006/099875에 기재된 003 및 다라투무맙 (005)의 것을 포함한다.
- [0636] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 동일하거나 상이한 표적 상의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0637] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 내의 제1 돌연변이는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0638] "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면의 한 실시양태에서, 변이체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체, 임의로 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.

[0639] 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 측면, 및 다중특이적 항체 측면에서, 항체의 C1q-결합은 실시예 4에 설명된 검정에 따라 결정하고, CDC는 실시예 5, 6 또는 10에 설명된 검정에 따라 결정하고, 돌연변이는 임의로 실시예 3에 따른 ELISA 검정에서의 C1q-결합을 실시예 4에 따른 세포-기반 검정에서의 C1q-결합과 비교함으로써 결정되는, C1q-결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기에 존재하지 않고, ADCC는 실시예 12에 설명된 검정에 따라 결정된다.

[0640] 추가로, 본 발명은 상기한 임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면 또는 실시양태의 변이체의 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 상기한 임의의 "이중-돌연변이체" 측면 및 실시양태의 변이체를 포함하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 상기 변이체, 제제, 또는 조성물의 의약으로서의 용도를 제공한다.

[0641] 본 발명의 상기 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된 돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면은 특히 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 (UniProt 수탁번호 P01857; 서열 1)의 밑줄 친 잔기 130 내지 330에 대응하는 관련 분절인 P247 내지 K447을 포함하는 IgG1 중쇄를 갖는 인간 항체 분자에 적용될 수 있다:

```
1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалтsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
101 kscdkthtctp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprep qv tylpps rde ltkngvsltc
251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk
```

[0642]

[0643] 본 발명은 또한 인간 IgG2 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 IgG2 중쇄 불변 영역 (수탁번호 P01859; 서열 2)의 밑줄 친 잔기 126 내지 326에 대응한다.

```
1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалтsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktkver
101 kccvecppcp appvagspvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vsvlvtvvhq dwlngkeykc
201 kvsnkglpap iektisktkg qprepqvvtl ppsreemtkn qvsltclvkq
251 fypsdiavew esngqpenny kttppmlsd gsflysklt vdkserwqgn
301 vfcscvmhea lhnhytqksl slspgk
```

[0644]

[0645] 본 발명은 또한 인간 IgG3 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 다음과 같이 밑줄 친, IgG3 중쇄 불변 영역 (UniProt 수탁번호 P01860, 서열 3)의 잔기 177 내지 377에 대응한다:

```
1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалтsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
101 ktplgdttht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
201 pevqfkyvvd gvevhnaktk preeqvnstf rvsvlvtvlh qdwlngkeyk
251 ckvsnkalpa piektisktk gqprepqvvt lppsreemtk ngvsltclvk
301 gfypsdiave wessgqpenn ynttppmlsd dgsfflyskl tvdkserwqgn
351 nifscsvmhe alhnrtqks lslspgk
```

[0646]

[0647] 본 발명은 또한 인간 IgG4 중쇄 부분을 갖는 항체 분자에 적용될 수 있다. IgG1 중쇄의 아미노산 잔기 P247 내지 K447은 IgG4 중쇄 불변 영역 (수탁번호 P01859, 서열 4)의 밑줄 친 잔기 127 내지 327에 대응한다.

```
1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалтsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdhkps ntkvdkrves
101 kygppcpscp afe flggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsged
151 pevqfnwyvd gvevhnaktk preeqfnsty rvsvlvtvlh qdwlngkeyk
201 ckvsnkglps siektiskak gqprepqvvt lppsgeemtk ngvsltclvk
251 gfypsdiave wesngqpenn ykttppvl ds gsflysr l tvdkserwqeg
301 nvfscsvmhe alhnhytqks lslslgk
```

[0648]

[0649] 본 발명은 또한 인간 IgG1m(f) 동종이형 중쇄 부분을 갖는 항체에 적용될 수 있다. IgG1m(f) 동종이형의 아미노산 서열 (CH3 서열은 밑줄로 표시함) - 서열 5

```

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgcclvk dyfpepvtvs wnsгалтsgv
51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep
101 kscdkthtcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk
201 eykckvsnka lpapiekis kakggprepq vytlppsree mtkngvsltc
251 lvggfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw
301 qggnvfscsv mhealhnhyt qkslsispkg

```

[0650]

[0651]

IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 IgG1m(f) 불변 영역의 각각의 분절의 정렬을 도 2에 제시한다. 따라서, 표 1 또는 표 2A 및 B에 기재된 아미노산 내의 임의의 돌연변이는 본 발명에 따른 변이체를 얻기 위해 정렬에 의해 규정된 IgG2, IgG3, IgG4, 및/또는 IgG1m(f) 내의 그의 동등한 위치에 도입될 수 있다.

[0652]

한 실시양태에서, 본 발명은 상기한 임의의 측면에 따른 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 전장 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체의 변이체를 제공한다.

[0653]

임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 측면 및 다중특이적 항체에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330, 서열 2의 잔기 126 내지 326, 서열 3의 잔기 177 내지 377, 또는 서열 4의 잔기 127 내지 327의 서열을 포함할 수 있다.

[0654]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 1-5, 예컨대 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 또는 서열 5로부터 선택되는 서열을 포함한다.

[0655]

한 실시양태에서, IgG1 중쇄의 Fc 영역은 서열 1의 잔기 130 내지 330의 서열을 포함한다.

[0656]

모 항체는 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 모 항체일 수 있다. 상기 측면에서 모 항체는 또한 제1 모 및 제2 모 항체인 것도 의도된다.

[0657]

한 실시양태에서, 모 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체이다.

[0658]

한 실시양태에서, 모 항체는 인간 전장 항체, 예컨대 인간 전장 IgG1 항체이다.

[0659]

한 실시양태에서, 모 항체, 제1 모 항체 및 제2 모 항체는 서열 1 또는 5를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG1 항체, 예를 들어, IgG1m(za) 또는 IgG1m(f) 동종이형이다.

[0660]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 2를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG2 항체이다.

[0661]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 3을 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG3 항체이다.

[0662]

한 실시양태에서, 모 항체는 서열 4를 포함하는 Fc-영역을 임의로 포함하는 인간 IgG4 항체이다.

[0663]

임의의 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 및 다중특이적 항체 측면의 특정 실시양태에서, 변이체는 본 발명에 따라 도입된 돌연변이를 제외하고, 서열 1, 2, 3, 4, 및 5의 아미노산 P247 내지 K447에 적어도 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 약 99%의 동일성 정도를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0664]

따라서, 변이체는 본원에 규정된 임의의 돌연변이를 제외하고 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 또는 서열 5에 따른 서열을 포함할 수 있다.

[0665]

본 발명에 따른 임의의 상기 "단일-돌연변이체", "이중-돌연변이체", "혼합된-돌연변이체" 및 다중특이적 측면은 다음 실시양태를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

[0666]

한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 항체는 일가 항체, 중쇄 항체, 가닥-교환 조작된 도메인 (SEED), 트리오맘, 이중 가변 도메인 이뮤노글로불린 (DVD-Ig), 노브-인투-홀 항체, 미니-항체, 이중-친화도 재표적화 분자 (Fc-DART 또는 Ig-DART); LUZ-Y 항체, 비클로닉 항체, 이중 표적화 (DT)-Ig 항체, 투-인-원 항체, 가교결합된 Mab, mAb², CovX-바디, IgG-유사 이중특이적 항체, Ts2Ab, BsAb, 헤르쿨레스 항체, TvAb, ScFv/Fc 융합 항체, 스콜피언, Fc 도메인에 융합된 scFv 단편, 및 Fc 도메인에 융합된 이중 scFv 단편으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택되는 항체 단편이다.

[0667]

추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체 둘 모두는 인간 종양 세포의 표면 상에 발현된 항원에 결합한다.

[0668]

추가 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체에 대한 항원은 erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD4, CD19, CD20, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, HERV-외피 단백질, 페리오스틴, Bigh3, SPARC, BCR, CD79,

CD37, EGFrvIII, L1-CAM, AXL, 조직 인자 (TF), CD74, EpCAM 및 MRP3으로 이루어진 군으로부터 별개로 선택된다.

- [0669] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 완전 인간 항체이다.
- [0670] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체에 대한 항원은 CD20 및 CD38로부터 임의의 순서로 선택되고, 임의로 제1 및 제2 모 항체는 7D8 및 005로부터 임의의 순서로 선택된다.
- [0671] 추가의 실시양태에서, 제1 항체 및 제2 항체 둘 모두가 세균 세포 또는 비리온의 표면 상에 발현된 항원에 결합한다.
- [0672] 또다른 실시양태에서, 세균 세포는 에스. 아우레우스, 에스. 에피테르미디스, 에스. 뉴모니아, 바실러스 안트라시스, 슈도모나스 에루기노사, 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*), 이. 콜라이, 살모넬라, 시겔라, 예르시니아, 에스. 티피무리움, 네이세리아 메닝기티데스, 및 미코박테리움 투베르쿨로시스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0673] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항원에 결합한다.
- [0674] 또다른 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체는 동일한 항체이다.
- [0675] 또다른 실시양태에서, 모 항체는 7D8 및 005로부터 선택된다.
- [0676] 조성물
- [0677] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0678] 본 발명은 또한 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 모 항체는 본원에서 설명되는 바와 같은 임의의 변이체 및 모 항체일 수 있다. 구체적인 측면 및 실시양태는 아래에서 설명할 것이다. 또한, 상기 변이체는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 따라 얻을 수 있다.
- [0679] 한 측면에서, 본 발명은 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고,
- [0680] (i) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나,
- [0681] (ii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하거나, 또는
- [0682] (iii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함한다.
- [0683] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 항체일 수 있다.
- [0684] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고,
- [0685] (i) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나,
- [0686] (ii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하거나, 또

는

- [0687] (iii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함한다.
- [0688] 한 실시양태에서, 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하는 조성물이 제공되고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0689] 한 실시양태에서, 조성물은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는
- [0690] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0691] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0692] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0693] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0694] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0695] 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0696] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이
- [0697] 를 포함하고; 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고,
- [0698] 상기 제2 변이체는
- [0699] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0700] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0701] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0702] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0703] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0704] 의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0705] (ii) IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0706] 또다른 실시양태에서, 조성물은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는
- [0707] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0708] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0709] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0710] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0711] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0712] 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이,

및

- [0713] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이
- [0714] 를 포함하고, 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 S440Y 또는 S440W가 아닌 돌연변이를 포함한다.
- [0715] 또다른 실시양태에서, 조성물은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0716] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0717] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0718] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0719] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0720] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0721] 의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이,
- [0722] 및 (ii) IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0723] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.
- [0724] 또다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 제1 항원-결합 영역을 포함하고, 제1 변이체는
- [0725] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0726] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0727] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0728] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0729] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0730] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이를 포함하고,
- [0731] 제2 변이체는
- [0732] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0733] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0734] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0735] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0736] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0737] 의 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0738] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드는 항체일 수 있다.
- [0739] 본 발명은 또한 조성물의 실시양태에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는
- [0740] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,

- [0741] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0742] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0743] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0744] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0745] 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0746] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이
- [0747] 를 포함하고,
- [0748] 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 S440Y 또는 S440W가 아닌 돌연변이를 포함한다.
- [0749] 본 발명은 또한 조성물의 실시양태 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0750] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0751] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0752] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0753] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0754] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0755] 의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이,
- [0756] 및 (ii) IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0757] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 제1 항원-결합 영역을 포함하고, 제1 변이체는
- [0758] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0759] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0760] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0761] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0762] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0763] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이를 포함하고,
- [0764] 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0765] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0766] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0767] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0768] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0769] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기

- [0770] 의 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0771] 제2 변이체가 본원에서 설명되는 임의의 나열된 돌연변이를 포함하지 않는 실시양태에서, 상기 제2 변이체는 이펙터 기능의 방법에 관하여 상기 열거된 임의의 적합한 제2 항체의 예를 포함할 수 있다.
- [0772] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 제1 돌연변이를 포함한다.
- [0773] 한 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0774] 한 특정 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R 및 Q386K에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 상기 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0775] 한 특정 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R, Q386K 및 E430G에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 제2 변이는 상기 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0776] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체 내의 적어도 하나의 제1 돌연변이는 상이하다.
- [0777] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체, 임의로 각각 인간 전장 항체, 예컨대 각각 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0778] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0779] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 제1 및 제2 항체가 이중특이적 항체인 실시양태에서, 항체는 각각 2개의 상이한 에피토프에 결합될 수 있다. 적어도 2개의 이중특이적 항체는 동일하거나 상이할 수 있다. 이중특이적 항체가 상이한 경우에, 조성물은 따라서 동일하거나 상이한 표적 상의 4개까지의 상이한 에피토프를 표적화한다.
- [0780] 추가의 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 링커를 통해 독소에 접합된다.
- [0781] 추가의 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 융합 단백질의 일부이다.
- [0782] 또다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 임의의 변이체, 임의의 이중특이적 항체 또는 임의의 조성물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0783] 또한, "혼합된-돌연변이체" 측면에 따른 임의의 실시양태가 임의의 조성물 실시양태에 포함될 수 있음이 고려된다.
- [0784] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항체의 변이체는 동일한 세포 상에 발현된 항원에 결합한다.
- [0785] 또다른 실시양태에서, 제1 항체의 변이체는 K439의 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0786] 또다른 실시양태에서, 제1 항체의 변이체의 아미노산 치환은 K439E이다.
- [0787] 또다른 실시양태에서, 제2 항체의 변이체는 S440의 K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0788] 또다른 실시양태에서, 제2 항체의 변이체의 아미노산 치환은 S440K이다.
- [0789] 대안적 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항체의 변이체는 H310, G385, H433, N434, 및 Q438로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기의 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0790] 추가의 대안적 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항체의 변이체는 E345(D, K, N, Q, R, 또는 W); E382(D, Q, K, 또는 R); 및 H433R로부터 선택되는 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0791] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 항체의 변이체는 E345R, E382R 및 H433R로부터 선택되는 돌연변이, 예컨대 E345R을 추가로 포함한다.

- [0792] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 열거된 임의의 하나의 실시양태의 제1 모 항체의 변이체 및 제2 모 항체의 변이체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0793] 제약 조성물은 통상적인 기술, 예컨대 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 희석제, 충전제 (filler), 염, 완충제, 세제 (예를 들어, 비이온계 세제, 예컨대 트윈 (Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-미함유 아미노산), 보존제, 등장화제, 항산화제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 제약 조성물에 포함하기 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜)을 포함한다.
- [0794] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구적으로 투여된다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구적으로 투여된"은 장관 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 대체로 주사에 의한 투여를 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0795] 부분들의 키트
- [0796] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0797] 본 발명은 또한 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한, 변이체 및 모 항체를 포함하는 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 임의의 변이체 및 모 항체는 본원에서 설명되는 것일 수 있다. 구체적인 측면 및 실시양태를 아래에 설명할 것이다. 또한, 상기 변이체는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 따라 얻을 수 있다.
- [0798] 본 발명은 또한 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한, 변이체 및 모 항체를 포함하는 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 임의의 변이체 및 모 항체는 본원에서 설명되는 것일 수 있다. 구체적인 측면 및 실시양태를 아래에 설명할 것이다. 또한, 상기 변이체는 본원에서 설명되는 임의의 방법에 따라 얻을 수 있다.
- [0799] 한 측면에서, 본 발명은 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하고,
- [0800] (i) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나,
- [0801] (ii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하거나, 또는
- [0802] (iii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함한다.
- [0803] 한 실시양태에서, 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 모 폴리펩티드의 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 항체일 수 있다.
- [0804] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고,
- [0805] (i) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니거나,

- [0806] (ii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H 및 448P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하거나, 또는
- [0807] (iii) 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447D/E에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 상기 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K447K/R/H, 448K/R/H 및 449P에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함한다.
- [0808] 한 실시양태에서, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트는 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 S440에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0809] 한 실시양태에서, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트는 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제1 변이체는
- [0810] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0811] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0812] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0813] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0814] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0815] 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0816] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치의 제2 돌연변이를 포함하고;
- [0817] 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0818] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0819] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0820] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0821] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0822] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0823] 의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0824] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0825] 또다른 실시양태에서, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트는 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는
- [0826] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0827] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0828] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0829] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및

- [0830] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0831] 의 균으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0832] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하고,
- [0833] 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 S440Y 또는 S440W가 아닌 돌연변이를 포함한다.
- [0834] 또다른 실시양태에서, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트는 모 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하고, 여기서 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0835] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0836] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0837] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0838] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0839] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0840] 의 균으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0841] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0842] 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 K439D/E이고/이거나, 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 돌연변이는 S440K/H/R이다.
- [0843] 또다른 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제1 변이체 및 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모 폴리펩티드의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는
- [0844] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0845] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0846] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0847] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0848] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0849] 의 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이를 포함하고,
- [0850] 제2 변이체는
- [0851] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0852] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0853] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0854] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0855] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0856] 의 균으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는다.

- [0857] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 폴리펩티드는 항체일 수 있다.
- [0858] 본 발명은 또한 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트의 실시양태에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는
- [0859] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0860] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0861] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0862] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0863] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0864] 의 군으로부터 선택되는, K439에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0865] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하고,
- [0866] 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에 S440Y 또는 S440W가 아닌 돌연변이를 포함한다.
- [0867] 본 발명은 또한 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트의 실시양태에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 K439에 대응하는 위치에 돌연변이를 포함하고; 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0868] (i) (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0869] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0870] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0871] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기, 및
- [0872] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0873] 의 군으로부터 선택되는, S440에서의 돌연변이 이외의 다른 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 제1 돌연변이, 및
- [0874] (ii) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 위치에서의 제2 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W가 아니다.
- [0875] 또다른 측면에서, 본 발명은 항체의 제1 변이체 및 모 항체의 제2 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트에 관한 것이고, 여기서 제1 변이체는 이뮤노글로불린의 제1 Fc-도메인 및 제1 항원-결합 영역을 포함하고, 제1 변이체는
- [0876] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0877] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,
- [0878] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0879] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0880] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0881] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 제1 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 이뮤노글로불린의 제2 Fc-도메인 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 상기 제2 변이체는
- [0882] (a) 알로스테릭 돌연변이를 제공하는 CH2-CH3 영역 내의 아미노산 잔기,
- [0883] (b) CH2-CH3 영역의 소수성 노브 내의 아미노산 잔기,

- [0884] (c) N-말단 CH3 나선 내의 아미노산 잔기,
- [0885] (d) C-말단 CH3 베타-가닥 내의 아미노산 잔기 - 단 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 S440에 대응하는 돌연변이의 경우에 돌연변이는 S440Y 또는 S440W임, 및
- [0886] (e) 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E382 또는 Q386에 대응하는 아미노산 잔기
- [0887] 의 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0888] 제2 변이체가 본원에서 설명되는 임의의 열거된 돌연변이를 포함하지 않는 실시양태에서, 상기 제2 변이체는 이펙터 기능의 방법에 관하여 상기 열거된 임의의 적합한 제2 항체를 포함할 수 있다.
- [0889] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기 내의 제1 돌연변이를 포함한다.
- [0890] 한 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436, 및 K447에 대응하는 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하되, 단 S440에서의 돌연변이는 S440Y 또는 S440W이다.
- [0891] 한 특정 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R 및 Q386K에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 상기 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0892] 한 특정 실시양태에서, 제1 변이체는 인간 IgG1 중쇄의 Fc-영역 내의 E345R, Q386K 및 E430G에 대응하는 아미노산 잔기에서의 돌연변이를 포함하고, 제2 변이체는 상기 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0893] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체 내의 적어도 하나의 제1 돌연변이는 상이하다.
- [0894] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 각각 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD 또는 IgE 항체, 임의로 각각 인간 전장 항체, 예컨대 각각 인간 전장 IgG1 항체이다.
- [0895] 한 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체는 단일특이적 항체, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로부터 선택된다.
- [0896] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 변이체는 동일한 항원 상의 또는 상이한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 제1 및 제2 항체가 이중특이적 항체인 실시양태에서, 항체는 각각 2개의 상이한 에피토프에 결합될 수 있다. 적어도 2개의 이중특이적 항체는 동일하거나 상이할 수 있다. 이중특이적 항체가 상이한 경우에, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 부분들의 키트는 따라서 동일하거나 상이한 표적 상의 4개까지의 상이한 에피토프를 표적화한다.
- [0897] 추가의 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 링커를 통해 독소에 접합된다.
- [0898] 추가의 실시양태에서, 제1 변이체 및 제2 변이체 중 하나 또는 둘 모두는 융합 단백질의 일부이다.
- [0899] 또한, "혼합된-돌연변이체" 측면에 따른 임의의 실시양태가 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 임의의 부분들의 키트 실시양태에 포함될 수 있음이 고려된다.
- [0900] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체의 변이체는 동일한 세포 상에 발현된 항원에 결합한다.
- [0901] 또다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체는 K439의 E 및 D로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0902] 또다른 실시양태에서, 제1 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 K439E이다.
- [0903] 또다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체는 S440의 K, R 및 H로부터 선택되는 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0904] 또다른 실시양태에서, 제2 모 항체의 변이체의 아미노산 치환은 S440K이다.
- [0905] 대안적 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 항체의 변이체는 H310, G385, H433, N434, 및 Q438로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기의 돌연변이를 추가로 포함한다.

- [0906] 추가의 대안적 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 모 항체의 변이체는 E345(D, K, N, Q, R, 또는 W); E382(D, Q, K, 또는 R); 및 H433R로부터 선택되는 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0907] 추가의 실시양태에서, 제1 및 제2 모 항체의 변이체는 E345R, E382R 및 H433R로부터 선택되는 돌연변이, 예컨대 E345R을 추가로 포함한다.
- [0908] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 열거된 임의의 하나의 실시양태의 제1 모 항체의 변이체 및 제2 모 항체의 변이체를 포함하는, 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 제약용 부분들의 키트에 관한 것이다.
- [0909] 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 제약용 부분들의 키트는 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 요법에서의 동시, 별개 또는 순차 사용을 위한 제약용 부분들의 키트는 비경구적으로 투여된다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구적으로 투여된"은 장관 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 대체로 주사에 의한 투여를 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경맥내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0910] 조합
- [0911] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0912] 추가로, 본 발명은 상기한 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 또는 실시양태의 변이체의 제제, 즉, 다수 카피의 변이체를 포함하는 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 상기한 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 및 실시양태의 변이체를 포함하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 상기 "단일-돌연변이체", 제제, 또는 조성물의 의약으로서의 용도를 제공한다.
- [0913] 본 발명은 또한 하나의 변이체는 표 1의 돌연변이로부터 독립적으로 선택된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 하나의 변이체는 표 1의 돌연변이로부터 독립적으로 선택된 적어도 하나의 다른 돌연변이를 포함하는 변이체의 조합물, 및 상기 변이체 조합물의 제제 및 제약 조성물 및 의약으로서의 그의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 2개의 변이체는 일반적으로 동일한 세포의 표면, 세포막, 비리온 및/또는 다른 입자 상에 발현되는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 결합한다.
- [0914] 접합체
- [0915] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0916] 한 측면에서, 본 발명은 변이체에 관한 것이고, 상기 변이체는 약물, 독소 또는 방사성표지에 접합되고, 예컨대 변이체는 링커를 통해 독소에 접합된다.
- [0917] 한 실시양태에서, 상기 변이체는 융합 단백질의 일부이다.
- [0918] 또다른 측면에서, 본 발명의 변이체는 또다른 분자, 예컨대 독소 또는 표지에 C-말단에서 접합되지 않는다. 한 실시양태에서, 변이체는 또다른 분자에 또다른 부위에서, 일반적으로 올리고머 형성을 저해하지 않는 부위에서 접합된다. 예를 들어, 항체 변이체는 독소 (방사성 동위원소 포함), 전구약물 또는 약물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 다른 부위에서 연결될 수 있다. 그러한 화합물은 예를 들어 암 요법에서 표적 세포의 처사를 보다 효과적으로 만들 수 있다. 생성되는 변이체는 따라서 면역접합체이다.
- [0919] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 치료 모이어티 (moiety), 예컨대 세포독소, 화학치료 약물, 시토키인, 면역억제제, 및/또는 방사성 동위원소에 연결되거나 접합된 항체를 제공한다. 상기 접합체는 본원에서 "면역접합체" 또는 "약물 접합체"로서 언급된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로서 언급된다.
- [0920] 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 (예를 들어, 세포를 죽이는) 임의의 작용제를 포함한다. 본 발명의 면역접합체 형성에 적합한 치료제는 탁솔, 시토크라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 메이탄신 또는 그의 유사체 또는 유도체, 에네디이엔 항종양 항생제, 예를 들어 네오크리지노스타틴,

칼라케아마이신, 에스페라미신, 디네미신, 리다마이신, 케다르시딘 또는 그의 유사체 또는 유도체, 안트라사이클린, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-테히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신, 항대사물질 (예컨대, 메토틱세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈, 클라드리빈), 알킬화제 (예컨대 메클로레타민, 티오에프, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예컨대 카르보플라틴; 및 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, CC-1065 (라첼마이신으로도 알려짐), 또는 CC-1065의 유사체 또는 유도체), 돌라스타틴, 피롤로[2,1-c] [1,4] 벤조디아제핀 (PDB) 또는 그의 유사체, 항생제 (예컨대 닥티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 항-유사분열제 (예를 들어, 튜불린-억제제), 예컨대 모노메틸 오리스타틴 (auristatin) E, 모노메틸 오리스타틴 F, 또는 돌라스타틴 10의 다른 유사체 또는 유도체; 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 히드록삼산 트리코스타틴 A, 보리노스타트 (SAHA), 벨리노스타트, LAQ824, 및 파노비노스타트 및 벤즈아미드, 엔티노스타트, CI994, 모세티노스타트 및 지방족산 화합물, 예컨대 페닐부티레이트 및 발프로산, 프로테아좀 억제제, 예컨대 다노프레비르, 보르테조미드, 아파톡신, 예컨대 α -아만틴, 디프테리아 독소 및 관련 분자 (예컨대 디프테리아 A 사슬 및 그의 활성 단편 및 혼성체 분자); 리신 독소 (예컨대 리신 A 또는 탈글리코실화 리신 A 사슬 독소), 콜레라 독소, 시가 (Shiga)-유사 독소 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIIV), LT 독소, C3 독소, 시가 독소, 백일해 독소, 파상풍 독소, 대두 보우만-버크 (Bowman-Birk) 프로테아제 억제제, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 겐라닌, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스 (*saponaria officinalis*) 억제제, 겐로닌, 미토겐린, 레스트릭토신, 페노마이신 및 에노마이신 독소를 포함한다. 다른 적합한 접합된 분자는 항미생물/용해 펩티드, 예컨대 CLIP, 마가인인 2, 멜리틴, 세크로핀, 및 P18; 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스탕필로코쿠스 (*Staphylococcal*) 장독소-A, 억제물질 항바이러스 단백질, 디프테린 독소, 및 슈도모나스 내독소를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Pastan et al., Cell 47, 641 (1986)] 및 [Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994)]을 참조한다. 본원의 다른 부분에서 설명되는 바와 같이 본 발명의 항체와 조합하여 투여될 수 있는 치료제, 예컨대 항암 시토키인 또는 케모카인도 본 발명의 항체에 접합하기에 유용한 치료 모이어티의 후보물질이다.

- [0921] 한 실시양태에서, 본 발명의 약물 접합체는 오리스타틴 또는 오리스타틴 펩티드 유사체 및 유도체 (US5635483; US5780588)에 접합된, 본원에 개시된 항체를 포함한다. 오리스타틴은 미세관 동역학, GTP 가수분해 및 핵 및 세포 분열을 저해하고 (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584), 항암 (US5663149) 및 항진균 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). 오리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (말단)을 통해, 링커를 통해 항체에 부착될 수 있다.
- [0922] 예시적인 오리스타틴 실시양태는 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volume 45, abstract number 623, presented March 28, 2004] 및 US 2005/0238649에 기재된 N-말단-연결 모노메틸 오리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.
- [0923] 예시적인 오리스타틴 실시양태는 MMAE (모노메틸 오리스타틴 E)이다. 또다른 예시적인 오리스타틴 실시양태는 MMAF (모노메틸 오리스타틴 F)이다.
- [0924] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 접합된 핵산 또는 핵산-회합된 분자를 포함한다. 하나의 그러한 실시양태에서, 접합된 핵산은 세포독성 리보뉴클레아제, 안티센스 핵산, 억제성 RNA 분자 (예를 들어, siRNA 분자) 또는 면역자극성 핵산 (예를 들어, 면역자극성 CpG 모티프 (motif)-함유 DNA 분자)이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 앵타머 (aptamer) 또는 리보자임에 접합된다.
- [0925] 한 실시양태에서, 하나 이상의 방사성표지된 아미노산을 포함하는 항체가 제공된다. 방사성표지된 변이체는 진단 및 치료 목적 모두를 위해 사용될 수 있다 (방사성표지된 분자에 대한 접합이 또다른 가능한 특징이다). 폴리펩티드를 위한 표지의 비제한적인 예는 ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, 및 ¹²⁵I, ¹³¹I, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 방사성표지된 아미노산 및 관련 펩티드 유도체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd Ed., Chafner and Longo, eds.,

Lippincott Raven (1996)] 및 U.S. 4,681,581, U.S. 4,735,210, U.S. 5,101,827, U.S. 5,102,990 (US RE35,500), U.S. 5,648,471 및 U.S. 5,697,902 참조). 예를 들어, 방사성 동위원소는 클로라민-T 방법에 의해 접합될 수 있다.

[0926] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 방사성 동위원소 또는 방사성 동위원소-함유 킬레이트에 접합된다. 예를 들어, 변이체는 항체가 방사성 동위원소와 복합체를 형성하도록 허용하는 킬레이터 링커, 예를 들어, DOTA, DTPA 또는 티옥세탄에 접합될 수 있다. 또한, 변이체는 또한 또는 대안적으로 하나 이상의 방사성표지된 아미노산 또는 다른 방사성표지된 분자를 포함하거나 이에 접합될 수 있다. 방사성표지된 변이체는 진단 및 치료 목적 둘 모두를 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 알파-방출체에 접합된다. 방사성 동위원소의 비-제한적인 예는 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac 및 ^{227}Th 를 포함한다.

[0927] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 안세스틴, 및 TNF α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 시토카인에 접합될 수 있다.

[0928] 본 발명의 변이체는 또한 예를 들어 그들의 순환 반감기를 증가시키기 위해 중합체에 대한 공유 접합에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 예시적인 중합체 및 이들을 펩티드에 부착시키는 방법은 예를 들어 US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 및 US 4,609,546에 예시되어 있다. 추가의 중합체는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (예컨대, 분자량이 약 1,000 내지 약 40,000, 예를 들어 약 2,000 내지 약 20,000인 PEG)을 포함한다.

[0929] 본 발명의 변이체를 접합되는 분자(들), 예를 들어 상기 설명된 것에 접합하기 위해, 문헌 [Hunter et al., Nature 144, 945 (1962)], [David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)], [Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)] 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)]에 기재된 방법을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 상기 변이체는 다른 모이어티를 변이체 또는 그의 단편 (예컨대, 항체 H쇄, L쇄)의 N-말단 또는 C-말단에 화학적으로 접합시킴으로써 생산될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)] 참조). 또한, 상기 접합된 변이체 유도체는 적절한 경우 내부 잔기 또는 당에 접합시킴으로써 생성될 수 있다.

[0930] 이들 작용제는 본 발명의 변이체에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 제2 작용제의 간접적인 커플링의 하나의 예는 이중특이적 항체 내의 시스템인 또는 라이신 잔기에 대한 스페이스 (spacer) 또는 링커 모이어티를 통한 커플링이다. 한 실시양태에서, 변이체는 스페이스 또는 링커를 통해 생체 내에서 치료 약물로 활성화될 수 있는 전구약물 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 링커의 절단이 세포내 환경에서 항체로부터 약물 단위를 방출하도록 세포내 조건 하에서 절단가능하다. 일부 실시양태에서, 링커는 세포내 환경에 존재하는 절단가능 작용제 (예를 들어 리소좀 또는 엔도좀 또는 소포 내의)에 의해 절단될 수 있다. 예를 들어, 스페이스 또는 링커는, 활성 약물이 형성되는 종양-세포 회합 효소 또는 다른 종양-특이적 조건에 의해 절단될 수 있다. 그러한 전구약물 기술 및 링커의 예는 W002083180, W02004043493, W02007018431, W02007089149, W02009017394 및 W0201062171 (신타르가 비브이 (Syntarga BV) 등)에 기재되어 있다. 적합한 항체-전구약물 기술 및 듀오카르마이신 유사체는 또한 본원에 참조로 포함된 미국 특허 6,989,452 (메다렉스 (Medarex))에서 볼 수 있다. 링커는 또한 또는 대안적으로 예를 들어 리소좀 또는 엔도좀 프로테아제를 포함하고 이로 제한되지 않는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커이다. 일부 실시양태에서, 펩티딜 링커는 적어도 2개 아미노산 길이 또는 적어도 3개 아미노산 길이이다. 절단제는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있고, 이들은 모두 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여 활성 약물을 표적 세포 내에 방출시키는 것으로 알려져 있다 (예를 들어 문헌 [Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123] 참조). 특정한 실시양태에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit (발린-시트룰린) 링커 또는 Phe-Lys (페닐알라닌-라이신) 링커이다 (예를 들어, Val-Cit 링커를 사용한 독소루비신의 합성 및 Phe-Lys 링커의 상이한 예를 설명하고 있는 US6214345 참조). Val-Cit 및 Phe-Lys 링커의 구조의 예는 아래에서 설명되는 MC-vc-PAB, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB 또는 MC-Phe-Lys-GABA를 포함하고 이로 제한되지 않고, 여기서 MC는 말레이미도 카프로일의 약어이고, vc는 Val-Cit의 약어이고, PAB는 p-아미노벤질카르바메이트의 약어이고, GABA는 γ -아미노부티르산의 약어이다. 치료제의 세포내 단백질 분해 방출의 잇점은 치료제가 일반적으로 접합될 때 약화되고 접합체의 혈청 안정성이 일반적으로 높다는 점이다.

[0931] 또다른 실시양태에서, 링커 단위는 절단가능하지 않고, 약물은 항체 분해에 의해 방출된다 (US 2005/0238649 참

조). 일반적으로, 상기 링커는 실질적으로 세포의 환경에 감수성이 아니다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 링커의 측면에서 "실질적으로 세포의 환경에 감수성이 아닌"은 변이체 항체 약물 접합체 화합물의 샘플 내의 20% 이하, 일반적으로 약 15% 이하, 보다 일반적으로 약 10% 이하, 및 훨씬 더 일반적으로 약 5% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하의 링커가, 변이체 항체 약물 접합체 화합물이 세포의 환경 (예를 들어, 혈장)에 존재할 때 절단됨을 의미한다. 링커가 실질적으로 세포의 환경에 감수성이 아닌지의 여부는 예를 들어 변이체 항체 약물 접합체 화합물을 혈장과 함께 소정의 기간 (예를 들어, 2, 4, 8, 16 또는 24시간) 동안 인큐베이팅한 후, 혈장 내에 존재하는 유리 약물의 양을 정량함으로써 결정할 수 있다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 예시적인 실시양태는 다음 구조를 갖는다 (여기서, Ab는 항체를 의미하고, 약물-부하 (또는 항체 분자당 세포중식적 또는 세포독성 약물의 평균수)를 나타내는 p는 1 내지 약 8일 수 있고, 예를 들어, p는 4-6, 예컨대 3-5일 수 있거나, p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 수 있다).

[0932] 절단가능 링커가 오리스타틴과 조합되는 예는 MC-vc-PAB-MMAF (또한 vcMMAF로 지정됨) 및 MC-vc-PAB-MMAF (또한 vcMMAE로 지정됨)를 포함하고, 여기서 MC는 말레이미도 카프로일의 약어이고, vc는 Val-Cit (발린-시트룰린) 기반 링커의 약어이고, PAB는 p-아미노벤질카르바메이트의 약어이다.

[0933] 다른 예는 비-절단가능 링커와 조합된 오리스타틴, 예컨대 mcMMAF (mc (MC는 본 측면에서 mc와 동일함)는 말레이미도 카프로일의 약어임)를 포함한다.

[0934] 한 실시양태에서, 약물 링커 모이어티는 vcMMAE이다. vcMMAE 약물 링커 모이어티 및 접합 방법은 WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 및 US 11/833,028 (시애틀 제네틱스, 인크. (Seattle Genetics, Inc.)) (본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있고, vcMMAE 약물 링커 모이어티는 상기 문헌에 개시된 것과 유사한 방법을 사용하여 시스템에서 항체에 결합된다.

[0935] 한 실시양태에서, 약물 링커 모이어티는 mcMMAF이다. mcMMAF 약물 링커 모이어티 및 접합 방법은 US7498298, US 11/833,954, 및 WO2005081711 (시애틀 제네틱스, 인크.) (본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있고, mcMMAF 약물 링커 모이어티는 상기 문헌에 개시된 것과 유사한 방법을 사용하여 시스템에서 변이체에 결합된다.

[0936] 한 실시양태에서, 본 발명의 변이체는 이중특이적 항체가 방사성 동위원소에 접합되는 것을 허용하는 킬레이터 링커, 예를 들어, 티옥세탄에 부착된다.

[0937] 한 실시양태에서, 변이체의 각각의 아암 (또는 Fab-아암)은 동일한 하나 이상의 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다.

[0938] 한 실시양태에서, 변이체의 단지 하나의 아암만이 하나 이상의 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다.

[0939] 한 실시양태에서, 변이체의 각각의 아암은 상이한 치료 모이어티에 직접 또는 간접적으로 커플링된다. 예를 들어, 변이체가 이중특이적 항체이고 본원에서 설명되는 바와 같은 2개의 상이한 단일특이적 항체, 예를 들어, 제1 및 제2 항체의 제어된 Fab-아암 교환에 의해 제조되는 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체는 상이한 치료 모이어티와 접합되거나 회합된 단일특이적 항체를 사용하여 얻을 수 있다.

[0940] 추가의 용도

[0941] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.

[0942] 추가의 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 특히 표적 세포 (예를 들어, 종양, 세균 또는 진균 세포) 또는 표적 유기체 (예를 들어, 바이러스) 또는 세균 또는 바이러스 감염 세포의 CDC-매개된 치사가 요구되는 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 변이체에 관한 것이다. 그러한 질환 및 장애의 예는 비제한적으로, 암 및 세균, 바이러스 또는 진균 감염을 포함한다.

[0943] 또다른 측면에서, 본 발명은 암과 같은 질환의 치료를 위한, 본원에서 설명되는 변이체, 이중특이적 항체, 조성물 및 부분들의 키트에 관한 것이다.

[0944] 또다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 투여를 포함하는, 인간의 치료 방법에 관한 것이다.

[0945] 또다른 측면에서, 본 발명은 변이체, 조성물 또는 부분들의 키트의 투여를 포함하는, 인간의 암의 치료 방법에

관한 것이다.

- [0946] "치료"는 증상 또는 질환 상태의 진정, 개선, 정지 또는 근절 (치유)을 목적으로 유효량의 본 발명의 치료 활성 화합물을 투여하는 것을 의미한다.
- [0947] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과의 달성에 필요한 투여량에서 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 의미한다. 항체의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료상 유익한 효과보다 크지 않은 양이다.
- [0948] 이론에 매이지 않으면서, 치료 활성 화합물의 유효량은 본 발명에 따른 임의의 "단일-돌연변이체" 측면 또는 실시양태가 상기 치료 활성 화합물에 도입될 때 감소될 수 있다.
- [0949] 암 항체에 대한 적합한 항원은 본원에서 설명되는 것과 동일할 수 있다.
- [0950] 실시예 15 내지 18은 종양 세포의 향상된 및/또는 보다 특이적 보체 활성화 또는 CDC를 제공하기 위한 구체적인 적용을 설명한다. 예를 들어, E345R 돌연변이를 포함하는 "단일-돌연변이체" 측면에 따른 항-종양 항체는 종양 세포의 향상된 CDC 또는 ADCC, ADCP 반응을 제공할 수 있다. 또한, 상기 방법의 변이체에서, "단일-돌연변이체" 측면에 따른 돌연변이, 예컨대, 예를 들어, E345R, E430, S440, 또는 Q386, 대안적으로 E382 또는 H433R, 또는 표 1에 열거된 임의의 다른 돌연변이가 각각의 항체에 부가되어, 적어도 2개의 항원을 발현하는 종양 세포에 특이적으로 작용하는 향상된 CDC 및/또는 ADCC 반응을 제공할 수 있다.
- [0951] 세균 감염에 대해 적합한 항체는 비제한적으로, 에스. 아우레우스를 표적화하는 항체, 예컨대 스타필로코쿠스의 세포벽에 매립된 리포테이코산 (LTA)을 표적화하고 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 ([Baker (Nat Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1491-3)] 및 [Weisman et al. (Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5): 639-44)])에 설명된 키메릭 모노클로날 IgG1 파기박시맵 (BSYX-A110; 바이오시넥서스 (Biosynexus))을 포함한다. 실시예 14는 E345R 돌연변이를 포함하는 에스. 아우레우스 항체 변이체를 사용하는 특정한 실시양태를 설명한다. 그러나, E430G 및 S440W, 대안적으로 E382R 및 H433R를 포함하고 이로 제한되지 않는, 표 1의 다른 돌연변이가 세균 항원에 대한 항체의 CDC-매개 능력을 향상시키기 위해 유사한 방식으로 적용될 수 있다.
- [0952] 바이러스 또는 진균 감염에 대한 적합한 항원은 본원에서 설명되는 임의의 것일 수 있다.
- [0953] 한 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 인간 EphA2가 아니다. 또다른 실시양태에서, 변이체는 인간 EphA2 mAb 12G3H11 (그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Dall'Acqua et al., 상기 문헌]에 기재된)로부터 유래되지 않는다. 또다른 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 IL-9가 아니다. 또다른 실시양태에서, 변이체는 그 전문이 본원에 참조로 포함된 W02007005612에 기재된 Fa-hG1 또는 Fa-hG4 항체, 또는 그의 임의의 변이체로부터 유래되지 않는다. 한 실시양태에서, 변이체가 결합하는 항원은 HIV-1 gp120이 아니다. 또다른 실시양태에서, 변이체는 gp120에 대해 작용하는 b12 인간 IgG1 κ 항체로부터 유래되지 않는다.
- [0954] 특정 실시양태에서, 변이체는 이중특이적 모 항체로부터 유래한다. 이중특이적 항체는 임의의 이소형, 예컨대, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있고, 전장 항체 또는 그의 Fc-함유 단편일 수 있다. 이중특이적 항체의 예시적인 제조 방법은 WO 2008/119353 (젠랩)에 설명되어 있다.
- [0955] 투여량
- [0956] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0957] 항체에 대한 효율적인 투여량 및 투여법은 치료되는 질환 또는 병태에 따라 결정되고, 당업자가 결정할 수 있다. 본 발명의 항체의 치료 유효량의 예시적인 비-제한적인 범위는 약 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1 내지 20 mg/kg, 예컨대 약 0.1 내지 10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 예컨대 약 0.3, 약 1, 약 3, 약 5, 또는 약 8 mg/kg이다.
- [0958] 본 발명의 항체 변이체는 또한 변이체의 치료 효능 향상 및/또는 보체 소비의 보충을 위해 하나 이상의 보체 인자 또는 관련 성분과 조합하여 투여될 수 있다. 상기 보체 인자 및 관련 성분은 C1q, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, MBL, 및 인자 B를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 조합 투여는 동시에, 따로 또는 순차적으로 시행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 사용 설명서와 함께, 본 발명의 변이체, 및 적어도 하나의 보체 인자

또는 관련 성분을 동일하거나 상이한 제약 조성물에 포함하는 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

- [0959] 본 발명의 항체 변이체는 또한 조합 요법으로, 즉, 치료되는 질환 또는 병태와 관련되는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체-함유 의약품은 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 세포독성, 화학치료 또는 항-혈관신생제와 조합하기 위한 것이다. 상기 조합 투여는 동시에, 따로 또는 순차적으로 시행될 수 있다.
- [0960] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본 발명의 변이체 또는 제약 조성물을 방사선 요법 및/또는 수술과 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 질환, 예컨대 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0961] 제조 방법
- [0962] 모 항체, 제1 모 항체 또는 제2 모 항체를 참고로 하여 본원에서 설명된 모든 실시양태는 또한 이뮤노글로불린의 Fc-도메인 및 결합 영역을 포함하는 모, 제1 모 또는 제2 모 폴리펩티드에 관한 실시양태로서 이해되어야 한다.
- [0963] 본 발명은 또한 상기 설명된 측면의 임의의 하나에 따른 변이체를 코딩하는 단리된 핵산 및 벡터, 및 변이체를 코딩하는 벡터 및 발현 시스템을 제공한다. 항체 및 그의 변이체에 대한 적합한 핵산 구축물, 벡터 및 발현 시스템은 당업계에 공지되어 있고 실시예에 설명되어 있다. 변이체가 중쇄 (또는 그의 Fc-함유 단편)뿐만 아니라 경쇄도 포함하는 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 동일하거나 상이한 핵산 또는 벡터 상에 존재할 수 있다.
- [0964] 본 발명은 또한 상기 설명한 측면 중의 임의의 하나에 따른 항체 변이체를 숙주 세포에서 생산하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 변이체는 적어도 중쇄의 Fc 영역을 포함하고, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0965] a) 상기 변이체의 상기 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 구축물을 제공하는 단계,
- [0966] b) 상기 뉴클레오타이드 구축물을 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및
- [0967] c) 상기 항체 변이체를 상기 숙주 세포의 세포 배양액으로부터 회수하는 단계.
- [0968] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 항체이다. 그러나, 대부분의 실시양태에서, 항체는 또한 경쇄를 함유할 것이고, 따라서, 상기 숙주 세포는 동일하거나 상이한 벡터 상의 경쇄-코딩 구축물을 발현한다.
- [0969] 항체의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있고, CHO, HEK-293, PER-C6, NS/0 및 Sp2/0 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 단백질의 Asn-연결 글리코실화가 가능한 세포, 예를 들어, 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포이다. 추가의 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 인간 유사 또는 인간 글리코실화를 갖는 당단백질을 생산하도록 유전적으로 조작된 비-인간 세포이다. 상기 세포의 예는 유전적으로 변형된 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) ([Hamilton et al., Science 301 (2003) 1244-1246]; [Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325]) 및 유전적으로 변형된 램나 마이너 (*Lemna minor*) (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597)이다.
- [0970] 한 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 항체 중쇄로부터 C-말단 라이신 K447 잔기를 효율적으로 제거할 수 없는 숙주 세포이다. 예를 들어, 문헌 [Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426] (본원에 참조로 포함됨)의 표 2에는 많은 상기 항체 생산 시스템, 예를 들어, Sp2/0, NS/0 또는 트랜스제닉 유선 (염소) (C-말단 라이신의 부분적 제거만이 얻어짐)이 제시되어 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포이다. 상기 세포는 당업계에 설명되어 있고, 본 발명의 변이체를 발현하여 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하기 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740]; [Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1], 및 EP1176195; WO03/035835; 및 WO99/54342 참조. 조작된 글리코형 (glycoform)을 생성하기 위한 추가의 방법은 당업계에 공지되어 있고, 문헌 [Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294]; [Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740]; [Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473], US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; 포텔리젠트(Potelligent)TM 기술 (바이오와 인크. (Biowa, Inc. 미국 뉴저지주 프린스턴)); GlycoMabTM 글리코실화 조작 기술 (글리카르트 바이오테크놀로지 아게 (GLYCART biotechnology AG, 스위스 쾰리히)); US 20030115614; [Okazaki et al., 2004, JMB, 336:1239-49]에 기재된 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

- [0971] 본 발명은 또한 상기 설명된 본 발명의 방법에 의해 얻어진 또는 얻을 수 있는 항체에 관한 것이다.
- [0972] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 변이체를 생산할 수 있는 숙주 세포에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 본 발명의 뉴클레오타이드 구축물로 형질전환 또는 형질감염된 것이다.
- [0973] 본 발명은 추가로 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 하는 다음 실시예에 의해 추가로 예시된다.
- [0974] **실시예**
- [0975] **실시예 1**
- [0976] **7D8 돌연변이체의 설계 및 생성**
- [0977] 인간 모노클로날 항체 HuMab-7D8 (WO 2004/035607에 기재됨)을 모델 항체로서 사용하였다. 이것은 오파투무맙 (HuMax-CD20, 2F2)을 비롯한 인간 항-CD20 IgG1 항체의 군에 속한다. 이들 항체는 CD20 분자 상의 독특한 막-근위 에피토프를 표적으로 하고, 강한 CDC를 보여준다.
- [0978] 보체 활성화 및 CDC에서 올리고머성 Fc-Fc 상호작용의 기능적 관련성을 시험하기 위해, 7D8의 Fc-Fc 측면 (side-on) 상호작용 및 CDC 효능을 잠재적으로 파괴하도록 Fc:Fc 계면에서 소수성 패치 (patch) 내의 아미노산을 돌연변이시켰다. 제1 세트 (set)의 돌연변이체 (표 3)에서, 1HZH 결정 구조에 기반하여 선택된 위치에서 전하를 변화시키기 위해 돌연변이를 도입시켰고, CH2-CH3 도메인에서 소수성 패치 내에 노출된 것으로 설명되었다 (Burton Mol Immunol 1985 Mar; 22(3): 161-206)).
- [0979] 제1 세트의 돌연변이로부터, I253D 및 H433A가 7D8에 의한 CDC의 상실에 대해 가장 강한 효과를 유도하는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, 실시예 5). 1HZH 결정 구조는 I253 및 H433이 짝을 이루는 항체의 대치하는 Fc 위치 상의 2개의 상이한 포켓 (pocket)에 결합하는 것을 보여준다. 이들 데이터에 기초하여, CDC에 대한 Fc:Fc 측면 계면에서 잔기의 중요성을 추가로 연구하기 위해 결정 구조 내에서 I253 및 H433 위치 주위에 제2 세트의 돌연변이를 합성하였다. Fc:Fc 계면 및 결과적으로 CDC를 잠재적으로 탈안정화시키는 I253 및 H433 위치 주위의 제2 세트의 돌연변이를 표 4에 열거한다.
- [0980] C1q에 대한 직접 결합 부위의 파괴가 CDC에 대한 관찰된 효과의 원인이 될 가능성을 배제하기 위해, 단일 돌연변이체에 의한 CDC의 상실을 회복하는 그의 능력을 시험하기 위해 CDC 상실을 보여준 2개의 단일 돌연변이체에 기반하여 이중 돌연변이체를 생성하였다. 상기 원리를 도 1d에 개략적으로 도시한다. 이중 돌연변이체를 표 5에 열거하고, 구조적 도면을 도 4 및 도 5에 제시한다.
- [0981] 퀵체인지 (Quikchange) 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠 (Stratagene, 미국))를 사용하여 돌연변이체를 제조하였다. 간단히 설명하면, 목적하는 돌연변이를 코딩하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, IgG1m(f) 동종이형을 갖는 7D8 중쇄를 코딩하는 전장 플라스미드 DNA 주형을 복제하였다. 생성되는 DNA 혼합물을 DpnI을 사용하여 공급원 플라스미드 DNA를 제거하고, 이. 콜라이를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 생성되는 콜로니로부터 단리된 돌연변이체 플라스미드 DNA를 DNA 서열결정에 의해 검토하였다 (아고바 (Agowa, 독일)). 항체의 중쇄 및 경쇄를 둘 모두 코딩하는 플라스미드 DNA 혼합물을 본질적으로 제조자가 설명한 바와 같이 293fectin (인비트로젠, 미국)을 사용하여 프리스타일 (Freestyle) HEK293F 세포 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국))에 일시적으로 형질감염시켰다.

표 3

7D8의 CH2-CH3 도메인 내에 도입된 세트 1 돌연변이.

돌연변이	전하 WT aa	전하 돌연변이체 aa
I253D	=	-
I253Y	=	=
I253A	=	=
Q311A	=	=
H433A	δ+	=
N434A	=	=
H435A	Δ+	=
H435R	δ+	+

(=) 전하 없음
 (-) 음전하
 (+) 양전하
 (δ+) 부분적 양전하

[0982]

표 4

7D8의 CH2-CH3 도메인 내에 도입된 세트 2 돌연변이.

돌연변이(들)	전하 WT aa	전하 돌연변이체 aa
I253K	=	+
I253R	=	+
I253D/H433A	= / δ+	- / =
H310E	δ+	-
H310R	δ+	+
H310K	δ+	+
Q311K	=	+
K322A	+	=
E345R	-	+
E382R	-	+
G385D	=	-
H433D	δ+	-
H433R	δ+	+
Y436C	=	=
Y436D	=	-
Q438D	=	-
K439E	+	-
S440K	=	+

(=) 전하 없음
(-) 음전하
(+) 양전하
(δ+) 부분적 양전하

[0983]

표 5

각각 CDC의 상실을 보이는 2개의 단일 돌연변이를 조합하도록 7D8의 CH2-CH3 도메인 내에 도입된 이중 돌연변이.

돌연변이	전하 WT aa	전하 돌연변이체 aa
K439E/S440K	+ / =	- / +

(=) 전하 없음
(-) 음전하
(+) 양전하

[0984]

[0985] 실시예 2

[0986] 7D8 돌연변이체에 의한 세포 상의 CD20 결합

[0987] CD20-양성 세포에 대한 정제된 항체 샘플의 결합을 FACS 분석에 의해 분석하였다. 제1 세트의 돌연변이 (표 3)를 다우디 세포에서 시험하고, 제2 세트의 돌연변이 (표 4)를 라지 세포에서 시험하였다. 10⁵개의 세포를 4℃에서 30 min 동안 RPMI1640/0.1% BSA 내에서 항체 제제의 연속 희석액 (다우디 상에서 제1 세트에 대해 3배 희석으로 0.04 내지 10 μg/mL 범위, 및 라지 상에서 제2 세트에 대해 3배 희석으로 0.003 내지 10 μg/mL 범위) 과 함께 폴리스티렌 96-웰 환저 플레이트 (그라이너 바이오-원 (Greiner bio-one) 650101)에서 50 μl로 인큐베이션하였다. RPMI1640/0.1% BSA 내에서 2회 세척한 후에, 세포를 4℃에서 30 min 동안 2차 항체와 함께 100 μl로 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-접합된 토끼-항-인간 IgG (F0056, 다크 (Dako, 덴마크 글로스트럽); 1/100)를 다우디 세포 상에서 모든 실험에 대해 및 라지 세포 상에서 7D8 항체를 사용한 실험에 대해 사용하였다. 라지 세포 상에서 정제된 7D8 항체를 사용한 실험에 대해, R-피코 에리트린 (R-PE)-접합된 염소 F(ab')₂ 항-인간 카파 경쇄 (2062-09, 서던바이오테크 (SouthernBiotech); 1/500)를 2차 항체로서 사용하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 2회 세척하고, 100 μl PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 재현탁하고, FACS Cantol1 (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences)) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism) V5.01 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어 (GraphPad Software, 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 이용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 시그모이드 (sigmoidal) 용량-반응)를 이용하여 분석하였다.

[0988] 다우디 세포에 대한 7D8 항체의 결합은 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 영향을 받지 않았고, 모든 시험한 돌연변이체 및 야생형 7D8에 대해 동일하였다. 또한, 라지 세포에 대한 7D8 항체의 결합은 E345R 을 제외하고는 야생형 7D8에 비해 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 유의하게 영향을 받지 않았다. 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 을 초과하는 시험 농도에서 CD20-양성 라지 세포 상에서 IgG1-7D8-E345R의 감소된 결합이 검출되었다. 또한 H433D 및 H433R에 대해, 시험된 최고 항체 농도 (10 $\mu\text{g/mL}$)에서 감소된 결합이 검출되었다. IgG1-7D8-E345R, H433D 및 H433R에 의한 감소된 결합은 2차 항체의 에피토프의 차폐 (shielding)에 의해 설명될 수 있고, 이것은 E345R 및 H433R의 직접 표지가 다우디 세포에 대한 유사한 또는 심지어 증가된 결합을 생성시키기 때문이다. 증가된 결합력은 야생형 IgG1-7D8에 비해 E345R 및 H433R에 의한 증가된 Fc-Fc 측면 결합에 의해 설명될 수 있다.

[0989] K439E 및 S440K 돌연변이를 조합시키면 라지 세포에 대한 7D8 항체의 결합에 영향을 미치지 않았고, 단일 돌연변이체 및 야생형 7D8과 동일하였다.

[0990] 실시예 3

[0991] 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 결합 ELISA

[0992] 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 결합을 ELISA에서 시험하였고, 여기서 정제된 항체를 플라스틱 표면 상에 코팅하였고, 이것은 랜덤 (random) 항체 다량체화를 일으켰다. 모아진 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 사용하였다.

[0993] 96-웰 마이크로론 (Microdon) ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)를 PBS 중 항체의 연속 희석액 (1.5배 희석으로 0.58-10.0 $\mu\text{g/mL}$ 범위)으로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 세척하고, 0.025% 트윈 20 및 0.1% 젤라틴을 보충한 200 μL /웰 0.5x PBS로 차단하였다. 인큐베이션 사이에 세척하면서, 플레이트를 3% 모아진 인간 혈청 (상퀸 (Sanquin), 제품# M0008)과 함께 1 h 동안 37°C에서, 100 μL /웰 토끼 항-인간 C1q (다코, 제품# A0136, 1/4,000)와 함께 1 h 동안 RT에서, 및 검출 항체로서 100 μL /웰 돼지 항-토끼 IgG-HRP (다코, P0399, 1:10,000)과 함께 1 h 동안 RT에서 순차적으로 인큐베이션하였다. 약 30 min 동안 1 mg/mL 2,2'-아지노-비스 (3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)을 사용하여 발색을 수행하였다. 100 μL 2% 옥살산의 첨가에 의해 반응을 중지시켰다. 흡광도를 405 nm에서 마이크로플레이트 판독기 (비오텍 (Biotek, 미국 버몬트주 위누스키))에서 측정하였다. 로그 변환된 데이터는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 가변 기울기를 갖는 시그모이드 용량-반응 곡선을 피팅함으로써 계산하였다. 돌연변이체의 EC_{50} 값을 야생형 IgG1-7D8에 대해 플레이트마다 표준화하고, 모든 야생형 IgG1-7D8 데이터의 평균을 곱하였다.

[0994] 도 6 및 표 6에 제시된 바와 같이, 시험된 점 돌연변이는 ELISA에 의해 측정할 때 C1q 결합에 대해 최소의 효과를 가졌다. IgG1-7D8-I253D 돌연변이체에 대해, 다소 덜 효율적인 C1q 결합이 ELISA에서 측정되었다 (보다 높은 EC_{50} 값). 코팅 효능을 모든 항체에 대해 시험하였고, 모든 항체에 대해 유사한 것으로 밝혀졌다.

표 6

ELISA에서 C1q 결합에 대한 EC_{50}

항체	평균 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ¹	SD ¹	유의성 ²
IgG1-7D8-WT	2.048	0	Na
IgG1-7D8-I253D	3.838	1.341	*
IgG1-7D8-I253Y	2.209	0.385	Ns
IgG1-7D8-I253A	2.556	0.187	Ns
IgG1-7D8-Q311A	2.182	0.062	ns
IgG1-7D8-H433A	3.327	1.719	ns
IgG1-7D8-N434A	2.120	0.492	ns
IgG1-7D8-H435A	2.267	0.317	ns
IgG1-7D8-H435R	1.242	0.492	ns

¹ 평균 및 SD는 적어도 3개의 실험으로부터 계산하였다.

² 통계학: 던넛 (Dunnett) 다중 비교 검정 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용한 로그 변환된 데이터에 대한

일원 ANOVA. 유의성은 야생형 IgG1-7D8에 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (ns) 유의하지 않음

(*) p=0.01 내지 0.05 (**) p=0.001 내지 0.01 (***) p<0.001.

[0995]

[0996] 실시예 4

[0997] 7D8 돌연변이체에 의한 세포 상의 C1q 결합

[0998] 플라스틱 표면 상에 항체를 코팅시켜 항체 결합 및 Fc-테일 (tail) 제시의 인공 정적 시스템을 생성시킨다. 따라서, 보체 결합을 또한 세포-기반 검정에서 시험하였고, 여기서 항체-흡수된 처리된 CD20-양성 B 세포에 대한 C1q 결합을 FACS 분석에 의해 측정하였다. 세트 1 돌연변이체를 사용한 실험에서, 다우디 또는 라지 세포를 열

음 상에서 10% FBS를 함유하는 90 μL RPMI 1640 배지 내에 현탁시켰다 (2×10^6 세포/mL). 10 μL 의 농도 계열의 C1q (컴플먼트 테크놀로지스 (Complement Technologies, 미국 텍사스주 타일러))를 첨가하였다 (최종 농도 범위는 최대 결합에 따라 0-60 $\mu\text{g/mL}$ 내지 0-140 μg 로 변함). 이어서, 10 μL 의 정제된 항체 (10 $\mu\text{g/mL}$ 최종 농도, 즉, 포화 조건)를 첨가하고, 반응 혼합물을 즉시 37°C 수조에 옮기고, 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 세트 2 돌연변이체를 사용한 실험에서, 시험 mAb를 다우디 세포에 벌크 (bulk)로 첨가한 후, 가변 농도의 C1q를 분취액에 첨가하고, 혼합물을 상기한 바와 같이 인큐베이팅하였다. 세포를 PBS/1% BSA로 3회 세척하고, 30분 동안 실온에서 토끼 FITC-표지된 항-C1q 항체 (다코사이토메이션 (DakoCytomation), 10 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 인큐베이팅하였다. 세포를 PBS/1% BSA로 세척하고, PBS 내에 재현탁하거나 PBS 중의 2% 포름알데히드 내에 고정하였다. 유동 세포측정법을 FACSCalibur 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 수행하고, 평균 형광 강도를 고정된 비드 (스페로테크 (Spherotech))를 사용하여 당량 가용성 형광의 분자 (MESF)로 전환시켰다. 지시된 7D8 항체로 옅소닌 처리된 CD20-양성 세포에 대한 C1q의 결합에 대한 해리 상수 (K_D 값)는 시그마플롯 (SigmaPlot)[®] 소프트웨어 (시스템 소프트웨어 링크, (Systat Software Inc., 워싱턴))를 사용하여 계산하였다. 평균 K_D 값은 반복된 결합 실험으로부터 계산하고 (다우디 세포 상에서 4회, 라지 세포 상에서 3회), 야생형 7D8로 옅소닌 처리된 세포 상의 C1q 결합에 대한 K_D 값에 비교하였다 (표 7 및 표 8).

[0999] 세트 1 돌연변이체를 다우디 및 라지 세포 모두에서 시험하였고, 동일한 결과를 얻었다. C1q ELISA 결과와 반대로, 대부분의 처리된 돌연변이체는 항체-옅소닌 처리된 다우디 (표 7A) 및 라지 세포 (표 8) 모두에서 감소된 C1q 결합력 (증가된 K_D)을 보였다. 야생형 7D8에 비해, IgG1-7D8-Q311A 및 H435A는 거의 내지 전혀 감소를 보이지 않았고, I253A, I253Y 및 N434A는 보다 확연한 감소를 보였고, I253D 및 H433A는 옅소닌 처리된 다우디 또는 라지 세포 상에서 C1q 결합력에서 매우 극적인 감소를 보였다. IgG1-7D8-H435R은 두 세포 종류 모두 상에서 C1q 결합에 대해 야생형 7D8보다 다소 더 높은 결합력 (더 낮은 K_D)을 보였지만, 유의하지 않았다.

[1000] 세트 2 돌연변이체를 다우디 세포 상에서 시험하였다. 야생형 7D8에 비해, IgG1-7D8-E345R, E382R 및 H433R은 보다 낮은 K_D 값에 의해 반영된, 옅소닌 처리된 다우디 세포 상에서 증가된 결합력을 보였다 (표 7B). 다른 모든 세트 2 돌연변이체는 야생형 7D8에 비해 감소된 결합력을 보였고, 여기서 G385D, Y436D, Q438D, K439E 및 S440K는 급격하게 증가된 K_D 값을 보이고 (표 7B), H433D 및 Y436C는 믿을만한 K_D 값이 측정될 수 없는 정도로 급격하게 감소된 결합을 보였다.

[1001] 이중 돌연변이체 IgG1-7D8-K439E/S440K는 항체-옅소닌 처리된 다우디 세포 상에서 회복된 C1q 결합을 보인 한편, 두 단일 돌연변이체는 야생형 7D8에 비해 감소된 C1q 결합을 보였다. K439E/S440K 이중 돌연변이체의 결합력은 야생형 7D8에 비해 다소 증가하였다 (표 7C). 단일 돌연변이체 IgG1-7D8-K439E 및 IgG1-7D8-K440E의 혼합물은 C1q 결합을 완전히 회복할 수 있었고, 이것은 야생형 7D8의 C1q 결합에 대등하였다 (표 7C).

[1002] ELISA에서 변화되지 않은 C1q 결합 (실시예 3) 및 IgG1-7D8 돌연변이체에 의해 세포-기반 검정에서 영향을 받은 C1q 결합 사이의 불일치는 항체 분자들 사이의 Fc:Fc 상호작용에 관여하는 시험된 CH3 위치가 C1q 결합에 직접 영향을 미치지 않지만, 세포 상에 결합될 때 항체 Fc-테일의 동적 위치배정에 영향을 미치고, 그에 의해 또한 C1q 결합의 강도에 영향을 미치는 중요한 결정인자임을 보여준다.

표 7

표 7A: 항체-옴소닌 처리된 다우디 세포에의 C1q 결합에 대한 K_D 값 (돌연변이체 세트 1)

mAb	K _D (nM) Exp.1	K _D (nM) Exp.2	K _D (nM) Exp.3	K _D (nM) Exp.4	K _D (nM) Exp. 10	K _D (nM) Exp. 11	평균 K _D (nM)	sd	p- 값*
7D8	7.7	9.3	4.2	4.3	11.8	13.3	8.4	3.7	na**
7D8-I253A	33.0	20.4	16.7	15.7			21.5	8.0	0.007
7D8-I253Y	58.5	37.0	21.1	48.7			41.3	16.1	0.001
7D8-I253D	146.5	176.1	101.7	205.2			157.4	44.2	<0.001
7D8-Q311A	14.3	13.0	9.6	5.9			10.7	3.8	0.379
7D8-H433A	168.0	76.1	45.2	180.7			117.5	67.0	0.003
7D8-N434A	36.7	47.8	28.3	48.7			42.6	9.7	<0.001
7D8-H435A	7.8	10.9	5.0	10.9			8.6	2.8	0.925
7D8-H435R	5.2	8.7	2.6	3.0			4.9	2.8	0.147

* 야생형 7D8에 비해 (t-검정)
** (na) 적용가능하지 않음

표 7B: 항체-옴소닌 처리된 다우디 세포에의 C1q 결합에 대한 K_D 값 (돌연변이체 세트 2)

mAb	K _D (nM) Exp.5	K _D (nM) Exp.6	K _D (nM) Exp.7	K _D (nM) Exp.8	K _D (nM) Exp.9	K _D (nM) Exp.10	K _D (nM) Exp.11	평균 K _D (nM)	sd	p- 값*
오파투무랍	6	5.4	4	2.7	12.47	12.8		7.2	4.3	0.6192
7D8						11.8	13.3	8.4***	3.7	na**
7D8-H310K	32.4						216	124	130	0.0371
7D8-E345R	3.5		0.17	0.35		2.7		1.7	1.7	0.0106
7D8-E382R		3.5	1.18	1.13		3.3		2.3	1.3	0.0150
7D8-G385D		77					71	74	4	< 0.0001
7D8-H433D****		(1227)					(2694)	(1961)	1037	0.0013
7D8-H433R		5.2	0.72	1.78	5.69	1.6		3	2.3	0.0205
7D8-Y436C****	(2420)						(128)	(1274)	1621	0.0576
7D8-Y436D		431					504	468	52	< 0.0001
7D8-Q438D	767						667	717	70	< 0.0001
7D8-K439E		418					304	361	81	< 0.0001
7D8-S440K		170					48	109	87	0.0131
7D8-I253D/H433A		10316 [†]					246	5291	7106	0.0681

* 야생형 7D8에 비해 (t-검정)
** (na) 적용가능하지 않음
*** 7D8의 평균 K_D는 실험 1, 2, 3, 4, 10 및 11로부터 계산하였다.
**** 믿을만한 피검 곡선 및 K_D 값은 이들 돌연변이체의 너무 약한 결합 때문에 측정될 수 없었다.

표 7C: 항체-옴소닌 처리된 다우디 세포에의 C1q 결합에 대한 K_D 값 (이중 돌연변이체)

mAb	K _D (nM) Exp.5	K _D (nM) Exp.6	K _D (nM) Exp.7	K _D (nM) Exp.8	K _D (nM) Exp.9	K _D (nM) Exp.10	K _D (nM) Exp.11	평균 K _D (nM)	sd	p- 값*
7D8						11.8	13.3	8.4***	3.7	na**
7D8-K439E		418					304	361	81	< 0.0001
7D8-S440K		170					48	109	87	0.0131
7D8-K439E/S440K		4.6	1.63	1.01		2.9		2.6	1.6	0.0196
7D8-K439E + 7D8-S440K mix		3.6	3.05			3.1		3.3	0.3	0.0555

* 야생형 7D8에 비해 (t-검정)
** (na) 적용가능하지 않음
*** 7D8의 평균 K_D는 실험 1, 2, 3, 4, 10 및 11로부터 계산하였다.

[1003]

표 8

항체-옴소닌 처리된 라지 세포에의 C1q 결합에 대한 K_D 값 (돌연변이체 세트 1)

mAb	K _D (nM) Exp.1	K _D (nM) Exp.2	K _D (nM) Exp.3	평균 K _D (nM)	sd	p- 값*
7D8	4.8	7.0	10.9	6.5	3.1	na**
7D8-I253A	10.0	25.7	20.1	18.6	7.9	0.020
7D8-I253Y	24.3	45.6	46.2	38.7	12.4	0.001
7D8-I253D	70.0	172.0	85.2	109.1	55.0	0.005
7D8-Q311A	4.1	10.1	12.2	9.1	3.5	0.280
7D8-H433A	124.8	85.0	84.0	97.9	23.3	<0.001
7D8-N434A	35.9	46.7	35.2	44.9	12.5	<0.001
7D8-H435A	5.4	9.9	6.6	7.3	2.3	0.721
7D8-H435R	3.5	6.2	4.5	4.7	1.4	0.721

* 야생형 7D8에 비해 (t-검정)
** (na) 적용가능하지 않음

[1004]

[1005]

실시예 5

[1006] CD20-양성 라지 세포 상의 CDC 검정에서 7D8 돌연변이체에 의한 C1q 효능

[1007] IgG1-7D8 돌연변이체로 옅소닌 처리된 세포를 사용한 C1q 효능을 CDC 활성에 대한 C1q 결합력에서 관찰된 변화의 영향을 조사하기 위해 CDC 검정에서 시험하였다. 따라서, CDC 검정은 규정된 농도 계열의 C1q를 보충한 C1q-고갈된 정상 인간 혈청을 사용하여 수행하였다. 0.1×10^6 개의 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트 (넉크 (Nunc, 미국 뉴욕주 로체스터))에서 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 정제된 항체 및 농도 계열 인간 C1q (0.005, 0.025, 0.1, 0.3, 1.0, 5.0, $30.0 \mu\text{g/mL}$)와 함께 RT에서 15 min 동안 0.1% BSA를 보충한 RPMI1640 배지 내에서 $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 예비-인큐베이션하였다. 이어서, $25 \mu\text{L}$ 의 C1q-고갈된 혈청 (퀴델 (Quidel, 미국 캘리포니아주 샌디에고))을 첨가하고, 37°C 에서 수조 내에서 30 min 동안 또는 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 샘플을 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 세포 용해는 프로피듐 요오다이드 (PI, 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich, 네덜란드 쾨트레즈)) 생활가능한 세포 배제 검정을 이용하여 FACS에서 결정하였다. % 용해는 다음과 같이 결정하였다: % 용해 = (PI pos 세포의 수/세포의 총 수) \times 100%.

[1008] $30 \mu\text{g/mL}$ C1q의 존재 하에 야생형 7D8에 의한 용해 - C1q를 첨가하지 않았을 때 용해를 100%로 설정하였다. CH_{50} 값 (50% 용해를 일으키는 C1q 농도)은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 로그 변환된 데이터 상에 시그모이드 용량-반응 곡선을 피팅하여 계산하였다. 돌연변이체의 CH_{50} 값을 야생형 7D8에 대해 표준화하였다 (표 9).

[1009] 표 9의 데이터는 C1q 결합력 측정에 따라, IgG1-7D8-Q311A, E382R 및 H435A는 C1q 효능에서 감소를 보이지 않고; I253A, I253Y, G385D, N434A 및 Y436C는 C1q 효능에서 유의한 감소를 보이고; I253D, H310K, K322A, H433A, H433D, Y436D, Q438D, K439E 및 S440K는 시험한 모든 C1q 농도에서 CDC를 유도하는 능력을 거의 완전히 잃었음을 보여준다.

[1010] IgG1-7D8-H435R 및 H433R은 C1q를 다소 더 효율적으로 사용하였고, 이것은 야생형 7D8보다 더 효율적인 CDC를 생성하였다. IgG1-7D8-E345R은 C1q 효능의 극적인 증가를 보였고, 이것은 야생형 7D8에 비해 유의하게 더 높은 CDC 용해를 생성하였다 (표 9).

[1011] 도 7은 K439E 및 S440K 돌연변이 (둘 모두 단일 돌연변이체로서 CDC의 상실을 일으킨다)를 조합하면 두 돌연변이가 하나의 분자 내에 조합될 때 (K439E/S440K 이중 돌연변이체) 또는 두 단일 돌연변이체가 조합될 때 (K439E + S440K 믹스) C1q 효능 검정에서 CDC를 회복하였음을 보여준다.

표 9

라지 세포 상에서의 CDC 검정에서 C1q 효능에 대한 CH_{50}

항체	n ⁽¹⁾	평균 CH_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	유의성 ⁽³⁾
IgG1-7D8-WT	8	0.49	0.26	na
IgG1-7D8-I253A	3	11.16	16.31	***
IgG1-7D8-I253D	3	>30 ⁽⁴⁾	0.00	nd
IgG1-7D8-I253Y	3	16.07	12.50	***
IgG1-7D8-H310K	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-Q311A	3	0.63	0.58	ns
IgG1-7D8-K322A	6	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-E345R	3	0.03	0.01	***
IgG1-7D8-E382R	3	0.77	0.476	ns
IgG1-7D8-G385D	3	22.51	12.97	***
IgG1-7D8-H433A	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-H433D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-H433R	3	0.16	0.09	ns
IgG1-7D8-N434A	3	21.16	15.32	***
IgG1-7D8-H435A	3	0.96	0.20	ns
IgG1-7D8-H435R	3	0.24	0.15	ns
IgG1-7D8-Y436C	3	23.03	12.07	***
IgG1-7D8-Y436D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-Q438D	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-K439E	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-S440K	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-I253D/H433A	3	>30	0.00	nd
IgG1-7D8-K439E/S440K	3	0.09	0.71	ns
IgG1-7D8-K439E + S440K mix	3	1.33	1.48	ns

(1) n 실험의 수

(2) 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.

(3) 통계학: 던넛 다중 비교 검정 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하여 로그 변환된 데이터에 대한 일원 ANOVA.

유의성은 야생형 IgG1-7D8에 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns) 유의하지 않음

(*) p=0.01 내지 0.05 (**) p=0.001 내지 0.01 (***) p<0.001.

(4) 용해가 50%에 도달하지 않았을 때, CH_{50} 은 >30 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정되었다.

(5) P-값은 50% 용해에 도달하지 않은 돌연변이체에 대해 결정될 수 없었다. 그러나, 이들은 IgG1-7D8-WT와 유의하게 상이한 것으로 가정된다.

[1012]

- [1013] 실시예 6
- [1014] CD20-양성 세포 상의 CDC 검정에서 7D8 돌연변이체에 의한 CDC
- [1015] 0.1×10^6 개의 세포를 환자 96-웰 플레이트 (닝크, 미국 뉴욕주 로체스터)에서 항체 농도 계열 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$)과 함께 80 μl 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 20 μl 정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 0.1% BSA를 보충한 30 μl 빙냉 RPMI 배지를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 세포 용해는 프로피듐 요오다이드를 사용하여 FACS 상에서 결정되었다.
- [1016] 다우디 세포에 대한 CDC 검정에 대해, EC_{50} 값 (50% 용해를 일으키는 항체 농도)은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 로그 변환된 데이터 상에 시그모이드 용량-반응 곡선을 피팅하여 계산하였다. 돌연변이체의 EC_{50} 값을 야생형 7D8에 표준화하였다 (표 10 및 표 11).
- [1017] 표 10은 다우디 세포 상에서, IgG1-7D8-I253A, Q311A, E382R, H433R 및 H435A가 야생형 7D8에 비해 CDC에서 차이를 보이지 않았음을 보여준다; 야생형 7D8보다 유의한 더 불량한 CDC (보다 큰 EC_{50})이 IgG1-7D8-I253D, I253Y, H310K, G385D, H433A, H433D, N434A, Y436C, Y436D, Q438D, K439E, S440K 및 I253D/H433A에 대해 발견되었고, 이것은 보다 높은 항체 농도에서 단지 CDC를 유도하였고; 대조군으로서 포함된 C1q 결합 결핍 돌연변이체 IgG1-7D8-K322A는 CDC를 유도하는 능력을 거의 완전히 상실하였고, 시험된 농도에서 EC_{50} 에 도달하지 않았고; IgG1-7D8-H435R은 다우디 세포 상에서 야생형 7D8보다 더 효율적인 CDC를 보여주었다. 중요하게는, C1q 효능 CDC 검정에 따라, E345R은 야생형 7D8보다 급격하게 더 양호한 CDC를 보였고, 여기서 다우디 세포 상에서 10배 더 낮은 EC_{50} 값을 가졌다 (표 10). 도 8은 K439E 및 S440K 돌연변이 (둘 모두 단일 돌연변이체로서 CDC의 상실을 일으킨다)를 조합하면 두 돌연변이가 하나의 분자 내에 조합될 때 (K439E/S440K 이중 돌연변이체) 또는 두 단일 돌연변이체가 조합될 때 (K439E + S440K 믹스) CDC를 회복하였음을 보여준다.
- [1018] 표 11은 라지 세포 상에서 IgG1-7D8 돌연변이체에 대해 유사한 데이터가 발견되었음을 보여준다.

표 10

다우디 세포 상에서의 CDC 검정으로부터 계산된 EC₅₀

항체	n ⁽¹⁾	평균 EC ₅₀ (μg/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	유의성 ⁽³⁾
IgG1-7D8	12	0.48	0.11	na
IgG1-7D8-I253A	4	0.79	0.15	ns
IgG1-7D8-I253D	5	3.33	1.05	***
IgG1-7D8-I253Y	4	1.77	0.43	***
IgG1-7D8-H310K	3	3.03	0.30	***
IgG1-7D8-Q311A	4	0.42	0.12	ns
IgG1-7D8-K322A		>30 ⁽⁴⁾	Nd	*** ⁽⁵⁾
IgG1-7D8-E345R	4	0.04	0.01	***
IgG1-7D8-E382R	4	0.76	0.25	ns
IgG1-7D8-G385D	3	2.12	0.45	***
IgG1-7D8-H433A	5	3.44	1.17	***
IgG1-7D8-H433D	4	4.73	2.57	***
IgG1-7D8-H433R	4	0.33	0.14	ns
IgG1-7D8-N434A	4	1.77	0.46	***
IgG1-7D8-H435A	4	0.81	0.27	ns
IgG1-7D8-H435R	5	0.28	0.06	**
IgG1-7D8-Y436C	4	1.90	1.21	***
IgG1-7D8-Y436D	3	1.88	0.45	***
IgG1-7D8-Q438D	3	2.61	0.38	***
IgG1-7D8-K439E	4	2.34	0.38	***
IgG1-7D8-S440K	4	1.78	0.46	***
IgG1-7D8-I253D/H433A	4	4.77	1.36	***
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	0.33	0.08	ns
IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	4	0.48	0.17	ns

⁽¹⁾ (n) 실험의 수

⁽²⁾ 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.

⁽³⁾ 통계학: 던넛 다중 비교 검정 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하여 로그 변환된 데이터에 대한 일원 ANOVA. 유의성은 야생형 7D8에 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns) 유의하지 않음 (*) p=0.01 내지 0.05 (**) p=0.001 내지 0.01 (***) p<0.001.

⁽⁴⁾ 용해가 50%에 도달하지 않았을 때, EC₅₀은 >30 μg/mL로 설정되었다.

⁽⁵⁾ P-값은 EC₅₀에 도달하지 않은 돌연변이체에 대해 결정될 수 없었다. 그러나, 이들은 야생형 7D8-WT와 유의하게 상이한 것으로 가정된다.

[1019]

표 11

라지 세포 상에서의 CDC 검정으로부터 계산된 EC₅₀

항체	n ⁽¹⁾	평균 EC ₅₀ (μg/mL) ⁽²⁾	SD ⁽²⁾	유의성 ⁽³⁾
IgG1-7D8	13	1.54	0.77	Na
IgG1-7D8-I253A	4	5.55	3.19	*
IgG1-7D8-I253D	6	>30 ⁽⁴⁾	0.00	*** ⁽⁵⁾
IgG1-7D8-I253Y	4	28.95	2.09	***
IgG1-7D8-H310K	2	19.29	15.15	***
IgG1-7D8-Q311A	4	1.72	0.42	Ns
IgG1-7D8-K322A		>30		***
IgG1-7D8-E345R	4	0.16	0.09	***
IgG1-7D8-E382R	4	2.96	1.27	Ns
IgG1-7D8-G385D	2	17.40	17.82	***
IgG1-7D8-H433A	6	22.60	9.30	***
IgG1-7D8-H433D	4	>30	0.00	***
IgG1-7D8-H433R	4	1.42	0.67	Ns
IgG1-7D8-N434A	4	23.02	6.16	***
IgG1-7D8-H435A	4	2.22	1.47	Ns
IgG1-7D8-H435R	6	0.61	0.21	**
IgG1-7D8-Y436C	2	11.93	10.13	**
IgG1-7D8-Y436D	2	16.58	3.93	***
IgG1-7D8-Q438D	2	19.49	14.87	***
IgG1-7D8-K439E	4	21.51	9.96	***
IgG1-7D8-S440K	4	19.53	12.71	***
IgG1-7D8-I253D/H433A	4	>30	0.00	***
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	1.34	0.45	Ns
IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	4	1.58	0.64	Ns

⁽¹⁾ (n) 실험의 수
⁽²⁾ 평균 및 SD는 모든 수행된 실험으로부터 계산하였다.
⁽³⁾ 통계학: 던넷 다중 비교 검정 (그래프패드 프리즘 5.01)을 이용하여 로그 변환된 데이터에 대한 일원 ANOVA.
유의성은 야생형 7D8에 비교하여 계산하였다: (na) 적용가능하지 않음 (nd) 결정되지 않음 (ns) 유의하지 않음
(*) p=0.01 내지 0.05 (**) p=0.001 내지 0.01 (***) p<0.001.
⁽⁴⁾ 용해가 CH₅₀에 도달하지 않았을 때, CH₅₀은 >30 μg/mL로 설정되었다.
⁽⁵⁾ P-값은 EC₅₀에 도달하지 않은 돌연변이체에 대해 결정될 수 없었다. 그러나, 이들은 야생형 7D8-WT와
유의하게 상이한 것으로 가정된다.

[1020]

[1021] 실시예 7

[1022] CDC를 유도하는 그의 능력에 따라 7D8 돌연변이체의 순위결정

[1023] 시험된 7D8 돌연변이체에 대해, 다우디 세포 상에서 C1q 결합 (실시예 4에 설명됨)과 라지 세포 상에서 C1q 효능 검정 (실시예 5에 설명됨) 사이에, 및 다우디 세포 상에서 C1q 결합과 다우디 및 라지 세포에 대한 CDC 검정 (실시예 6에 설명됨) 사이에 상관성이 발견되었다 (상관성 데이터 표 13). 따라서, 다우디 세포 상에서 C1q 결합 검정의 K_D 값을 사용하여 표 12에 제시된 바와 같이 CDC를 유도하는 능력에 따라 모든 시험한 7D8 돌연변이체를 순위결정하였다.

표 12

다우디 세포 상에서 C1q 결합에 대한 감소하는 K_D 값에 따른 모든 시험된 7D8 돌연변이체의 순위결정 (이것은 CDC를 유도하는 그의 능력에 대한 대표로서 역할을 한다).

항체	다우디 세포 상에서 C1q 결합		
	$n^{(1)}$	K_D (nM) ⁽²⁾	SD
IgG1-7D8-E345R	4	1.7	1.7
IgG1-7D8-E382R	4	2.3	1.3
IgG1-7D8-K439E/S440K	4	2.6	1.6
IgG1-7D8-H433R	5	3.0	2.3
IgG1-7D8-K439E + IgG1S440K	3	3.3	0.3
IgG1-7D8-H435R	3	4.9	2.8
IgG1-7D8-H435A	3	8.6	2.8
IgG1-7D8	7	8.7	3.5
IgG1-7D8-Q311A	3	10.7	3.8
IgG1-7D8-I253A*	3	21.5	8.0
IgG1-7D8-I253Y*	3	41.3	16.1
IgG1-7D8-N434A*	3	42.6	9.7
IgG1-7D8-G385D*	2	74.0	4.0
IgG1-7D8-S440K*	2	109.0	87.0
IgG1-7D8-H433A*	3	117.5	16.1
IgG1-7D8-H310K*	2	124.0	130.0
IgG1-7D8-I253D*	3	157.4	44.2
IgG1-7D8-K439E*	2	361.0	81.0
IgG1-7D8-Y436D*	2	468.0	52.0
IgG1-7D8-Q438D*	2	717.0	70.0
IgG1-7D8-Y436C*	2	(1274.0)	1621.0
IgG1-7D8-H433D*	2	(1961.0)	1037.0
IgG1-7D8-I253D/H433A*	2	(5291.0)	7106.0

* 믿을만한 피팅 곡선이 없음. 이탤릭체 K_D 값은 이들 돌연변이체의 너무 약한 결합 때문에 측정될 수 없었다.

[1024]

표 13

다우디 세포 상에서 C1q 결합 (실시예 4)과 라지 세포 상에서 C1q 효능 검정 (실시예 5) 사이, 및 다우디 세포 상에서 C1q 결합과 다우디 및 라지 세포 상에서 CDC 검정 (실시예 06) 사이의 상관성. 데이터를 로그 변환시킨 후, 상관성을 분석하였다.

파라미터	C1q 효능 라지	CDC 라지	CDC 다우디
XY 쌍의 수	21	21	21
피어슨 (Pearson) r	0.8600	0.8668	0.8959
95% 신뢰 구간	0.6812내지 0.9420	0.6952내지 0.9449	0.7569내지 0.9573
P 값 (투-테일드 (two-tailed))	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
P 값 요약	***	***	***
상관성이 유의한가?			
(알파=0.05)	예	예	예
R 제곱 (squared)	0.7396	0.7513	0.8026

[1025]

[1026] 실시예 8

[1027] CD38 항체 005 돌연변이체의 설계 및 생성

[1028] 인간 모노클로날 항체 HuMab 005는 WO/2006/099875에 기재된 완전 인간 IgG1, κ 항체이다. 여기서, 이것은 CDC 활성을 향상시키는 확인된 Fc 돌연변이의 검증을 위한 모델 항체로서 사용되었다. 시험된 돌연변이를 표 14에 열거한다.

[1029] 돌연변이 유발 반응을 위한 주형으로서 IgG1m(f) 동종이형을 갖는 HuMab 005의 중쇄를 사용하여, 실시예 1에 설명된 바와 같이 상이한 돌연변이체에 대한 DNA 구축물을 제조하고 일시적으로 형질감염시켰다.

표 14

005 (HuMax-CD38)의 CH2-CH3 도메인 내에 도입된 돌연변이의 세트.

돌연변이	전하 WT aa	전하 돌연변이체 aa
I253D	-	-
E345R	-	+
H433A	δ+	=
K439E	+	-
S440K	=	+

(=) 전하 없음

(-) 음전하

(+) 양전하

(δ+) 부분적 양전하

[1030]

[1031]

실시예 9

[1032]

HuMab-005 돌연변이체에 의한 세포 상에서의 CD38 결합

[1033]

CD38-양성 다우디 및 라지 세포에 대한 비정제된 항체 샘플의 결합을 FACS 분석에 의해 분석하였다. 10^5 개의 세포를 100 μ l로 폴리스티렌 96-웰 환자 플레이트 내에서 항체 제제의 연속 희석액 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL)과 함께 RPMI1640/0.1% BSA 내에서 4℃에서 30 min 동안 인큐베이팅하였다. RPMI1640/0.1% BSA 내에서 2회 세척한 후, 세포를 50 μ l로 FITC-접합된 토끼 F(ab')₂ 항-인간 IgG (cat. no. F0056; 다크; 1:150)와 함께 4℃에서 30 min 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에서 2회 세척하고, 100 μ l PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 내에 재현탁하고, FACS Canto11 (비디 바이오사이언시즈) 상에서 분석하였다. 결합 곡선을 그래프패드 프리즘 V5.01 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 음성 대조군으로서, 모의-형질감염된 세포의 상청액을 사용하였다.

[1034]

다우디 세포에 대한 HuMab 005의 결합은 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 많이 영향을 받지 않았다. 모든 시험한 항체는 용량-의존 방식으로 다우디 세포에 결합하였다. 결합은 다소 감소한 결합을 보인 005-E345R을 제외하고는, 모든 시험한 돌연변이체에 대해 야생형 HuMab-005와 유사하였다. 그러나, 임의의 이론에 매이지 않으면서, 보다 낮은 결합은 실시예 2에서 IgG1-7D8-E345에 유사한, 2차 항체에 의한 감소한 결합의 결과일 것이다. 005-E345R에 의한 실제 결합력은 005-WT에 비해 유사하거나 심지어 증가할 수 있지만, 본 발명자들은 직접 표지된 항체의 결여 때문에 이것을 확인할 수 없었다.

[1035]

라지 세포에 대한 HuMab-005의 결합은 또한 CH2-CH3 도메인 내에 점 돌연변이의 도입에 의해 많이 영향을 받지 않았다. 모든 시험한 항체는 용량-의존 방식으로 라지 세포에 결합하였다. 최대 결합은 005-I253D 및 H433A 돌연변이체에 대해 야생형 005와 유사하고, 005-E435R, K439E, S440K 돌연변이체 및 005-K439E + 005-S440K의 조합에 대해 더 낮았다. 그러나, 임의의 이론에 매이지 않으면서, 보다 낮은 결합은 실시예 2 (에피토프의 차폐)에서 IgG1-7D8-E345R과 유사한, 2차 항체에 의한 감소한 결합의 결과일 수 있다.

[1036]

실시예 10

[1037]

CD38 항체 005의 돌연변이체에 의한 CD38-양성 세포 상에서의 CDC 검정

[1038]

0.1×10^6 개의 다우디 또는 라지 세포를 환자 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL)와 함께 100 μ l의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 25 μ l 정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37℃ 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ l 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1039]

다우디 및 라지 세포 상에서 7D8 및 005 항체 모두의 CDC 활성을 향상시키는 것으로 나타난 E435R 돌연변이의 CDC 향상 능력을 빈133 세포 상에서 상이한 농도의 정상 인간 혈청 (NHS)을 사용하여 추가로 분석하였다. 0.1×10^6 개의 빈133 세포를 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 환자 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μ g/mL)와 함께 50 μ l의 총 부피로 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, NHS를 C1q의 공급원으로서 100 μ l의 총 부피로 20% 또는 50% NHS의 최종 농도에 도달하도록 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃ 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ l 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였

다.

[1040] CD20 항체 7D8에 대한 CDC 활성을 상실 또는 증가시킨 CH2-CH3 영역 내의 확인된 돌연변이는 CD38을 인식하는 005 항체에 대해 동일한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 도 9는 005-1253D, H443A, K439E 및 S440K가 다우디 (도 9a) 및 라지 (도 9b) 세포 모두에서 CDC 활성의 완전 상실을 보인 반면, 005-E345R 돌연변이체는 두 세포주 모두에서 강하게 향상된 CDC 활성을 보였음을 보여준다. 7D8 데이터에 비해, 둘 모두 단일 돌연변이체로서 CDC를 상실시키는 005-K439E + 005-S440K의 조합은 CDC를 회복시켰다. 놀랍게도, 005-E435R은 야생형 005가 CDC에 의해 치사를 유도할 수 없는 빈133 세포 상에서 CDC를 훨씬 강하게 유도하였다 (도 9c). 빈133 세포 상에서 005-E345R에 의한 CDC 치사는 20% 및 50% 혈청 농도 모두에서 관찰되었다 (도 9c). 또한 라지 세포 상에서, 7D8-E345R 및 005-E345R은 둘 모두 50% 혈청 내에서 시험관 내에서 향상된 CDC를 보였고, 여기서 20% 혈청에서와 유사한 효능을 가졌다 (도 9d).

[1041] CH2-CH3 영역 내의 E345R 돌연변이는 시험한 CD20 항체 7D8 및 CD38 항체 005 둘 모두에서 CDC 활성을 향상시켰으므로, E345R 돌연변이는 CDC를 유도 또는 향상시키기 위해 적용될 수 있는 일반 항체 변형인 것으로 여겨진다.

[1042] 실시예 11

[1043] CDC-증진 돌연변이 E345R을 함유한 IgG1 항체는 야생형 항체보다 Fc 결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의한 CDC의 억제에 덜 민감하다

[1044] IgG의 Fc:Fc 계면에서 소수성 패치 내의 아미노산 위치를 돌연변이시킴으로써, CDC 효능은 방해 또는 향상되는 것으로 밝혀졌다. CDC 효능에서 Fc-Fc 계면에서 상호작용의 관련성, 및 따라서 가능하게는 b12 결정 구조로 관찰된 것과 같은 올리고머성 (예를 들어, 육량체 고리) 구조의 형성을 추가의 조사하였다. 따라서, 야생형 IgG Fc의 표면 상에서 소수성 패치 영역 내의 컨센서스 결합 부위를 표적으로 하는 13-잔기 펩티드 (DCAWHLGELVWCT (서열 7))를 사용하였다 (Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83). 실제로, 다양한 구분된 분자와 상호작용하기 위해 준비된 순응 (adaptive) 영역으로서 (Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83) IgG Fc의 표면 상에서 컨센서스 결합 부위의 확인은 IgG1 b12 결정 구조 내에서 Fc-Fc 상호작용에 관여하는 소수성 패치 내의 코어 (core) 아미노산의 확인과 일치한다 (Saphire et al., Science 2001 Aug 10; 293(5532): 1155-9). 모든 결합 계면 내에 존재하는 상호작용은 6개 아미노산 (Met-252, Ile-253, Ser-254, Asn-434, His-435, 및 Tyr-436)의 공유된 세트, 및 공유된 백본 접촉 (Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83)에 의해 매개된다. 따라서, Fc 결합 펩티드는 Fc-Fc 상호작용 및 결과적으로 CDC 효능에 영향을 미치는 것으로 예상된다.

[1045] 0.1×10^6 개의 다우디 세포를 $75 \mu\text{L}$ 로 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 비정제된 항체와 함께 환저 96-웰 플레이트에서 10 min 동안 실온에서 진탕기 상에서 예비-인큐베이팅하였다. $25 \mu\text{L}$ 의 농도 계열 (범위 $0.06\text{--}60 \mu\text{g/mL}$ 최종 농도)의 Fc 결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT를 흡수된 처리된 세포에 첨가하고, 10 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 인큐베이팅하였다. 이어서, $25 \mu\text{L}$ NHS를 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 0.1% BSA를 보충한 $25 \mu\text{L}$ 빙냉 RPMI 배지를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. $15 \mu\text{L}$ 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS 분석에 의해 결정하였다.

[1046] 야생형 005 (도 10a) 또는 7D8 (도 10b)에 의해 매개된 CDC는 용량-의존 방식으로 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의해 억제되는 것으로 밝혀졌다. 이들 경쟁 데이터는 다시 CDC 효능에서 IgG의 소수성 패치에서 Fc-Fc 상호작용의 관련성을 제안한다. CDC-증강 IgG1-005-E345R 및 IgG1-7D8-E345R 돌연변이체는 둘 모두 그 반응하는 야생형 항체에 비해 Fc-결합 펩티드에 의한 경쟁에 덜 민감하였고, 이것은 E345R 돌연변이가 Fc-Fc 상호작용의 안정성을 증가시키고 결과적으로 CDC를 증가시킴을 제안한다.

[1047] 실시예 12

[1048] CD38 항체 HuMAb 005의 변이체에 의한 CD38 발현 세포의 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)

[1049] 다우디 세포를 수거하고 (5×10^6 세포/ml), 세척하고 (PBS 내에 2회, 1200 rpm, 5 min), 10% 코스믹 (cosmic) 송아지 혈청 (CCS) (하이클론 (HyClone, 미국 유타주 로건))을 보충한 1 ml RPMI 1640 배지 내에 수집하였고, 여기에 $200 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (크롬-51; 아머샴 바이오사이언시즈 유럽 게엠베하 (Amersham Biosciences Europe GmbH, 네덜란드 로센달))를 첨가하였다. 혼합물을 진탕 수조 내에서 1시간 동안 37°C 에서 인큐베이팅하였다. 세포의 세척 후에 (PBS 내에 2회, 1200 rpm, 5 min), 세포를 10% CCS를 보충한 RPMI 1640 배지 내에 재현탁하고, 트립

관 블루 배제에 의해 계수하고, 1×10^5 세포/mL 농도로 희석하였다.

[1050] 한편, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 제조자 (림프구 분리 매질; 룬자 (Lonza, 프랑스 베르비에)의 지시에 따라 표준 피콜 (Ficoll) 밀도 원심분리를 이용하여 신선한 버퍼 코트 (buffy coat) (상퀸, 네덜란드 암스테르담)로부터 분리하였다. 세포를 10% CCS를 보충한 RPMI 1640 배지 내에 재현탁한 후, 세포를 트립산 블루 배제에 의해 계수하고, 1×10^7 세포/mL로 농축하였다.

[1051] ADCC 실험에 대해, $50 \mu\text{l}$ ^{51}Cr -표지된 다우디 세포 (5,000 세포)를 $15 \mu\text{g/mL}$ CD38 항체 IgG1-005 또는 돌연변이체 IgG1-005-E345R와 함께 10% CCS를 보충한 RPMI 배지 내에서 $100 \mu\text{l}$ 의 총 부피로 96-웰 미량역가 플레이트에서 예비-인큐베이팅하였다. RT에서 10 min 후에, $50 \mu\text{l}$ PBMC (500,000 세포)를 첨가하여, 이펙터 대 표적 비율 100:1로 하였다. 최대량의 세포 용해는 $50 \mu\text{l}$ ^{51}Cr -표지된 다우디 세포 (5,000 세포)를 $100 \mu\text{l}$ 5% 트리톤 (Triton)-X100과 함께 인큐베이팅함으로써 결정하였다. 자발적 용해의 양은 5,000개의 ^{51}Cr -표지된 다우디 세포를 임의의 항체 또는 이펙터 세포 없이 $150 \mu\text{l}$ 배지 내에서 인큐베이팅함으로써 결정하였다. 항체-비의존적 세포 용해의 수준은 항체 없이 5,000개의 다우디 세포를 500,000개의 PBMC와 함께 인큐베이팅함으로써 결정하였다. 후속적으로, 세포를 37°C 및 5% CO_2 에서 4 hr 인큐베이팅하였다. 세포 용해의 양을 결정하기 위해, 세포를 원심분리하고 (1200 rpm, 3 min), $75 \mu\text{l}$ 의 상청액을 마이크로닉 튜브에 옮기고, 그 후 방출된 ^{51}Cr 을 감마 계수기를 사용하여 계수하였다. 측정된 분당 계수 (cpm)를 다음과 같이 항체-매개된 용해의 백분율을 계산하기 위해 사용하였다:

[1052] $(\text{cpm 샘플} - \text{cpm Ab-비의존적 용해}) / (\text{cpm max. 용해} - \text{cpm 자발적 용해}) \times 100\%$.

[1053] 표 15는 수행된 ADCC 검정에서 IgG1-005-wt 및 IgG1-005-E345R의 계산된 EC_{50} 값을 보여준다. 4개의 샘플을 시험하였다. IgG1-005-E345R은 4개의 모든 시험한 샘플의 IgG1-005-wt보다 유의한 더 낮은 EC_{50} 값을 보여준다.

표 15

4개의 수행된 실험의 계산된 EC_{50} 값

ADCC		IgG1-005-wt	IgG1-005-E345R	
		EC50	EC50	
A		5,7	1,2	
B		8,3	4,0	
C		14,1	4,1	
D		5,0	0,6	
	평균	8,3	2,5	ng/ml
	SEM	4,1	1,9	
TTEST	2-테일	P =	0,04	
항상된 인자			3,3	배

[1054]

[1055] 도 11은 야생형 항체 HuMab-005에 비해, 돌연변이체 IgG1-005-E345R이 보다 낮은 농도에서 ADCC를 유도할 수 있어서, ADCC 능력의 향상된 효능을 나타냈음을 보여준다.

[1056] 실시예 13

[1057] 야생형 7D8에 비해 7D8 돌연변이체의 FcRn 결합 및 약동학적 분석

[1058] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG를 분해로부터 보호함으로써 IgG의 긴 혈장 반감기를 책임진다. 항체의 내재화 후에, FcRn은 엔도솜 내에서 항체 Fc 영역에 결합하고, 여기서 온화한 산성 환경 (pH 6.0) 내에서 상호작용을 안정하다. 환경이 중성 (pH 7.4)인 혈장막으로 재순환할 때, 상호작용을 잃고, 항체는 다시 순환계로 방출된다. 이것은 IgG의 혈장 반감기에 영향을 미친다.

[1059] 마우스, 시노몰거스 원숭이 및 인간으로부터의 FcRn과 상호작용하는 7D8 돌연변이체 IgG1-7D8-E354R의 능력을 ELISA에서 시험하였다. 모든 인큐베이션은 실온에서 수행하였다. 96 웰 플레이트를 $5 \mu\text{g/mL}$ ($100 \mu\text{l}/\text{웰}$)의 FcRn (마우스, 인간 또는 시노몰거스)의 재조합 생산된 비오티닐화된 세포의 도메인 (FcRnECDHis-B2M-BIO)로 코팅하고, PBST + 0.2% BSA 내에 1시간 희석하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 3배 연속 희석하였다

(PBST/0.2% BSA, pH 6.0 내에). 야생형 IgG1-7D8 또는 IgG1-7D8-E354R을 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST/0.2% BSA, pH 6.0으로 세척하였다. PBST/0.2% BSA, pH 6.0 내에 희석한 염소-항-인간 IgG(Fab'2)-HRP (잭슨 이뮤노 리서치 (Jackson Immuno Research), cat no: 109-035-097)를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 세척한 후에, ABTS를 기질로서 첨가하고, 플레이트를 암소에서 30분 동안 인큐베이팅하였다. 흡광도를 EL808 ELISA 판독기를 사용하여 405에서 판독하였다.

[1060] 상기 연구에서 마우스를 중앙 실험 동물 시설 (Central Laboratory Animal Facility, 네덜란드 유트레히트)의 장벽 유닛 내에 수용하고, 상단 필터 장착 케이지 내에 물 및 사료를 무제한 제공하면서 유지하였다. 모든 실험은 유트레히트 대학 동물실험 윤리 위원회 (Utrecht University animal ethics committee)에서 승인받았다.

[1061] 7D8 돌연변이체의 약동학을 생체 내에서 분석하기 위해, SCID 마우스 (C.B-17/IcrCr1-scid-BR, 찰스-리버 (Charles-River))에 100 μ g (5 mg/kg) 야생형 7D8, IgG1-7D8-E354R, -S440K 또는 K322A (군 당 3마리 마우스)를 정맥내 주사하였다.

[1062] 50 μ l 혈액 샘플을 복제 정맥으로부터 항체 투여 10분, 4시간, 24시간, 2일, 7일, 14일 및 21일에 수집하였다. 혈액을 헤파린 함유 바이알 내에 수집하고, 5분 동안 10,000 g에서 원심분리하였다. mAb 농도 결정까지 혈장을 -20°C에서 저장하였다.

[1063] 인간 IgG 농도는 샌드위치 (sandwich) ELISA를 이용하여 결정하였다. 2 μ g/mL의 농도로 96-웰 미크로론 ELISA 플레이트 (그라이너, 독일)에 코팅된 마우스 mAb 항-인간 IgG-카파 클론 MH16 (#M1268, 씨엘비 상퀀 (CLB Sanquin, 네덜란드))을 포획 항체로서 사용하였다. 플레이트를 2% 닭 혈청을 보충한 PBS로 차단한 후에, 샘플을 첨가하고, ELISA 완충제 (0.05% 트윈 20 및 2% 닭 혈청을 보충한 PBS) 내에 연속 희석하고, 플레이트 진탕기 상에서 1 h 동안 실온 (RT)에서 인큐베이팅하였다. 플레이트를 후속적으로 염소 항-인간 IgG 이뮤노글로불린 (#109-035-098, 잭슨 (Jackson, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그레이스))과 함께 인큐베이팅하고, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) (ABTS; 로슈, 독일 만하임)으로 발색시켰다. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (비오텍, 미국 버몬트주 위누스키)에서 405 nm에서 측정하였다.

[1064] SCID 마우스가 낮은 혈장 IgG 농도를 갖고 따라서 IgG의 소실이 비교적 느리기 때문에 선택하였다. 이것은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 Fc γ -부분의 감소된 결합 때문에 소실의 변화를 검출하기 위해 매우 민감한 PK 모델을 제공한다.

[1065] 통계 시험은 그래프패드 프리즘 버전 4 (그래프패드 소프트웨어)를 이용하여 수행하였다.

[1066] 도 12는 야생형 HuMab-7D8 및 IgG1-7D8-E345R이 모두 마우스, 인간 및 시노물거스 FcRn에 잘 결합하였음을 보여준다. IgG1-7D8-E345R의 결합은 야생형 7D8보다 다소 더 양호하였다.

[1067] 도 13은 시간에 따른 혈장 농도를 보여준다. 야생형 HuMab-7D8 대 IgG1-7D8-E345R, -S440K 또는 K322A 중 하나의 시간 경과에 따른 혈장 농도의 변화 (소실)에서 차이가 없었다.

[1068] 실시예 14

[1069] **Fc-결합 표면 단백질을 발현하는 세균에 대한 IgG 항체의 증가된 살균 활성을 위한 Fc-Fc 안정화 돌연변이 E345R의 사용**

[1070] 보체 캐스케이드 시스템은 병원체에 대한 중요한 숙주 방어 메카니즘이고, 병원체를 인식하는 3가지 상이한 활성화 경로로 나눌 수 있다: i) 항체-매개된 전통적인 경로 (이것은 병원체-결합된 항체에 C1q 결합 시에 활성화된다), ii) 렉틴, 및 iii) 대체 경로 (여기서 보체 시스템은 병원체를 직접 인식하고 항체의 부재 하에 병원체에 의해 촉발된다). 3가지 경로는 C3 절단 및 C3b 침착의 단계에서 모인다. 미생물은 보체 회피의 다수의 메카니즘을 발달시키고, 그 중 하나는 단백질 A에 의해 매개된다 ([Joiner Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42: 201-30]; [Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec; 3(12):948-58]). 단백질 A는 스타필로코쿠스 아우레우스의 세포벽에서 처음 확인되었고, IgG의 Fc 영역에 대한 그의 결합에 대해 잘 알려져 있다 ([Deisenhofer et al., Biochem (1981) 20, 2361-70]; [Uhlen et al., J. Biol. Chem (1984) 259,1695-1702]). 지금까지, 단백질 A의 항포식 효과 및 에스. 아우레우스의 발병기전에서 그의 역할은 단백질 A 및 IgG 사이의 상호작용에 의해 설명되었고, 이것은 호중구 Fc 수용체에 의해 인식되는 항체 배향을 부정확하게 한다 (Foster Nat Rev Microbiol (2005) Dec;3(12): 948-58).

[1071] 실시예 11은 B 세포-특이적 IgG1 항체에 의해 매개된 CDC가 경쟁하는 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의해 억제되었음을 보여준다. 펩티드는 단백질 A, 단백질 G 및 류마티스 인자에 대한 결합 부위와 일치하는 IgG Fc 상

의 컨센서스 결합 부위를 표적으로 한다 (Delano et al., Science 2000 Feb 18; 287(5456): 1279-83). 이들 데이터에 기초하여, 단백질 A-매개된 세균 보체 회피 메커니즘은 Fc 결합에 대해 경쟁하여, 미생물-특이적 항체의 Fc-Fc 상호작용의 탈안정화를 일으키고 결과적으로 항체-매개된 보체 활성화의 억제에 일으킴으로써 작용할 수 있는 것으로 생각된다. 더욱이, 실시예 11은 또한 CDC-증진 E345R 돌연변이를 함유한 B 세포-특이적 IgG1 항체가 야생형 모 항체보다 경쟁하는 Fc-결합 펩티드 DCAWHLGELVWCT에 의한 CDC의 억제에 덜 민감함을 보여준다. 이들 결과를 미생물 상에 발현된 Fc 결합 단백질에 외삽함으로써, E345R 돌연변이에 의한 IgG1 Fc-Fc 상호작용의 증가한 안정화는 미생물-특이적 항체가 미생물 표면 단백질, 예컨대 단백질 A에 의한 Fc 결합 경쟁을 통해 병원체의 탈출 전략에 의한 보체 억제에 덜 감수성이 되도록 할 것이다. 결과적으로, 세균에 대해 작용성인 IgG 항체 내에 E345R 돌연변이의 도입은 야생형 모 항체에 비해 세균 상에 C3b 침착을 증가시키고 살균 활성을 증가시킬 것이다.

[1072] 보체-매개된 세균 치사에 대한 시험관내 척도로서, 호중구에 의한 포식작용 및 혈장 내의 C3a의 생성 (이는 세균 상의 C3b 침착과 일치함)은 둘 모두 아래에 설명한 바와 같이 결정할 수 있다. 실제로, 에스. 아우레우스 상의 C3b 침착은 포식작용을 향상시키고 세균 치사와 상호관련되는 것으로 설명되었다 (Roosjakkars et. al., Nature Immunology 2005: 6,920-927).

[1073] 에스. 아우레우스를 지수 성장하는 세균 배양액을 100 µg/mL FITC와 함께 1h 동안 37°C에서 0.1 M 카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 내에서 인큐베이팅함으로써 FITC로 표지할 것이다. 인간 다형 핵 세포 (PMN)를 피콜 구배를 이용하여 분리할 것이다. FITC-표지된 세균을 돌연변이 E345R이 있거나 없는 농도 계열의 특이적 항체로 옅소닌 처리할 것이다. 포식작용은 1×10^8 개의 옅소닌 처리된 FITC-표지된 세균을 보체 공급원으로서 25% IgG-고갈된 혈청의 존재 하에 인간 PMN과 함께 격렬하게 진탕 하면서 25 min 동안 37°C에서 200 µL의 총 부피로 인큐베이팅함으로써 시험관 내에서 수행할 것이다. 세포를 고정시키고 적혈구를 BD FACS 용해 용액과 함께 15 min 동안 실온에서 인큐베이팅에 의해 용해시킬 것이다. 세척한 후에, 포식작용을 FACS에 의해 측정할 것이다. 호중구 집단은 전방 (forward) 및 측방 (side) 산란 게이팅 (scatter gating)을 통해 선택할 것이고, 포식작용은 호중구 집단에서 평균 형광도로서 표현할 것이다. 대안적으로, 보체 활성화 및 C3b 침착에 대한 척도로서 C3a 생성을 ELISA에 의해 샘플 내에서 측정할 것이다.

[1074] E345R 돌연변이를 함유하는 에스. 아우레우스-특이적 항체는 야생형 모 항체보다 호중구에 의해 더 많은 보체 활성화 및 포식작용을 유도할 것으로 예상된다. 그러한 실험에 사용할 수 있는 항체의 예는 스타필로코쿠스의 세포벽에 매립된 리포테이코산 (LTA)을 표적화하는, 키메릭 모노클로날 IgG1 파기박시맵 (BSYX-A110; 바이오시넥서스)이다 ([Baker, Nat Biotechnol. 2006 Dec; 24(12):1491-3]); [Weisman et al., Int Immunopharmacol. 2009 May;9(5):639-44]).

[1075] 실시예 15

[1076] CDC 활성화를 2가지 상이한 치료적 모노클로날 항체의 혼합물에 의해 동시에 결합된 표적 세포에 제한하는 CDC-억제성 돌연변이의 사용

[1077] 실시예 6에 설명된 바와 같이, CD20 항체 7D8 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 7D8 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체 모두에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, CD38 항체 005 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 005 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체 모두에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다.

[1078] 효율적인 CDC의 유도를 CDC 유도의 선택도를 개선하기 위해 그의 조합된 발현을 이용하여, 2개의 특이적 항원을 동시에 발현하는 표적 세포에 제한하는 것이 유리할 수 있다. CDC 유도를 CD20 및 CD38 항체 둘 모두에 의해 동시에 결합된 세포에 제한하기 위해, 7D8-K439E와 005-S440K의 쌍 또는 7D8-S440K와 005-K439E의 쌍을 다음과 같이 CDC 실험에서 따로 첨가하거나 1:1 혼합할 것이다. 0.1×10^6 개의 다우디 또는 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 또는 항체 혼합물 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 µg/mL)과 함께 100 µL의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅할 것이다. 이어서, 25 µL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅할 것이다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10 µL 프로피듐 요오다이드를 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다. 7D8-K439E, 005-S440K, 7D8-S440K 및 005-K439E는 제

한된 CDC 효능을 나타낼 것으로 예상된다. 7D8-K439E 및 005-S440K의 동시 첨가는 CD20 및 CD38을 모두 발현하는 세포 상에서 특이적으로 효율적인 CDC를 회복할 것으로 예상된다. 마찬가지로, 7D8-S440K 및 005-K439E의 혼합물이 CD20 및 CD38을 모두 발현하는 세포 상에서 특이적으로 효율적인 CDC를 회복할 것으로 예상된다.

[1079] 실시예 16

[1080] 2가지 상이한 모노클로날 항체의 혼합물에서 E345R을 상보성 억제성 돌연변이 K439E 및 S440K와 조합함으로써 향상된 CDC의 증가된 특이성

[1081] 실시예 6에 설명된 바와 같이, CD20 항체 7D8 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 7D8 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, CD38 항체 005 돌연변이 K439E 및 S440K는 모노클로날 항체로서 CDC 효능을 감소시켰다. 이들 돌연변이를 함유하는 005 항체를 혼합하면 CDC를 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 두 돌연변이체 항체에 의해 동시에 결합된 세포에 제한되었다.

[1082] CDC 유도의 향상을 향상된 CDC 유도의 선택성을 개선하기 위해 그의 조합된 발현을 이용하여, 2개의 특이적 항원을 동시에 발현하는 표적 세포에 제한하는 것이 유리할 수 있다. CDC 유도의 향상을 적어도 2개의 상이한 항체의 혼합물에 의해 동시에 결합되는 표적 세포에 제한하는 것이 또한 유리할 수 있고, 여기서 상기 항체는 동일한 세포 표면 항원에 2개의 상이한 에피토프에서 동시에, 또는 2개의 교차-경쟁하는, 유사한, 또는 동일한 에피토프에서 결합한다.

[1083] 따라서, 향상된 CDC 유도를 CD20 및 CD38 항체 둘 모두에 의해 동시에 결합된 세포에 제한하기 위해, CDC 향상 돌연변이 E345R을 항체 7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K 및 005-E345R/K439E에서 CDC 억제성 돌연변이와 조합시켰다. 이들 항체를 다음과 같이 CDC 실험에서 따로 첨가하거나 1:1 혼합하였다. 0.1×10^6 개의 빈133 세포 (다우디 또는 라지 세포와 같은 다른 세포 종류를 또한 사용할 수 있다)를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 (7D8-E345R/K439E, 7D8-E345R/S440K, 005-E345R/S440K 또는 005-E345R/K439E에 대해 3배 희석으로 최종 농도 0.056-10,000 ng/mL) 또는 항체 혼합물 (3배 희석으로 0-333 ng/mL CD38 항체와 혼합된 최종 농도 0.01 μ g/mL CD20 항체; 또는 3배 희석으로 0.0056-1,000 ng/mL CD20 항체와 혼합된 3.3 μ g/mL CD38 항체)과 함께 100 μ L의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25 μ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ L 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1084] 농도 계열의 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K 항체를 고정된 농도의 0.01 μ g/mL 7D8 이중 돌연변이체 항체 (도 14a로부터 결정된 바와 같이 단일체로서 빈133 세포 상에 최소의 CDC를 갖는 최대 농도)와 혼합하여 상보성 조합 005-E345R/K439E + 7D8-E345R/S440K 또는 005-E345R/S440K + 7D8-E345R/K439E를 제조하였다. 도 14c는 005 이중 돌연변이체 CD38 항체가 각각 고정된 농도의 상보성 7D8-E345R/K439E 또는 7D8-E345R/S440K CD20 항체의 존재 하에 CDC를 용량-의존적으로 유도하였음을 보여준다. 이들 상보성 조합에 의한 CDC 효능 (도 14c)은 단일체로서 005-E345R 단일 돌연변이체 (향상체 (enhancer)) 항체에 대등하였다 (도 14b). 이와 대조적으로 비관련 항체 b12의 존재 하에, 005-E345R/K439E 및 005-E345R/S440K는 둘 모두 시험한 농도 계열에서 임의의 CDC를 거의 보이지 않았다 (도 14b에 제시된 단일체로서 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K에 대등함).

[1085] 농도 계열의 7D8-E345R/K439E 또는 7D8-E345R/S440K 항체를 고정된 농도의 3.3 μ g/mL 005 이중 돌연변이체 항체 (도 14b로부터 결정된 바와 같이 단일체로서 빈133 세포 상에 적지만 제한된 CDC를 보임)와 혼합하여 상보성 조합 7D8-E345R/K439E + 005-E345R/S440K 또는 7D8-E345R/S440K + 005-E345R/K439E를 제조하였다. 도 14d는 7D8 이중 돌연변이체 CD20 항체가 세포당 고작 몇 개의 7D8 이중 돌연변이체 항체 분자와 닮은, 심지어 시험한 최저 농도에서 각각 상보성 005-E345R/K439E 또는 005-E345R/S440K CD38 항체의 존재 하에 CDC를 매우 효율적으로 유도하였음을 보여준다. 상보성 K439E 및 S440K 돌연변이를 갖는 7D8 및 005 항체의 혼합물에 의한 관찰된 향상된 CDC에 대한 세포막 상에 증가된 Fc-테일 밀도의 기여를 제거하기 위해, 비-상보성 돌연변이를 갖는 항체 조합을 또한 시험하였다. 도 14d는 비-상보성 조합이 상보성 조합보다 덜 효율적인 Fc-Fc 상호작용의 결과로서 상보성 조합보다 훨씬 더 낮은 CDC 효능을 보였음을 보여준다.

[1086] 이들 데이터는 치료 항체에 의한 (향상된) CDC의 유도가 본 경우에 상이한 항원 특이성을 갖는 2개의 상보성 항

체의 혼합물에 동시에 결합하여 두 항원의 동시-발현을 요구함으로써 표적 세포 특이성을 증가시키는 세포에 제한될 수 있음을 제안한다.

[1087] 도 14a 및 14b에서 볼 수 있는 바와 같이, 7D8-E345R/K439E, 005-E345R/S440K, 7D8-E345R/S440K 및 005-E345R/K439E는 7D8-E345R 단독에 비해 제한된 CDC 효율을 보였다. 7D8-E345R/K439E 및 7D8-E345R/S440K의 혼합물이 단일체로서 야생형 7D8 항체에 비해 향상된 효율을 갖는 CDC를 가능하게 함이 추가로 보인다. 마찬가지로, 005-E345R/K439E 및 005-E345R/S440K의 혼합물이 단일체로서 야생형 005 항체에 비해 향상된 효율을 갖는 CDC를 가능하게 함이 관찰되었다 (데이터를 제시하지 않는다).

[1088] 실시예 17

[1089] 효율적인 CDC 활성화를 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한하는 CDC-억제성 돌연변이의 사용

[1090] 실시예 6에 설명된 바와 같이, CD20 항체 7D8 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 감소된 CDC 효율을 회복시켰다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, CD38 항체 005 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 억제된 CDC 효율을 회복시켰다. 관찰된 바와 같이, 단일 점 돌연변이는 Fc:Fc 계면의 마주보는 측면 상에 돌연변이되지 않은 아미노산과 Fc:Fc 상호작용을 파괴한다. Fc:Fc 계면의 마주보는 측면 상에 보완 돌연변이의 도입은 CDC 효율을 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 명백하게 독점적으로 두 돌연변이를 모두 함유하는 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한된다.

[1091] 또다른 예에서, CDC의 유도는 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한된다. CDC 유도를 치료적 CD20에 의해 또는 CD38 항체에 의해 독점적으로 결합된 세포에 제한하기 위해, CDC 억제성 돌연변이 K439E 및 S440K를 항체 7D8-K439E/S440K 또는 005-K439E/S440K에서 조합시킬 것이다. 이들 항체를 다음과 같이 비-표적 특이적 IgG의 부재 또는 존재 하에 CDC 실험에서 따로 첨가할 것이다. 0.1×10^6 개의 다우디 또는 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 또는 항체 혼합물 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$)과 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션 하였다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다.

[1092] 7D8-K439E/S440K는 야생형 7D8 항체와 유사한 효율로 CDC를 유도할 것으로 예상된다. 7D8-K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하면 상기 항체에 대한 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 마찬가지로, 005-K439E/S440K는 야생형 HuMAb 005와 유사한 효율로 CDC를 가능하게 할 것으로 예상된다. 005-K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하면 상기 항체에 대한 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다.

[1093] 실시예 18

[1094] 향상된 CDC 활성화를 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한하는 CDC-억제성 돌연변이의 사용

[1095] 실시예 6에 설명된 바와 같이, CD20 항체 7D8 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 감소된 CDC 효율을 회복시켰다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, CD38 항체 HuMAb 005 이중 돌연변이체 K439E/S440K는 K439E 또는 S440K 단일 점 돌연변이체에 의해 억제된 CDC 효율을 회복시켰다. 관찰된 바와 같이, 단일 점 돌연변이는 Fc:Fc 계면의 마주보는 측면 상에 돌연변이되지 않은 아미노산과 Fc:Fc 상호작용을 파괴한다. Fc:Fc 계면의 마주보는 측면 상에 보완 돌연변이의 도입은 CDC 효율을 회복시켰다. 따라서, 효율적인 CDC는 독점적으로 두 돌연변이를 모두 함유하는 항체로 이루어지는 항체 복합체에 명백하게 제한된다.

[1096] 또다른 예에서, CDC 유도의 향상은 독점적으로 치료상 투여된 항체로 이루어지는 항체 복합체에 제한된다. CDC 자극을 위해 이용된 Fc:Fc 상호작용을 자극하는 돌연변이의 스크리닝 및 선택에 의해, 관심있는 항원 표적에 대해 특이적이지 않은 혈청 항체와 CDC-유도성 항체 복합체를 형성할 수 있는 돌연변이를 확인할 수 있었다. 향상된 CDC 유도를 CD20의 복합체에 의해 또는 CD38 항체에 의해 독점적으로 결합된 세포에 제한하기 위해, CDC 향상 돌연변이 E345R을 항체 7D8-E345R/K439E/S440K 또는 005-E345R/K439E/S440K에서 CDC 억제성 돌연변이와 조합시킬 것이다. 이들 항체를 다음과 같이 비-표적 특이적 IgG의 부재 또는 존재 하에 CDC 실험에서 따로 첨가할 것이다. 0.1×10^6 개의 다우디 또는 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 또

는 항체 혼합물 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$)과 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅할 것이다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅할 것이다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시킬 것이다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가할 것이고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정할 것이다.

[1097] 7D8-E345R/K439E/S440K는 야생형 HuMAb 7D8에 비해 향상된 효율로 CDC를 유도할 것으로 예상된다. 7D8-E345R/K439E/S440K에 비-특이적 IgG를 첨가하면 야생형 7D8 항체에 비해 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다. 마찬가지로, 005-E345R/K439E/S440K가 야생형 005 항체에 비해 향상된 효율을 갖는 CDC를 가능하게 할 것으로 예상된다. 005-E345R/K439E/S440K에 비특이적 IgG를 첨가하면 야생형 005 항체에 비해 CDC 유도의 효율에 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다.

[1098] 실시예 19

[1099] CDC 검정에 의해 검출된 Fc:Fc 상호작용 매개된 항체 올리고머화를 자극하는 돌연변이를 확인하기 위해 돌연변이체 스크리닝 방안의 사용

[1100] 실시예 6 및 10에 설명된 바와 같이, 가변 수준의 항원을 발현하는 다수의 세포주 상에서 2개의 상이한 표적 항원, CD20 및 CD38을 인식하는 항체에 대한 CDC를 자극한 아미노산 돌연변이가 확인되었다. 놀랍게도, 단일 점 돌연변이 E345R은 Bin133 세포의 CDC-의존적 세포 용해가 야생형 IgG1 형식에서 CDC에 의해 이들 세포를 용해시키지 못한 항-CD38 항체 005에 적용되도록 하기에 충분한 것으로 입증되었다.

[1101] Fc:Fc 계면 상에 또는 그의 주변에서 다른 돌연변이는 유사한 양식으로 올리고머화 및 CDC를 자극할 수 있었다. 대안적으로, 돌연변이는 예를 들어 Fc:Fc 상호작용을 알로스테릭 방식으로 유도함으로써 올리고머화를 간접적으로 자극할 수 있었다.

[1102] 다른 아미노산 돌연변이가 Fc-매개된 항체 올리고머화를 자극할 수 있는지 결정하기 위해, 항-CD38 IgG1-005 돌연변이체의 라이브러리를 CDC 검정을 이용하여, 둘 모두 개별적으로 스크리닝하고, 예를 들어 Fc:Fc 계면을 가로질러 상호작용하는 아미노산 쌍을 선택하기 위해 짝을 이루는 방식으로 혼합하였다. 그러나, 동일한 전략을 다른 항체, 예컨대 또다른 IgG1 또는 IgG3 항체에 적용할 수 있다.

[1103] 표 15에 지시된 위치에서 돌연변이의 초점을 맞춘 라이브러리를 생성하였다. 퀵체인지 부위-지정 돌연변이 유발 키트 (스트라타젠, 미국)를 사용하여 돌연변이를 IgG1-005 Fc 영역 내로 도입하였다. 간단히 설명하면, 각각의 목적하는 돌연변이 위치에 대해, 목적하는 위치에서 축퇴성 코돈을 코딩하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여, IgG1m(f) 동종이형을 갖는 005 중쇄의 전장 플라스미드 DNA 주형을 복제하였다. 생성되는 DNA 혼합물을 DpnI을 사용하여 소화시켜 공급원 플라스미드 DNA를 제거하고, 이. 콜라이를 형질전환시키기 위해 사용하였다. 생성되는 콜로니를 모으고 배양하고, 플라스미드 DNA를 이들 풀 (pool)로부터 단리하고, 이. 콜라이 내로 재형질전환시켜 클로날 콜로니를 얻었다. 생성되는 콜로니로부터 단리한 돌연변이체 플라스미드 DNA를 DNA 서열결정에 의해 검토하였다 (엘지 게노믹스 (LGC genomics, 독일 베를린)). PCR에 의해 플라스미드 DNA로부터 발현 카세트를 증폭시키고, IgG1-005의 돌연변이체 중쇄 및 야생형 경쇄를 모두 함유하는 DNA 혼합물을 본질적으로 제조자가 설명한 바와 같이 293fectin (인비트로젠, 미국)을 사용하여 프리스타일 HEK293F 세포 (인비트로젠, 미국)에 일시적으로 형질감염시켰다. 항체 돌연변이체를 함유하는 형질감염된 세포의 상청액을 수집하였다. 돌연변이체 항체 상청액을 다음과 같이 둘 모두 개별적으로 및 짝을 이루는 혼합물로 CDC 검정에서 스크리닝하였다.

[1104] 0.1×10^6 개의 다우디 또는 Bin-133 세포 (라지 세포와 같은 다른 세포 종류를 사용할 수 있다)를 환자 96-웰 플레이트에서 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 비정제된 항체와 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 30 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (30% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1105] 표 16, 표 17 및 표 18에 기재된 돌연변이를 단일 돌연변이체로서 또는 다른 돌연변이체와 혼합될 때, 예를 들어 Fc:Fc 계면을 가로질러 돌연변이를 대면할 때 CDC 효율에 의해 검출될 때 올리고머화를 향상시키는 그의 능력에 대해 선택하였다. 임의로, 돌연변이를 Fc 도메인에 의해 매개된 FcRn, 단백질-A 또는 단백질-G 결합, ADCC, ADCP 또는 다른 이펙터 기능을 손상하지 않는 그의 능력에 대해 추가로 스크리닝할 수 있다. 상기 자극

성 점 돌연변이를 하나의 Fc 도메인 내로 조합하면 올리고머화 및 CDC 효율을 훨씬 더 자극할 수 있다.

- [1106] CD38 항체 005 내에 포함된 CH2-CH3 영역 내의 돌연변이를 다우디 세포 상에서 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 억제하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 돌연변이체 항체의 용해를 야생형 005에 비교하였고, 그에 대해 용해를 100%로 설정하였다. 억제에 대한 컷오프를 $\leq 66\%$ 용해로 설정하였다. 상기 방식으로 측정할 때, 대부분의 시험한 돌연변이는 CDC를 억제하였다 (표 16 참조).
- [1107] CD38 항체 005 내에 포함된 CH2-CH3 영역 내의 돌연변이를 빈133 세포 상에서 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 향상시키는 그의 능력에 대해 시험하였다 (표 17). 야생형 CD38 항체 005는 빈133 세포 상에서 CDC를 유도할 수 없다. $\geq 39\%$ 세포 용해를 보이는 돌연변이체를 향상성으로서 채점하였다. 완전히 예기치 않게, 아미노산 E345 및 E430의 실질적으로 모든 얻어진 치환이 CDC에 의한 세포 용해를 자극하였다. 상기 결과를 입증하기 위해, 아미노산 E345, E430 및 S440을 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 각각의 가능한 돌연변이로 치환하고, 새로운 인간 혈청 배치 (batch)를 사용하여 빈133 세포 상에서 CDC에 의해 결정할 때 올리고머화를 향상시키는 그의 능력에 대해 시험하였고, 다소 더 효율적인 용해를 얻었다 (표 18). 다시, E345 및 E430의 모든 치환은 빈133 세포의 효율적인 CDC를 유도하였다.
- [1108] 다음과 같은 바람직한 돌연변이는 빈133 세포의 $\geq 39\%$ 세포 용해를 유발하였다: P247G, I253V, S254L, Q311L, Q311W, E345A, E345C, E345D, E345F, E345G, E345H, E345I, E345K, E345L, E345M, E345N, E345P, E345Q, E345R, E345S, E345T, E345V, E345W, E345Y, D/E356G, D/E356R, T359R, E382L, E382V, Q386K, E430A, E430C, E430D, E430F, E430G, E430H, E430I, E430L, E430M, E430N, E430P, E430Q, E430R, E430S, E430T, E430V, E430W, E430Y, Y436I, S440Y 및 S440W.

1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG1-005 항체 점 들면면이의 존재 하에 다우더 세포의 용해 %. IgG1-005 아성형은 이들 조건 하에 세포의 66%를 용해시켰다. 또다를 아미노산으로 치환된 각각의 개별 위치를 바알 좌측 컬럼에 제공한다. 개별 위치의 수평 열에서 각각의 특정 위치에 대해 치환된 아미노산을 제공한 뒤에 측정된 용해 윌를 괄호 () 내에 나타낸다.

표 16

위치		A (42)	C (67)	D (91)	F (93)	G (95)	H (80)	I (89)	K (96)	L (13)	M (85)	N (78)	R (93)	S (93)	T (10)	V (9)	W (82)		
P247	A (17)	D (12)	K (13)	M (6)	N (5)	R (7)	S (6)	V (94)											
1253	E (14)	F (75)	G (100)	H (46)	I (93)	K (86)	L (99)	P (4)	T (8)	W (7)									
S254	K (6)	W (87)																	
H310	A (53)	C (72)	E (5)	F (90)	G (68)	H (72)	I (92)	K (93)	L (96)	N (53)	P (97)	R (87)	S (66)	T (54)	W (93)	Y (85)			
Q311	A (85)	C (91)	F (95)	G (86)	H (83)	I (96)	K (94)	L (98)	M (94)	N (97)	P (74)	R (98)	S (93)	T (82)	V (92)	W (95)	Y (95)		
E345	D/E356	G (88)	I (95)	L (94)	R (97)	T (97)	V (98)												
T359	G (88)	N (93)	P (87)	R (96)															
E382	F (3)	K (3)	L (99)	M (90)	P (3)	V (96)	W (3)												
G385	D (28)	H (9)	Q (24)	R (27)	S (14)	T (10)													
Q386	A (56)	C (18)	D (6)	E (9)	F (11)	G (10)	H (26)	I (42)	K (98)	L (15)	N (25)	P (6)	R (10)	S (43)	T (12)	V (53)	W (13)	Y (42)	
E430	A (97)	F (97)	G (99)	H (98)	L (95)	P (95)	Q (90)	R (96)	S (94)	V (98)									
M434	D (5)	E (5)	K (5)	R (5)	S (6)	W (98)													
Y436	I (98)	K (7)	L (10)	R (35)	S (8)	T (7)	W (6)												
Q438	E (5)	K (6)	S (5)	T (8)	W (10)	Y (31)													
K439	A (6)	D (5)	H (5)	L (5)	P (8)	T (4)	Y (7)												
S440	A (61)	C (10)	D (95)	E (24)	F (13)	G (40)	I (8)	N (33)	R (11)	T (28)	Y (98)								
K447	E (20)	*del(90)																	

* 여기서 "del"은 나타낸 위치에 아미노산 잔기의 결실이 존재하였음을 의미한다.

표 17

1.0 μg/ml IgG1-005 항체 점 돌연변이의 존재 하에 인-133 세포의 용해 %. IgG1-005 아형형은 이들 조건 하에 세포의 3%를 용해시켰다. 또다른 아미노산으로 치환된 각각의 개별 위치를 바랄 좌측 컬럼에 제공한다. 개별 위치의 수명 열에서 각각의 특정 위치에 대해 치환된 아미노산을 제공한 뒤에 측정된 용해 %를 괄호 () 내에 나타낸다.

위치		A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)		
P247	A (5)	C (5)	D (12)	F (16)	G (50)	H (11)	I (10)	K (14)	L (4)	M (13)	N (7)	R (10)	S (7)	T (4)	V (3)	W (9)			
1253	A (11)	D (9)	K (3)	M (3)	N (3)	R (4)	S (3)	V (51)											
S254	E (14)	F (10)	G (32)	H (2)	I (15)	K (12)	L (65)	P (2)	T (9)	W (9)									
H310	K (3)	W (13)																	
Q311	A (9)	C (4)	E (3)	F (19)	G (4)	H (6)	I (28)	K (16)	L (55)	N (6)	P (12)	R (18)	S (9)	T (3)	W (41)	Y (12)			
E345	A (57)	C (22)	F (48)	G (47)	H (49)	I (59)	K (42)	L (72)	M (67)	P (51)	R (64)	S (60)	T (53)	V (67)	W (52)	Y (70)			
D/E356	G (39)	I (31)	L (30)	R (64)	T (32)	V (13)													
T359	G (2)	N (3)	P (4)	R (40)															
E382	F (2)	K (2)	L (44)	M (21)	P (3)	V (53)	W (2)												
G385	D (5)	H (4)	N (18)	Q (4)	R (14)	S (4)	T (4)												
Q386	A (3)	C (4)	D (4)	E (4)	F (3)	G (3)	H (3)	I (4)	K (60)	L (3)	N (4)	P (2)	R (4)	S (3)	T (3)	V (3)	W (3)	Y (4)	
E430	A (54)	F (68)	G (55)	H (57)	L (58)	P (56)	Q (31)	R (39)	S (20)	V (53)									
N434	D (2)	E (2)	K (2)	R (2)	S (3)	W (18)													
Y436	I (49)	K (3)	L (4)	R (3)	S (3)	T (2)	W (3)												
Q438	E (3)	K (3)	S (2)	T (2)	W (2)	Y (2)													
K439	A (3)	D (2)	H (2)	L (2)	P (2)	T (2)	Y (4)												
S440	A (3)	C (3)	D (6)	E (2)	F (2)	G (3)	I (2)	N (2)	R (2)	T (3)	Y (64)								

卣 18

1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IgG1-005 항체 점 들은변인의 존재 하에 빈-133 세포의 용해 %. IgG1-005 아형형은 이들 조건 하에 세포의 12%를 용해시켰다. 또다른 아미노산으로 전환된 각각의 개별 위치를 바랄 적족 클럼에 제공한다. 개별 위치의 수평 열에서 각각의 특정 위치에 대해 전환된 아미노산을 제공한 뒤에 측정된 용해 %를 괄호 () 내에 나타낸다.

E4-5	A (94)	C (87)	D (76)	F (95)	G (95)	H (94)	I (93)	K (97)	L (94)	M (96)	N (93)	P (97)	Q (98)	R (94)	S (93)	T (92)	V (96)	W (93)	Y (94)
E4-10	A (95)	C (79)	D (91)	F (96)	G (96)	H (95)	I (96)	K (83)	L (94)	M (75)	N (95)	P (97)	Q (86)	R (92)	S (96)	T (97)	V (96)	W (98)	Y (97)
S4-0	A (12)	C (8)	D (41)	E (9)	F (7)	G (8)	H (26)	I (7)	K (6)	L (7)	M (8)	N (12)	Q (21)	R (9)	T (10)	V (7)	W (86)	Y (90)	

실시예 20

피하 B 세포 림프종 이종이식편 모델에서 IgG1-7D8-E345R의 생체내 효능

IGG1-7D8-E345R 항체의 생체내 항-종양 효능을 라지-luc #2D1 세포를 갖는 피하 모델에서 평가하였다. 이들 세포는 세포 당 ~300,000개의 CD20 분자 (QIFIKIT 분석에 의해 결정됨, 데이터를 제시하지 않는다) 및 높은 보체 방어 수용체 발현을 보인다. 세포를 10% 코스믹 송아지 혈청 (하이클론, 미국 유타주 로건), 페니실린 및 스트렙토마이신, 1% (v/v) 피루브산나트륨 및 1 μ g/mL 푸로마이신 (P-8833, 시그마 (Sigma, 네덜란드 컨드레츠))를 함유하는 RPMI 내에서 배양하였다. 세포를 로그기 (약 70% 융합도)에서 수거하였다. 6 내지 11주령 암컷 SCID 마우스 (C.B-17/IcrPrkdc-scid/CRL)를 이용하였다 (찰스-리버). 제0일에, 200 μ L PBS 중의 5x10⁶개의 라지-luc #2D1 세포를 각각의 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 발생을 캘리퍼스 (caliper) 측정에 의해 모니터링하였다. 평균 종양 용적이 100 mm³일 때 (약 제7일), 마우스를 군 (n = 9)으로 분류하고, 마우스당 50 μ g 항체의 단일 용량 (2.5 mg/kg)의 복강내 (i.p.) 주사에 의해 처리하였다. 모든 항체 샘플을 비관련 항체 b12로 보충하여 0.5 mg/mL의 총 항체 농도를 얻었다. 처리군을 표 18'에 제시한다. 처리 7일 후에, 정확한 항

체 투여를 검토하기 위해 인간 IgG 혈청 수준을 결정하기 위해 혈액 샘플을 얻었다. 종양을 1500 mm³의 종점 종양 용적까지, 종양이 궤양화를 보일 때 또는 중증 임상 징후가 관찰될 때까지 캘리퍼스 (PLEXX)를 사용하여 매주 적어도 2회 측정하였다.

<표 18'>

처리군 및 투여

군	항체	용량
1. 야생형	IgG1-7D8-WT	50 µg (= 2.5 mg/kg)
2. CDC-중진 돌연변이체	IgG1-7D8-E345R	50 µg (= 2.5 mg/kg)
3. 비관련 Ab 대조군	IgG1-b12	50 µg (= 2.5 mg/kg)

도 15a는 모든 군이 여전히 완전할 때 제22일에 평균 종양 성장을 보여준다. 야생형 항체 IgG1-7D8은 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 비해 종양 성장을 다소 억제하였지만, 이것은 통계상 유의하지 않았다. IgG1-7D8-E345R만이 음성 대조군 항체 IgG1-b12에 비해 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (일원 ANOVA 분석 p<0.01).

도 15b는 700 mm³보다 더 작은 종양 크기를 갖는 마우스의 백분율의 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 플롯을 보여준다. 음성 대조군 항체 IgG1-b12로 처리한 마우스에 비해, 종양 형성은 IgG1-7D8-E345R 항체로 처리한 마우스에서 유의하게 지연되었지만 (맨틀-콕스 (Mantel-Cox) 분석 p<0.01), 야생형 IgG1-7D8로 처리한 마우스에서는 그렇지 않았다.

이들 데이터는 E345R 돌연변이가 CD20 항체 7D8의 생체내 항-종양 효능을 향상시켰음을 보여준다.

실시예 21

피하 B 세포 림프종 모델에서 IgG1-005-E345R의 생체내 효능

IgG1-005-E345R 항체의 생체내 항-종양 효능을 라지-luc #2D1 세포를 갖는 피하 모델에서 평가하였다. 이들 세포는 세포 당 ~150,000개의 CD38 분자 (QIFIKIT 분석에 의해 결정됨, 데이터를 제시하지 않는다) 및 높은 보체 방어 수용체 발현을 보인다. 종양 접종 및 측정을 위한 프로토콜은 실시예 20에 설명된 바와 기본적으로 동일하다. 제0일에, 200 µl PBS 내의 5x10⁶개의 라지-luc #2D1 세포를 SCID 마우스의 우측 옆구리에 s.c. 주사하였다. 평균 종양 용적이 100 mm³일 때 (약 제7일), 마우스를 군 (n = 7)으로 분류하고, 마우스당 500 µg 항체의 단일 용량 (25 mg/kg)의 i.p. 주사에 의해 처리하였다. 처리군을 표 19에 제시한다. 주요 불편을 피하기 위해 1500 mm³의 종점 종양 용적까지 또는 종양이 궤양화를 보이거나 중증 임상 징후가 관찰될 때까지 종양을 측정하였다.

도 16a는 모든 군이 여전히 완전할 때 제21일에 평균 종양 성장을 보여준다. 야생형 항체 IgG1-005는 종양 성장을 다소 억제하였지만, 이것은 통계상 유의하지 않았다. IgG1-005-E345R만이 제21일에 비관련 항체 대조군에 비해 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (일원 ANOVA p<0.05).

도 16b는 500 mm³보다 더 작은 종양 크기를 갖는 마우스의 백분율의 카플란-마이어 플롯을 보여준다. 종양 형성은 음성 대조군 항체 IgG1-b12 (맨틀-콕스 분석 p<0.001) 또는 야생형 IgG1-005 (p<0.05)로 처리한 마우스에 비해 IgG1-005-E345R 항체로 처리한 마우스에서 유의하게 지연되었다.

이들 데이터는 CD38 항체 005 내에 E345R 돌연변이의 도입이 생체내 항-종양 활성을 향상시켰음을 보여준다.

표 19

처리군 및 투여

군	항체	용량
1. 야생형	IgG1-005-WT	500 µg (= 25 mg/kg)
2. CDC-중진 돌연변이체	IgG1-005-E345R	500 µg (= 25 mg/kg)
3. 비관련 Ab 대조군	IgG1-b12	500 µg (= 25 mg/kg)

실시예 22

- [1129] **일가 표적 결합은 E345R 항체의 CDC 효능을 추가로 향상시킨다**
- [1130] b12 결정 구조 내에서 관찰된 IgG1 육량체 고리의 분자 표면은 육량체 고리 내의 각각의 IgG에 대해, 2개의 C1q 결합 부위 중 하나는 고리 구조의 상향으로 대향하고 다른 부위는 하향으로 대향하고, 또한 각각의 항체의 하나의 Fab-아암은 위로 배향되고 하나는 아래로 배향하는 것으로 나타나, 항체당 단지 하나의 Fab-아암이 항원 결합에 참여하도록 하고, 이것은 육량체 항체 고리 내에 항체 분자당 일가 결합을 제안한다. 일가성은 항체를 육량체화 적합성 배향으로 항원 결합시킬 수 있다. 상기 가설을 시험하기 위해, E345R 돌연변이를 갖는 이중특이적 CD38/EGFR 항체의 CDC 효능을 CD38-양성, EGFR-음성 빈133 세포 (상기 이중특이적 항체는 여기에 CD38을 통해 단지 일가로 결합할 수 있다) 상에서 시험하고, 또한 E345R 돌연변이를 갖는 이가 결합 CD38 항체의 CDC 효능에 비교하였다. 인간 모노클로날 항체 HuMax-EGFr (2F8, WO 2004/056847에 기재됨)를 본 실시예에 설명된 EGFR 항체에 대한 기초로서 사용하였다.
- [1131] 이중특이적 항체를 듀오바디™ 플랫폼 (platform)에 따라, 즉, WO 2011/147986에 설명된 바와 같이 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환에 따라 시험관 내에서 생성하였다. 상기 방법에 대한 기초는 상보성 CH3 도메인의 사용이고, 이것은 특이적 검정 조건 하에 이중이량체 형성을 촉진한다. 상기 방법에 의한 이중특이적 항체의 생산을 가능하게 하기 위해, CH3 도메인 내에 특정 돌연변이를 보유하는 IgG1 분자를 생성하였다: 하나의 모 IgG1 항체 내에 F405L 돌연변이, 다른 모 IgG1 항체 내에 K409R 돌연변이. 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 이들 2개의 모 항체 (각각의 항체를 0.5 mg/mL의 최종 농도로)를 25 mM 2-머캅토에틸아민-HCl (2-MEA)와 함께 100 μ L TE의 총 부피로 37°C에서 90 min 동안 인큐베이션하였다. 제조자의 프로토콜에 따라 회전 (spin) 컬럼 (마이크로콘 (Microcon) 원심분리 필터, 30k, 밀리포어 (Millipore))을 사용하여 환원제 2-MEA를 제거할 때 환원 반응이 중단된다.
- [1132] CDC 검정을 위해, 0.1×10^6 개의 빈133 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 항체 (0.01 내지 10.0 μ g/mL)와 함께 100 μ L의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25 μ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ L 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [1133] 도 17은 예상된 바와 같이, E345R 돌연변이가 없는 CD38 항체 (야생형 IgG1-005 및 IgG-b12-K409R x IgG1-005-F405L)가 빈133 세포의 치사를 유도하지 않았음을 보여준다. 또한, EGFR-음성 빈133 세포에 결합하지 않는 (테이터를 제시하지 않음) EGFR 항체 IgG1-2F8-E345R/F405L은 예상된 바와 같이 CDC를 유도하지 않았다. K409R 돌연변이의 도입은 빈133 세포 상에서 ~60% 치사를 유도하는 (실시예 10에 설명됨) IgG1-005-E345R 항체의 능력에 영향을 미치지 않았다. 흥미롭게도, CD38-양성, EGFR-음성 빈133 세포에 단지 일가로 결합할 수 있는 이중특이적 CD38/EGFR 항체 IgG1-005-E345R/K409R x IgG1-2F8-E345R/F405L은 증가된 최대 CDC 치사 (~60% 내지 ~100% 치사)를 보였다.
- [1134] 이들 데이터는 일가 표적화가 CDC 향상 E345R 돌연변이를 함유하는 항체의 최대 치사 능력을 추가로 향상시킬 수 있음을 보여준다. 또한, 이들 데이터는 CDC 활성을 향상시킴으로써 측정할 때 E345R 올리고머화 향상 돌연변이가 다른 항체 형식, 예컨대 듀오바디에 적용될 수 있음을 보여준다.
- [1135] **실시예 23**
- [1136] **올리고머화 향상 E345R 돌연변이는 다른 항체 형식, 예컨대 듀오바디™에 적용될 수 있다**
- [1137] E345R 돌연변이의 효과를 듀오바디 형식의 이중특이적 항체에서 시험하였다. CDC 검정은 CD20-양성, CD38-양성 빈133 및 라지 세포 상에서 CD20/CD38 이중특이적 항체를 사용하여 수행하였다.
- [1138] 이중특이적 항체를 실시예 22에 설명된 바와 같이 생성하였다. CDC 검정을 위해, 0.1×10^6 개의 빈133 또는 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 항체 (0.01 내지 30.0 μ g/mL)와 함께 100 μ L의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25 μ L 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ L 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [1139] 도 18은 E345R 돌연변이의 도입이 빈133 (도 18a) 및 라지 (도 18b) 세포 상에서 이중특이적 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R 항체의 CDC를 향상시켰음을 보여준다. 이들 데이터는 E345R 올리고머화 향상 돌연변이가 CDC

활성을 향상시키기 위해 다른 항체 형식에 적용될 수 있음을 보여준다.

[1140] 실시예 24

E345R은 EGFR 항체 2F8에 의한 CDC를 회복하고, 이것은 일가 표적 결합에 의해 추가로 향상될 수 있다

실시예 6, 10 및 26에 설명된 바와 같이, E345R은 상이한 혈액학적 종양 표적 (CD20 및 CD38)을 인식하는 항체에 대한 CDC를 향상 또는 회복시켰다. 고형 종양 항원으로 분석을 확장하기 위해, EGFR 항체 2F8의 CDC 능력에 대한 E345R의 효과를 A431 표피유사 암종 세포 상에서 시험하였다. 또한, E345R-매개된 CDC 유도에 대한 일가 EGFR 표적화의 효과를 EGFR-양성, CD20-음성 A431 세포 상에서 이중특이적 EGFRxCD20 항체 (IgG1-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R)를 사용하여 시험하였다.

이중특이적 항체를 실시예 22에 설명된 바와 같이 생성하였다. CDC 검정을 위해, 5×10^6 개의 A431 세포/mL을 $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ 로 1h 동안 37°C 에서 표지하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고, 1×10^5 개의 세포/mL의 농도로 배지 내에 재현탁시켰다. 25,000개의 표지된 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 (3배 희석으로 0-30 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 50 μL 정상 인간 혈청 희석액을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (25% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 1h 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 원심분리하고 (300xg에서 3 min), 25 μL 상청액을 100 μL 마이크로신티 (microscint)에 백색 96 웰 옵티플레이트 (퍼킨엘머 (PerkinElmer))에서 첨가하고, 진탕기 (750 rpm) 상에서 15 min 동안 인큐베이팅하였다. ^{51}Cr 방출을 섬광 계수기 상에서 분당 계수 (cpm)으로서 결정하였다. 최대 용해 (100%)는 트리톤 X-100-처리된 세포의 상청액 내에서 측정된 ^{51}Cr 수준에 의해 결정하였다. 자발적 용해는 항체 없이 인큐베이팅한 세포의 상청액 내에서 측정된 ^{51}Cr 수준에 의해 결정하였다. 특이적 세포 용해는 다음 식에 따라 계산하였다: 특이적 용해 = $100 \times (\text{cpm 샘플} - \text{cpm 자발}) / (\text{cpm max} - \text{cpm 자발})$.

도 19는 IgG1-2F8-E345R/F405L은 CDC에 의해 A431 세포를 용해시킬 수 있지만, 야생형 2F8는 A431 세포를 치사시킬 수 없음을 보여준다. 이들 데이터는 CDC 활성이 E345R 돌연변이의 도입에 의해 EGFR 항체 2F8에서 회복될 수 있음을 보여준다. 이것은 잠재적으로 CDC 향상 E345R 돌연변이의 적용가능성을 고형 종양 항원을 표적으로 하는 항체로 확장시킨다.

이중특이적 EGFRxCD20 항체 IgG-2F8-E345R/F405L x IgG1-7D8-E345R/K409R은 EGFR-양성, CD20-음성 A431 세포 상에서 추가의 CDC 향상을 보였다.

이들 데이터는 일가성이 실시예 22에 기재된 CD38 결합 항체에 대해 가정된 Fc-Fc 상호작용의 형성 및 후속적인 CDC 유도를 용이하게 한다는 가설을 추가로 지지한다.

[1147] 실시예 25

E345R은 CD38 항체 003 및 CD20 항체 11B8 및 리톡시맵에 의한 CDC를 향상 또는 회복시킨다

실시예 6, 10 및 24에 설명된 바와 같이, E345R은 가변 수준의 항원을 발현하는 다수의 세포주 상에서 시험할 때 상이한 표적 특이성 (CD20, CD38 및 EGFR)을 갖는 몇몇 항체의 CDC 활성을 향상 또는 유도한다. 따라서, E345R 돌연변이의 도입은 기존의 항체에 대한 CDC를 향상 또는 회복시키기 위한 일반 메카니즘인 것으로 여기기에 이르렀다. 이를 추가로 지지하기 위해, CDC에 대한 E345R 돌연변이의 효과를 다우디 및 빈133 세포 상에서 가변 고유 CDC 효능을 갖는 더 많은 항체에 대해 시험하였다: WO 2006/099875에 기재된 CD38 항체 003 및 WO 2005/103081에 기재된 CD20 항체 리톡시맵 (타입 I) 및 11B8 (타입 II). CD20 항체는 2개의 하위군으로 나눌 수 있다 (Beers et al. Seminars in Hematology 47, (2) 2010, 107-114). 타입 I CD20 항체는 CD20 분자를 형질막 내에서 항체 Fc 영역을 클러스터링시키는 지질 래프트 (raft) 내로 재분포시키고 개선된 C1q 결합을 가능하게 함으로써 보체를 활성화시키고 CDC를 유발하는 현저한 능력을 나타낸다. 타입 II CD20 항체는 CD20 분포를 눈에 띄게 변화시키지 않고, 수반하는 클러스터링 없이, CDC에서 비교적 비효과적이다.

0.1×10^6 개의 다우디 또는 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 항체 (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 70 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 30 μL 정상 인간 혈청을 C1q의 공급원으로서 첨가하고 (30% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

- [1151] 도 20은 E345R 돌연변이가 (A) 다우디 세포 및 (B) 빈133 세포 모두에서 모든 처리된 항체에 대한 CDC를 향상시켰음을 보여준다. 흥미롭게도, 사용된 농도에서, 야생형 형식에서 CDC를 유도하지 않은 모든 항체가 E345R 돌연변이의 도입 후에 CDC를 효율적으로 유도하였다: CD38 mAb 003 및 CD20 타입 II mAb 11B8는 다우디 세포 상에서, CD38 mAb 005와 003 및 CD20 타입 II mAb 11B8는 빈133 세포 상에서. 이들 데이터는 보다 구체적으로 E345R 돌연변이의 도입에 의한 항체 올리고머화의 향상이 기존 항체에 의한 CDC를 향상 또는 회복시키는 일반 메카니즘임을 제안한다.
- [1152] **실시예 26**
- [1153] **E345R은 조직 인자 항체의 내재화를 향상시킨다**
- [1154] 향상된 올리고머화가 증가된 항체 내재화를 유도할 수 있는지 시험하기 위해, 리소좀 마커 LAMP1를 사용한 야생형 및 E345R 돌연변이된 조직 인자 (TF) 항체의 공존 연구를 공초점 현미경에 의해 수행하였다.
- [1155] SK-OV-3 세포를 유리 커버슬립 (coverslip) (두께 1.5 마이크론, 써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific, 독일 브라운슈바이크) 상에서 표준 조직 배양 배지 내에서 37℃에서 1일 동안 성장시켰다. 세포를 1시간 동안 50 µg/mL 류페틴 (시그마)과 함께 예비-인큐베이팅하여 리소좀 활성을 차단하고, 그 후 10 µg/mL 조직 인자 (TF) 항체 (WO 2010/066803)를 첨가하였다. 세포를 추가로 1, 3 또는 16시간 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 30분 동안 실온 (RT)에서 4% 포름알데히드 (클리니패스 (Klinipath))와 함께 인큐베이팅하였다. 슬라이드를 차단 완충제 (0.1% 사포닌 (로슈) 및 2% BSA (로슈)를 보충한 PBS)로 세척하고, 20 mM NH₄Cl을 함유하는 차단 완충제와 함께 20분 동안 인큐베이팅하여 포름알데히드를 켄칭시켰다. 슬라이드를 차단 완충제로 다시 세척하고, 45분 동안 RT에서 리소좀 LAMP1을 확인하기 위해 마우스-항-인간 CD107a-APC (비디 파밍겐 (BD Pharmingen)) 및 TF 항체를 확인하기 위해 염소-항-인간 IgG-FITC (잭슨)의 카테일과 함께 인큐베이팅하였다. 슬라이드를 차단 완충제로 다시 세척하고, 20 µl 봉입 매질 (6 g 글리세롤 (시그마) 및 2.4 g 모위올 (Mowiol) 4-88 (옵니레보 (Omnilabo))을 12 mL 0.2M Tris (시그마) pH 8.5를 첨가한 후 10 min 동안 50-60℃에서 인큐베이팅한 6 mL 증류수에 용해시키고; 봉입 매질을 분취하고 -20℃에서 저장하였다)를 사용하여 현미경 슬라이드 상에 밤새 봉입하였다. 슬라이드를 63x 1.32-0.6 오일 유침 (oil immersion) 대물 렌즈 및 LAS-AF 소프트웨어가 장착된 레이카 (Leica) SPE-II 공초점 현미경 (레이카 마이크로시스템즈 (Leica Microsystems))을 사용하여 영상화하였다.
- [1156] 12-비트 그레이스케일 (grayscale) TIFF 영상을 메타몰프 (MetaMorph)[®] 소프트웨어 (버전 메타 시리즈 (Meta Series) 6.1, 몰레큘라 디바이시스 인크. (Molecular Devices Inc., 미국 캘리포니아 서니베일))를 이용하여 공존에 대해 분석하였다. 영상을 스택 (stack)으로서 가져오고, 배경을 공제하였다. 동일한 역치 환경을 모든 FITC 영상 및 모든 APC 영상에 대해 사용하였다 (수동으로 설정하였다). 공존을 관심있는 영역 (ROI) 내의 FITC의 픽셀 강도로서 도시하였고, ROI는 모든 APC 양성 영역으로 이루어진다. 상이한 TF 항체로 염색된 상이한 슬라이드를 비교하기 위해, 영상을 APC의 픽셀 강도를 이용하여 표준화하였다. 마우스-항-인간 CD107a-APC를 사용하여 리소좀 마커 LAMP1 (CD107a)를 염색하였다. LAMP1의 픽셀 강도는 영상화한 다양한 TF 항체 사이에 상이하지 않아야 한다.
- [1157] FITC 및 APC의 공존에 대한 표준화된 값은 식 $[(TPI\ FITC \times \text{공존 } \%) / 100] \times [1 / TPI\ APC]$ 에 따른 임의 단위 (arbitrary unit)로서 표현된다.
- [1158] $\text{공존 } \% = APC\ \text{픽셀과 공존하는 } TPI\ FITC / TPI\ APC$
- [1159] TPI, 총 픽셀 강도
- [1160] 도 21는 APC-표지된 리소좀 마커와 겹치는 야생형 및 E345R 돌연변이된 TF 항체의 FITC 픽셀 강도의 양을 도시한다. 시험한 각각의 항체 또는 조건에 대해, ~1, 3 또는 >5 셀을 함유하는 하나의 슬라이드로부터 3개의 상이한 영상을 분석하였다. 각각의 슬라이드 내에서 상이한 영상 사이에서 변동이 관찰되었다. 여전히, 항체 011 및 098에 대한 E345R 돌연변이가 야생형 011 및 098에 비해 1시간 인큐베이션 후에 증가된 리소좀 공존을 일으켰음은 명백하였다. 이들 결과는 돌연변이 E345R이 보다 신속한 내재화 및 리소좀 공존을 유도하고 따라서 항체 약물 접합체를 강화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [1161] **실시예 27**
- [1162] 유사한 CD20 발현을 갖지만 상이한 수준의 막-결합형 보체 조절 단백질을 갖는 상이한 B 세포주에서 리톡시맙

내에 E345R 돌연변이에 의해 향상된 CDC

- [1163] 실시예 25 및 28은 다우디 및 빈133 세포에 대한 야생형 리톡시맙의 CDC 효능이 E345R 돌연변이를 도입함으로써 향상되었음을 보여준다. 상기 향상된 CDC 효능은 Fc-Fc 상호작용의 E345R-매개된 안정화로부터 기인한다. 이어서, 표적 세포막 상의 수반하여 형성된 육량체 항체 고리 구조는 세포막에 가까운 활성화된 보체 성분의 포획 및 농축을 용이하게 함으로써 막 공격 복합체의 효율적인 생성을 촉진할 수 있다. 상기 효율적인 보체 활성화의 결과로서, 막-결합형 보체 조절 단백질 (mCRP)의 억제 효과는 부분적으로 극복될 수 있다. mCRP, 예컨대 CD55, CD46 및 CD59의 과다발현은 모노클로날 항-중양 항체를 사용한 성공적인 면역요법에 대한 장벽으로서 여겨진다 ([Jurianz et al., Mol Immunol 1999 36:929-39]; [Fishelson et al. Mol Immunol 2003 40: 109-23], [Gorter et al., Immunol Today 1999 20: 576-82], [Zell et al., Clin Exp Immunol. 2007 Dec 150(3): 576-84]). 따라서, 리톡시맙-E345R의 효능을 상이한 수준의 mCRP CD46, CD55 및 CD59를 갖지만 대등한 수준의 CD20 표적 발현을 갖는 일련의 B 세포주 상에서 야생형 리톡시맙에 비교하였다.
- [1164] B 세포주 다우디, WIL2-S, WSU-NHL, MEC-2 및 ARH-77은 QIFIKIT 분석에 의해 결정할 때 대등한 양의 CD20 분자 (~250,000 특이적 항체-결합 능력 - sABC)를 발현한다 (데이터를 제시하지 않음). 이들 세포주 사이의 보체 조절 단백질의 발현 수준을 비교하기 위해, QIFIKIT 분석을 수행하여 CD46 (마우스 항-인간 CD46, CBL488, 클론 J4.48 케미콘 (Chemicon)), CD55 (마우스 항-인간 CD55, CBL511, 클론 BRIC216, 케미콘), 및 CD59 (마우스 항-인간 CD59, MCA1054x, 클론 MEM-43, 세로텍 (Serotec))의 수준을 결정하였다.
- [1165] CDC 검정을 위해, 0.1×10^6 개의 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 포화 항체 농도 계열 (4배 희석으로 0.002-40.0 $\mu\text{g/mL}$)과 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다. 최대 CDC-매개된 치사는 그래프패드 프리즘 5에서 비-선형 피트의 최상-피트 (best-fit) 값의 상단을 이용하여 2회의 독립적인 실험으로부터 계산하였다.
- [1166] 도 22a-d는 야생형 리톡시맙에서 E345R의 도입은 모든 시험한 B 세포주에 대해 증가된 최대 용해 및 감소된 EC_{50} 에 의해 관찰된 바와 같이 향상된 CDC 효능을 일으켰음을 보여준다.
- [1167] 도 22e는 리톡시맙-E345R 돌연변이체에 의해 유도된 최대 CDC-매개된 치사가 막-결합형 보체 조절 단백질의 발현 수준에 무관하게 야생형 리톡시맙보다 항상 더 높음을 보여준다. 이들 데이터는 중양 세포가 E345R 함유 항체에 의한 항체-매개된 보체 공격을 피하는데 덜 효과적이므로, E345R의 도입이 모노클로날 항체의 치료 가능성을 향상시킴을 나타낸다.
- [1168] 실시예 28
- [1169] 야생형 및 E345R 항체에 대한 CDC 동역학의 비교
- [1170] Fc:Fc 상호작용 안정화 E345R 돌연변이의 도입은 실시예 6 (다우디 및 라지 상에서 CD20 항체 7D8), 실시예 10 (다우디, 라지 및 빈 133 상에서 CD38 항체 005) 및 실시예 25 (다우디 및 빈133 상에서 CD38 항체 003 및 CD20 항체 리톡시맙 및 11B8)에 기재된 상이한 세포주 상에서 상이한 항체에 대한 감소된 EC_{50} 값 및 증가된 최대 용해에 의해 관찰된 바와 같이 CDC를 향상 또는 회복하는 것으로 나타났다. 이어서, 야생형 및 E345R 항체 사이의 CDC 효능의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.
- [1171] 0.1×10^6 개의 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 포화 농도 (10.0 $\mu\text{g/mL}$)의 항체와 함께 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 0 내지 60 min 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [1172] 도 23a는 야생형 CD20 항체 IgG1-7D8이 라지 세포의 80%의 최대 CDC-매개된 치사를 보였음을 보여주고, 이것은 시험된 조건 하에 5 min 후에 이미 도달되었다. 그러나, IgG-7D8-E345R에 대해, 라지 세포의 80% 치사는 훨씬 더 빨리 3 min 후에 관찰되었다. IgG-7D8-E345R에 의한 최대 용해 (95%)는 또한 5분 후에 도달되었다.
- [1173] 도 23b는 또한 사용된 라지 세포 상에서 CDC를 유도하기 위해 7D8보다 덜 강력한 야생형 CD20 항체 리톡시맙에 대해, E345R 돌연변이의 도입이 표적 세포의 보다 빠른 치사를 일으켰음을 보여준다. 야생형 리톡시맙은 32%의

최대 CDC-매개된 치사를 보였고, 이것은 20분 후에 도달하였다. 리톡시맵-E345R은 대략 3분 후에 이미 32% 치사에 도달하였고, 특히, 리톡시맵-E345R에 의한 최대 용해 (85%)는 또한 20분 후에 도달하였다.

[1174] 도 23c+d는 야생형 CD38 항체 IgG1-003 및 IgG1-005에 의한 CDC-매개된 치사에 대해 내성인 사용된 라지 세포가 E345R 돌연변이를 도입함으로써 빠르게 치사될 수 있었음을 보여준다. IgG1-003-E345R 및 IgG1-005-E345R은 5 min 후에 이미 최대 CDC (각각 50% 및 60%)를 보여주었다.

[1175] 요약하면, E345R 항체는 그의 야생형 상대물보다 더 강력하고, 이것은 보다 큰 효능 (보다 낮은 EC_{50}), 증가된 최대 용해 및 CDC 반응의 보다 빠른 동역학의 조합으로부터 기인한다.

[1176] **실시예 29**

[1177] **E345R 돌연변이가 있거나 없는 이중특이적 항체에 대한 CDC 동역학의 비교**

[1178] 실시예 23에서, E345R 돌연변이가 듀오바디 플랫폼에 의해 생성된 CD38xCD20 이중특이적 항체 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R에 적용될 수 있어서, 라지 및 빈133 세포에 대한 CDC 검정에서 감소된 EC_{50} 에 의해 관찰된 바와 같이 향상된 치사 능력을 일으키는 것이 설명된다. 이어서, E345R이 있는 및 없는 CD38xCD20 이중특이적 항체 사이의 CDC 효능의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.

[1179] 0.1×10^6 개의 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 포화 농도 ($10.0 \mu\text{g/mL}$)의 항체와 함께 $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, $25 \mu\text{L}$ 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 0 내지 60 min 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. $10 \mu\text{L}$ 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1180] 도 24는 이중특이적 항체 IgG1-005-F405L x IgG1-7D8-K409R이 83%의 최대 CDC-매개된 치사를 유도하였음을 보여주고, 이것은 10분 후에 도달되었다. E345R의 도입은 IgG1-005-E345R-F405L x IgG1-7D8-E345R-K409R (98%)에 의해 증가된 최대 치사를 야기하였고, 이것은 이미 2분 후에 도달되었다. 이들 데이터는 이중특이적 항체 내에 Fc-Fc 안정화 E345R 돌연변이를 도입하면 표적 세포의 CDC-매개된 치사를 가속화시킨다는 것을 나타낸다.

[1181] **실시예 30**

[1182] **E345R이 있는 및 없는 일가 결합 항체에 대한 CDC 동역학의 비교**

[1183] 실시예 22는 일가 표적 결합이 CD38-양성, EGFR-음성 빈133 세포 상에서 CD38xEGFR 이중특이적 항체를 사용하여 증가된 최대 용해에 의해 관찰된 바와 같이 E345R 항체의 CDC 효능을 추가로 향상시켰음을 보여준다. 이어서, E345R이 있는 및 없는 일가 결합 항체 사이의 CDC-매개된 치사 능력의 차이를 추가로 설명하기 위해 CDC 반응의 동역학을 분석하였다.

[1184] E345R 돌연변이가 있거나 없는 이중특이적 CD38xEGFR 및 CD20xEGFR 항체를 실시예 22에 설명된 바와 같이 듀오바디 플랫폼에 따라 시험관 내에서 생성하였다. CD38xEGFR 이중특이적 항체의 CDC 효능을 CD38-양성, EGFR-음성 라지 세포 상에서 시험하였고, 여기에 이중특이적 항체는 CD38을 통해 단지 일가로 결합할 수 있다. 0.1×10^6 개의 라지 세포를 환저 96-웰 플레이트에서 포화 농도 ($10.0 \mu\text{g/mL}$)의 항체와 함께 $100 \mu\text{L}$ 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. 이어서, $25 \mu\text{L}$ 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 0 내지 60 min 사이의 상이한 기간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. $10 \mu\text{L}$ 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1185] 도 25는 이중특이적 항체 CD38xEGFR (IgG1-005-K409R x IgG1-2F8-F405L)이 55%의 최대 CDC-매개된 치사를 유도하였음을 보여주고, 이것은 대략 10분 후에 도달되었다. E345R의 도입은 증가된 최대 치사 (96%)를 일으켰고, 이것은 5분 내에 이미 도달되었다.

[1186] 도 25는 이중특이적 항체 CD20xEGFR (IgG1-7D8-K409R x IgG1-2F8-F405L)이 85%의 최대 CDC-매개된 치사를 유도하였음을 보여주고, 이것은 대략 5분 후에 도달되었다. 그러나, 도입된 E345R을 갖는 CD20xEGFR 항체를 사용할 때, 85% 용해는 2분 후에 보다 빨리 관찰되었다. E345R CD20xEGFR 항체에 의한 최대 용해 (97%)는 또한 5분 후에 도달되었다.

[1187] 요약하면, 이들 일가 결합 항체 내에 E345R 돌연변이의 도입은 보다 강력한 항체를 생성시켰고, 이것은 증가된

최대 용해 및 CDC 반응의 보다 빠른 동역학의 조합으로부터 기인한다.

[1188] 실시예 31

[1189] 치료 항체 및 E345R/Q386K 항체의 조합에 의한 CDC

[1190] 실시예 19에 설명된 바와 같이, IgG1-005로부터 유래한 돌연변이체 CD38 항체는 야생형 항체의 E345 위치가 글루타메이트 (E) 이외의 임의의 아미노산으로 치환될 때 빈133 세포 상에 효율적인 CDC를 유도할 수 있다. 이것은 CDC의 전체 조건인 올리고머화가 항체의 위치 345에서 글루타메이트 측쇄의 존재에 의해 방해된다는 것을 제안한다. 하나의 Fc 상의 E345는 육량체 항체 고리 구조 내에서 대면하는 제2 Fc 모이어티 상의 Q386에 밀접하게 근접하므로, 제1 항체에서 올리고머화의 E345-매개된 방해는 가능하게는 제2 항체의 Q386 위치에서 치환에 의해 제거될 수 있다. 이어서, 이것은 두 항체가 조합되는 경우에 제1 항체 내의 E345가 제2 항체 내의 돌연변이된 386 위치와 보다 양호하게 상호작용할 수 있도록 할 것이다. 상기 가설을 시험하기 위해, 빈133에 대해 CDC 검정을 수행하였고, 여기서 야생형 항체 (IgG1-003, IgG1-005 또는 IgG1-11B8)을 예로서 IgG1-005-E345R/Q386K 또는 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G와 혼합하였다.

[1191] 0.1×10^6 개의 빈133 세포를 환자 96-웰 플레이트에서 농도 계열의 비정제된 IgG1-005-E345R/Q386K, IgG1-005-E345R/Q386K/E430G 또는 대조군 항체 (3.33배 희석으로 0.0001-20.0 $\mu\text{g/mL}$)와 함께 1.0 또는 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 야생형 IgG1-003, IgG1-005 또는 IgG1-11B8 항체의 존재 또는 부재 하에 100 μL 의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이션하였다. 이어서, 25 μL 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 μL 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.

[1192] 도 26a/b/c는 CD38 항체 IgG1-005-E345R/Q386K가 빈133 세포의 CDC-매개된 용해를 용량-의존 방식으로 유도하였음을 보여준다 (파선). IgG1-005-E345R/Q386K를 1 또는 10 $\mu\text{g/mL}$ 야생형 CD38 항체 IgG1-003 (도 26a) 또는 야생형 CD20 항체 IgG1-11B8 (도 26b)과 조합하면 증가된 최대 세포 용해를 일으켰다. IgG1-005-E345R/Q386K를 야생형 IgG1-005와 조합하면 가능하게는 결합 부위에 대해 경쟁함으로써 CDC를 용량-의존 방식으로 억제하였다 (도 26c).

[1193] 도 26d/e/f는 CD38 항체 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G에 대한 유사한 결과를 보여준다.

[1194] 이들 데이터는 야생형 항체 IgG1-003 및 IgG1-11B8이 IgG1-005-E345R/Q386K 또는 IgG1-005-E345R/Q386K/E430G와 조합될 때 항체 올리고머화 및 CDC 활성화에 참여함을 나타낸다. 상기 조합에서, 야생형 항체 내에 존재하는 E345-위치에 의한 올리고머화의 방해는 적어도 부분적으로, 돌연변이체 항체에서 Q386K 치환에 의해 제거될 수 있다. 상기 적용은 E345 위치에서 야생형인 항체, 예컨대 리톡시맵, 오파투무맵, 다라투무맵 또는 트라스투주맵을 사용한 요법을 개선하기 위해 특히 흥미롭다. 또한, 그러한 올리고머화-유도성 항체는 종양 세포 또는 세균과 같은 표적 세포에 대해 작용성인 환자-자신의 항체와의 세포-결합된 복합체의 형성을 촉진할 수 있다.

[1195] 실시예 19는 돌연변이 시에 CDC를 향상시키는, E345에 추가의 다수의 아미노산, 예를 들어 E430 및 S440을 설명하고, 여기서 특이적 돌연변이는 CD38 항체 IgG1-005에 포함될 때 빈133 세포 상에서 효율적인 CDC를 유도하였다. I253 및 Y436 돌연변이체를 제외하고는, 확인된 올리고머화-증진성 돌연변이는 육량체 고리 구조에서 대면하는 제2 Fc 모이어티 상의 돌연변이되지 않은 아미노산에 접촉한다. 따라서, 확인된 올리고머화-증진성 돌연변이 (둘 모두 단독으로 또는 조합으로)는 또한 돌연변이되지 않은 항체와의 올리고머화를 촉진하는 것으로 예상할 수 있고, 그러한 돌연변이체의 추가의 최적화는 실시예 19에서 적용된 것과 유사한 선택 전략에 의해 달성할 수 있다.

[1196] 실시예 32

[1197] E345R은 IgG2, IgG3 및 IgG4 항체 이소형에서 CDC를 유도하였다

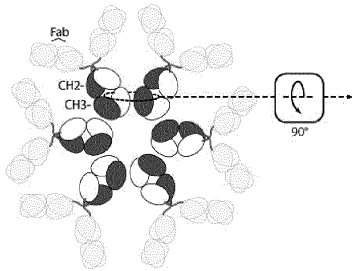
[1198] 올리고머화-촉진 돌연변이의 도입이 비-IgG1 항체 이소형의 CDC 활성을 자극할 수 있는지 시험하기 위해, 당업계에 공지된 방법에 의해 인간 IgG2, IgG3 또는 IgG4의 불변 도메인을 갖는 CD38 항체의 이소형 변이체 IgG1-005를 생성하여, IgG2-005, IgG3-005 및 IgG4-005를 얻었다. 또한, 올리고머화 향상성 E345R 돌연변이를 이들 모든 항체 내에 도입하여, IgG2-005-E345R, IgG3-005-E345R 및 IgG4-005-E345R을 얻었다. 유사한 방식으로, 또한 CD38 항체 IgG1-003으로부터 IgG2-003 및 IgG2-003-E345R을 생성하였다. 상이한 이소형의 CDC 효능을 시험관내 CDC 검정으로 비교하였다.

- [1199] 0.1 x 10⁶개의 빈133 세포를 환자 96-웰 플레이트에서 10 µg/mL 비정제된 항체와 함께 100 µl의 총 부피로 15 min 동안 진탕기 상에서 RT에서 예비-인큐베이팅하였다. IgG1-005-E345R을 3.0 µg/mL로 첨가하였다. 이어서, 25 µl 정상 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고 (20% 최종 농도), 37°C 인큐베이터 내에서 45 min 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 얼음 상에 놓음으로써 반응을 중지시켰다. 10 µl 프로피듐 요오다이드를 첨가하고, 세포 용해를 FACS에 의해 결정하였다.
- [1200] 도 27은 IgG2-005, IgG2-003, IgG3-005 및 IgG4-005가 시험된 조건 하에 (A) 다우디 또는 (B) 빈133 세포를 효율적으로 용해할 수 없었음을 보여준다 (관찰된 ~20% 용해는 배경으로 고려되었다). E345R 돌연변이의 도입은 시험한 모든 IgG 이소형에 의해 다우디 세포 상에 강력한 CDC를 가능하게 하였다. 이들 결과는 IgG3-005-E345R은 다른 이소형 변이체에 비해 제한된 CDC 활성을 나타내긴 했지만 빈133 세포 상에서 CDC를 이용하여 확인되었다. 이들 데이터는 IgG1 이외에, 올리고머화 향상성 돌연변이, 예컨대 E345R이 또한 IgG2, IgG3 및 IgG4 항체의 CDC 활성을 촉진하도록 적용될 수 있음을 나타낸다.
- [1201] **실시예 33**
- [1202] **환자-유래 CD38-양성 B 세포 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포 상의 생체의 CDC 검정에서 IgG1-005 및 IgG1-005-E345R에 의한 CDC.**
- [1203] CLL 환자 샘플로부터 냉동보관된 1차 세포를 CDB-IDIBAPS-Hospital Clinic (엘리아스 캄포 박사 (Dr. Elias Campo, Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, 스페인 바르셀로나))의 혈액병리학 바이오뱅크 (biobank)로부터, 또는 National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) (아드리안 위스트너 박사 (Dr. Adrian Wiestner, NHLBI, Hematology Branch of the National Institutes of Health (NIH), 미국 매릴랜드주 베데스다))에 의한 임상 연구로부터 얻었다. 병원 임상 연구 윤리 위원회 (Institutional Ethics Committee of the Hospital Clinic (스페인 바르셀로나)) 또는 NIH의 연구 심사 위원회 (Institutional Review Board of the NIH) 및 헬싱키 선언 (Declaration of Helsinki)에 따라 모든 환자로부터 고지에 의한 동의서를 받았다. 모든 샘플을 유전적으로 및 면역표현형에 의해 특성화하였다.
- [1204] CLL 샘플을 FACS에 의해 결정할 때 그의 CD38 발현에 따라 2개의 군으로 분류하였다: 5개의 샘플은 CD38 높은 군 (다우디 세포 상에서 CD38 발현의 50% 내지 98%)에 포함되고, 4개의 샘플은 CD38 낮은 군 (다우디 세포 상에서 CD38 발현의 0.5% 내지 3%)에 포함되었다.
- [1205] 형광 표지된 CLL 세포 (5 µM 칼세인 AM으로 표지함)를 농도 계열의 항체 (10배 희석으로 0.01-10 µg/mL)와 함께 인큐베이팅하였다. 이어서, 정상 인간 혈청을 항체-오프소닌 처리된 세포 (100,000 세포/웰)에 보체의 공급원으로서 첨가하고 (10% 최종 농도), 45 min 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 상청액을 회수하고, 세포 용해에 대한 척도로서 형광을 시너지 (Synergy)TM HT 형광계에서 관독하였다. 세포 치사는 다음과 같이 계산하였다: 특이적 용해 = 100 x (샘플 - 자발적 용해)/(최대 용해 - 자발적 용해), 여기서 최대 용해는 1% 트리톤으로 처리한 세포의 샘플에 의해 결정되고, 자발적 용해는 세포를 항체 없이 10% NHS의 존재 하에 인큐베이팅한 경우에 샘플로부터 결정된다.
- [1206] 도 28은 IgG1-005-E345R이 야생형 IgG1-005에 비해 높은 CD38 발현을 갖는 CLL 1차 세포 및 낮은 CD38 발현을 갖는 CLL 1차 세포 모두에서 CDC 효능을 강하게 향상시킨 것을 보여준다.
- [1207] **균등론**
- [1208] 당업자는 단지 일상 실험만을 이용하여 본원에서 설명되는 발명의 구체적인 실시양태의 많은 균등물을 알거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등물은 다음 청구항에 포함되는 것으로 의도된다. 종속 청구항에 개시된 실시양태의 임의의 및 모든 조합은 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

도면

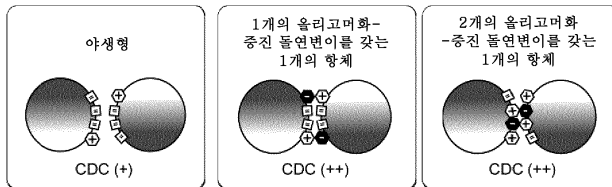
도면1a

육량체 형성시의 IgG 분자



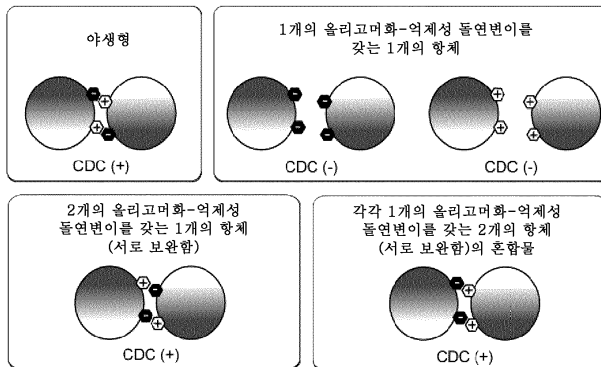
도면1b

CDC에 대한 올리고머화-중진 돌연변이의 관찰된 효과



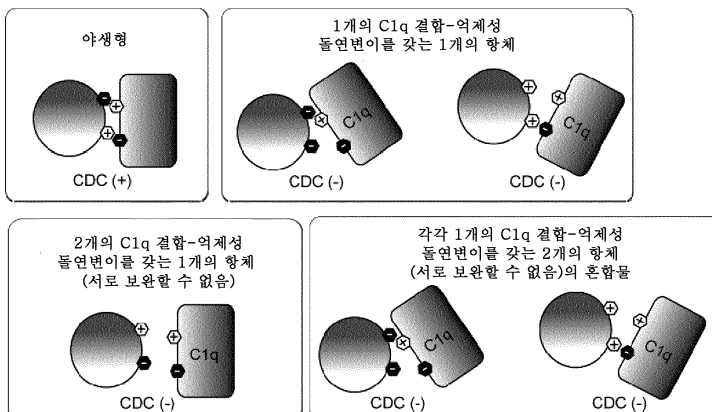
도면1c

CDC에 대한 올리고머화-억제성 돌연변이의 관찰된 효과



도면1d

CDC에 대한 C1q 결합-억제성 돌연변이의 이론적 효과



도면2

IgG1 247 PKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVSL 306
IgG1f 247 PKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVSL 306
IgG2 247 PKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVFQNWYDVGVEVHNAKTKPREEQNFSTRVSVSL 306
IgG3 247 PKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVFQKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVSL 306
hgG4 247 PKDTLMISRPEVTCVVVDVSQEDPEVFQNWYDVGVEVHNAKTKPREEQFNSRYRVSVSL 306

*****:*****
*****:*****

[illegible]

IgG1	367	CLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	426
IgG1f	367	CLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	426
IgG2	367	CLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS	426
IgG3	367	CLVKGFYPSDIAVWESGGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFS	426
hgG4	367	CLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS	426

IgG1 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
IgG1f 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
IgG2 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
IgG3 427 VMHEALHNRYTQKSLSLSPGK 447
hgG4 427 VMHEALHNHYTQKSLSLSGK 447

*****:*****

IgG1 = Uniprot 수탁번호 P01857의 aa 130 내지 330
IgG1f = IgG1 동종이형 변이체 "f"
IgG2 = Uniprot 수탁번호 P01859의 aa 126 내지 326
IgG3 = Uniprot 수탁번호 P01860의 aa 177 내지 377
IgG4 = Uniprot 수탁번호 P01861의 aa 127 내지 327

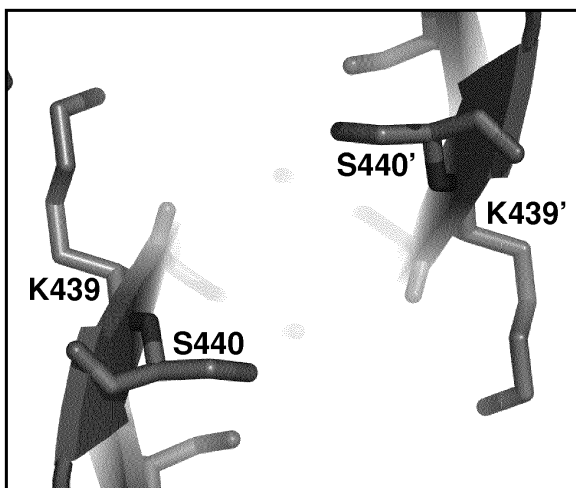
도면 3a

[illegible]

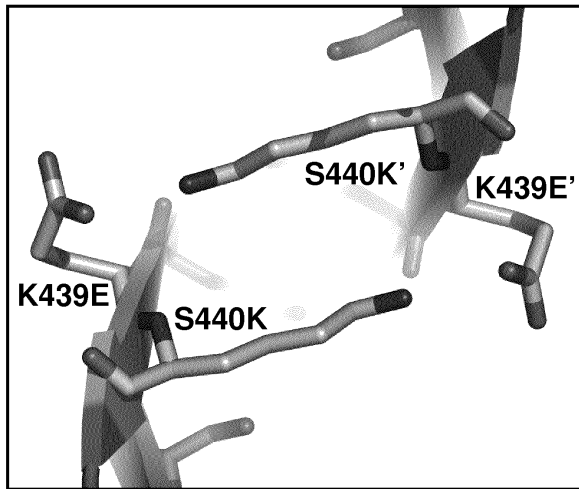
도면 3b

[illegible]

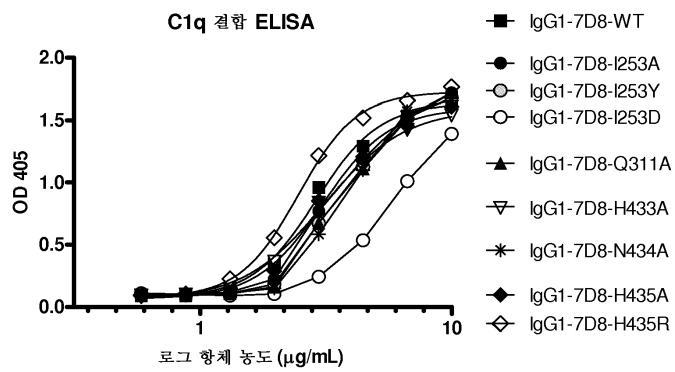
도면4



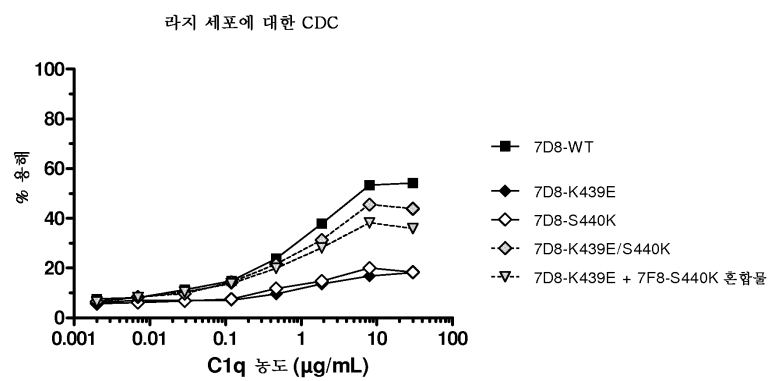
도면5



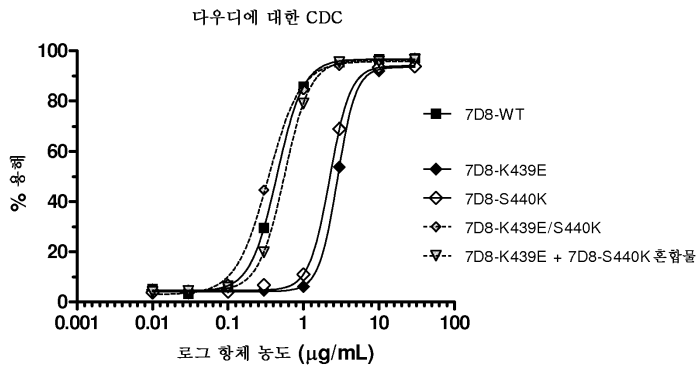
도면6



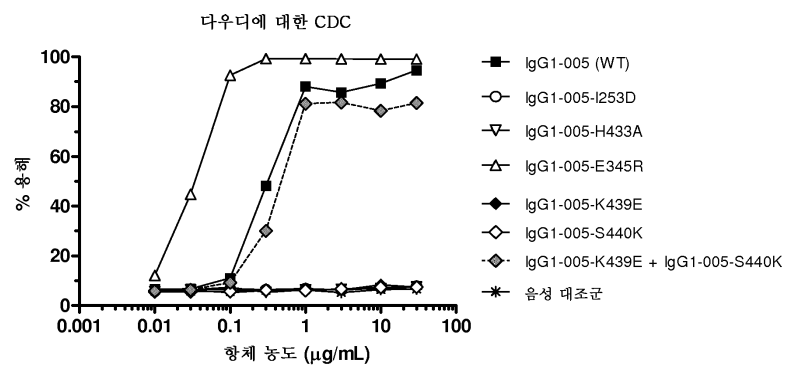
도면7



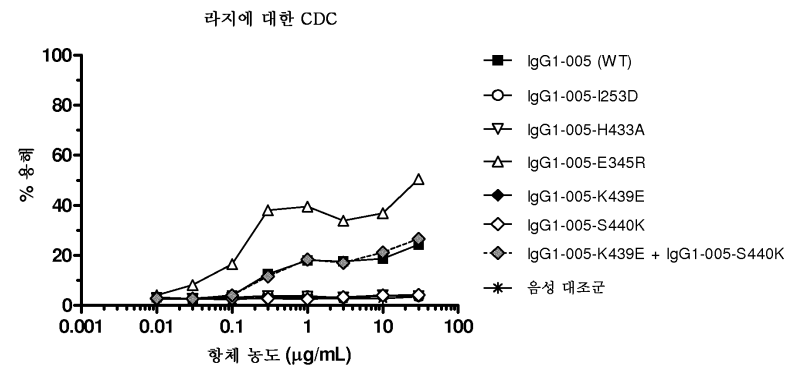
도면8



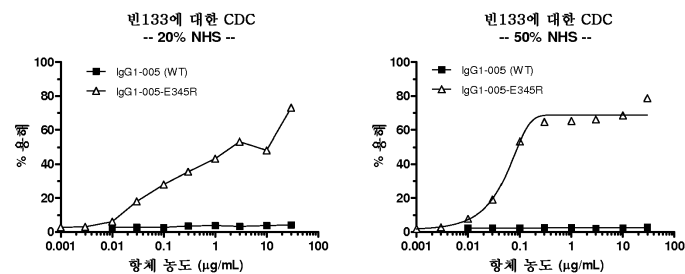
도면9a



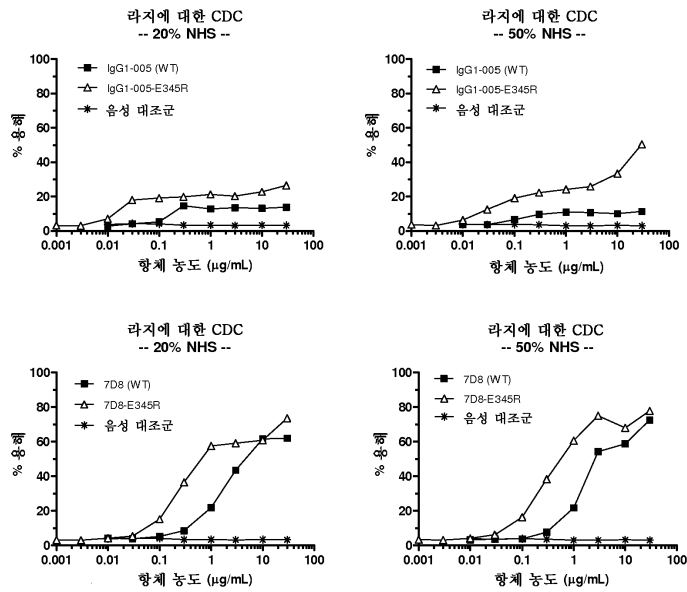
도면9b



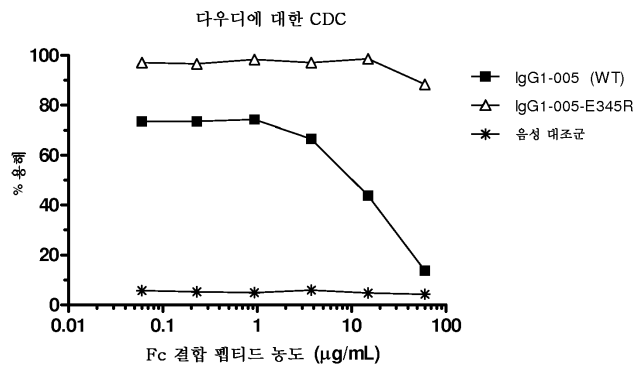
도면9c



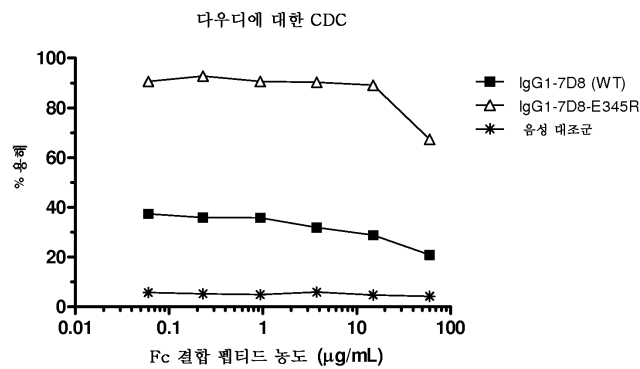
도면9d



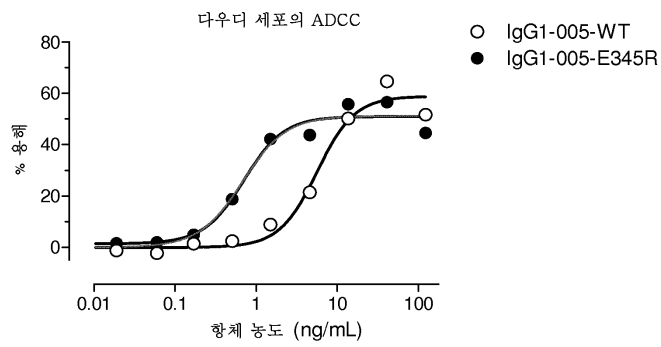
도면10a



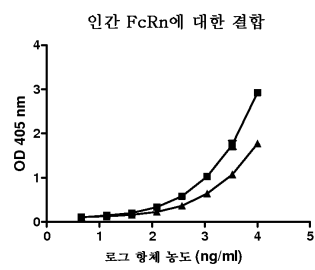
도면10b



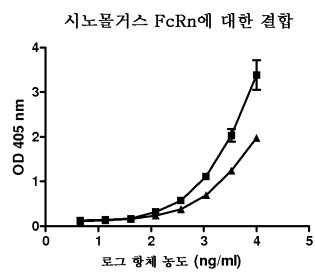
도면11



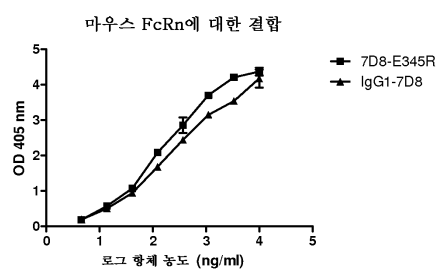
도면12a



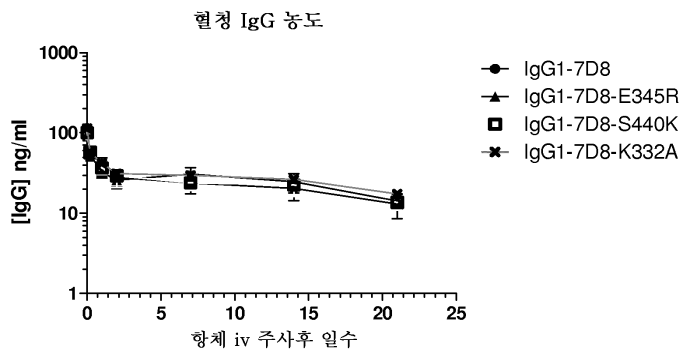
도면12b



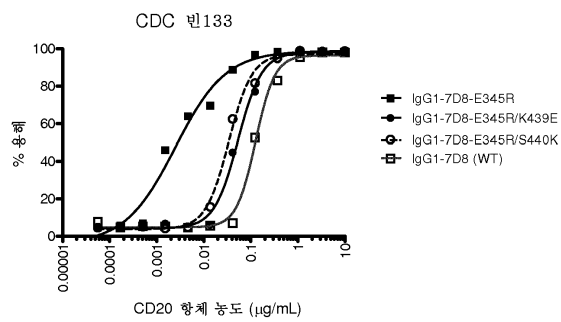
도면12c



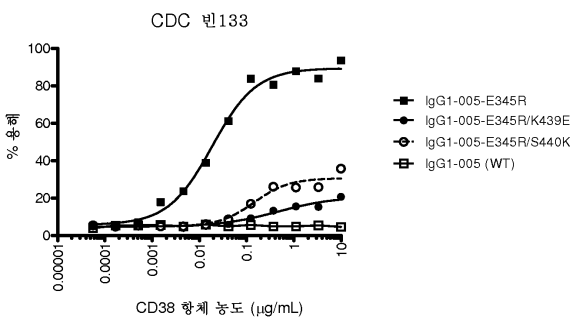
도면13



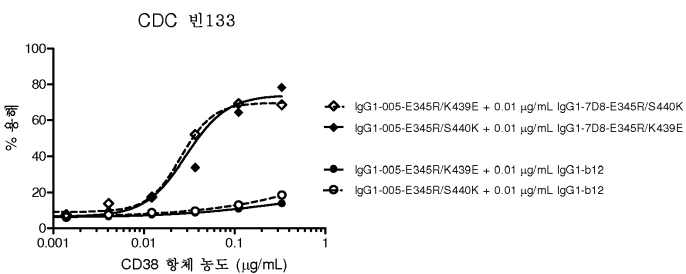
도면14a



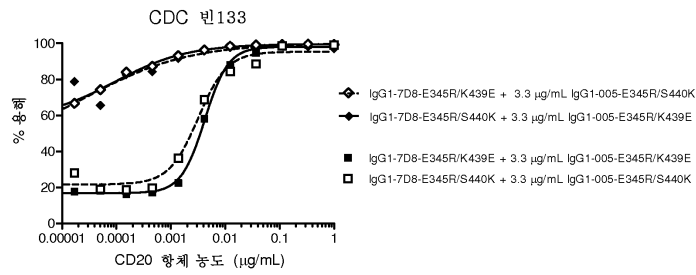
도면14b



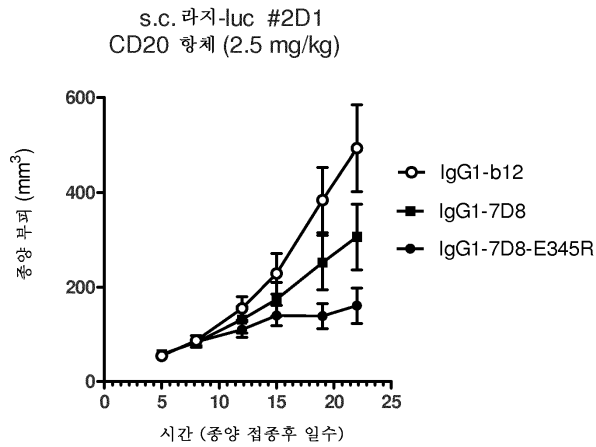
도면14c



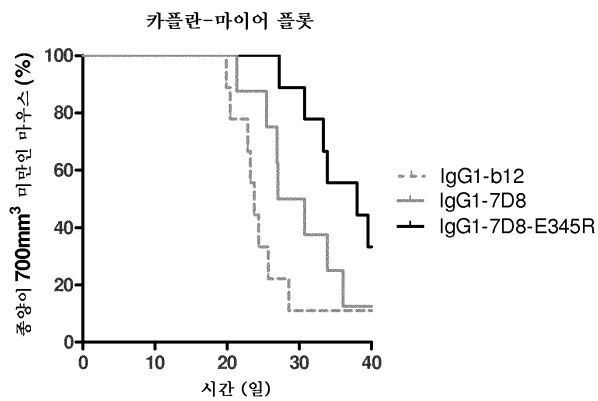
도면14d



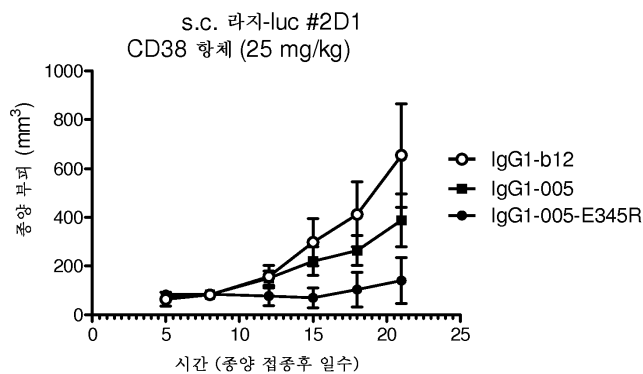
도면15a



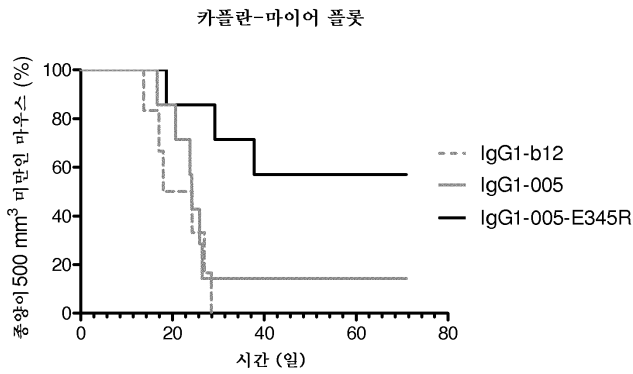
도면15b



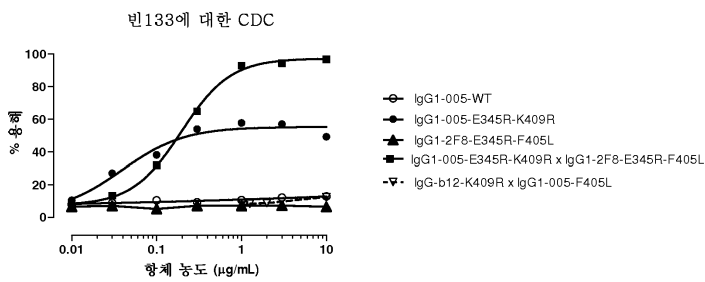
도면16a



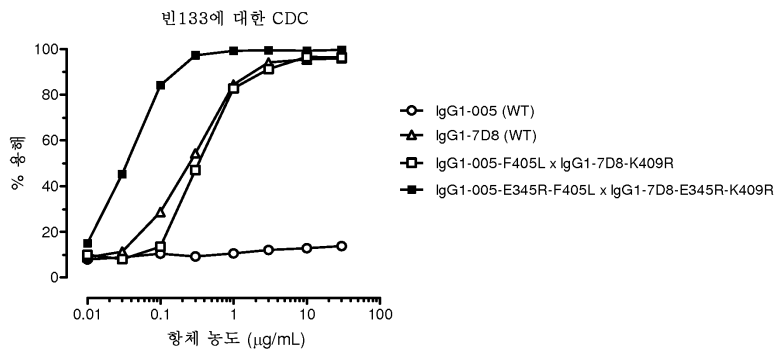
도면16b



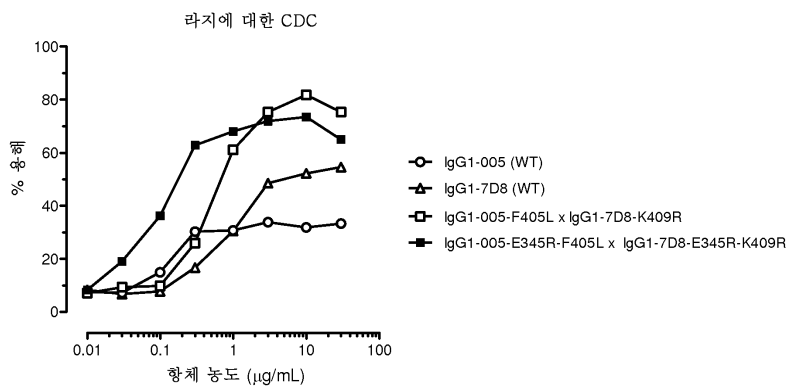
도면17



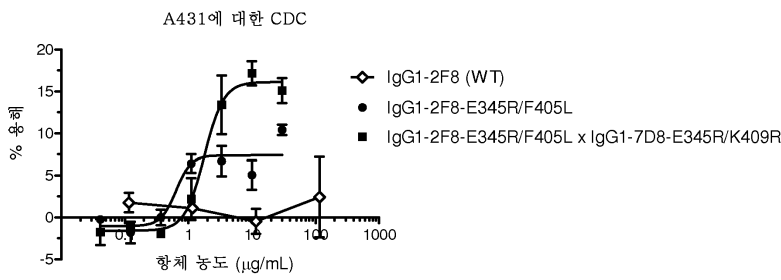
도면18a



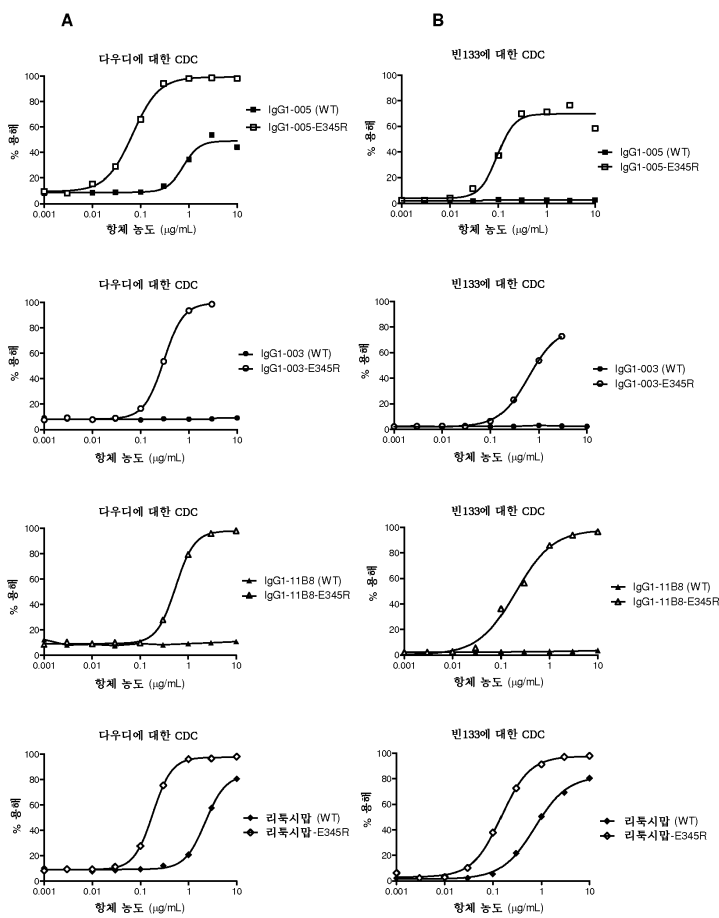
도면18b



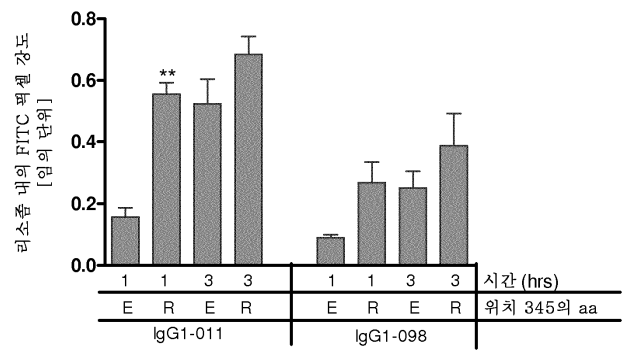
도면19



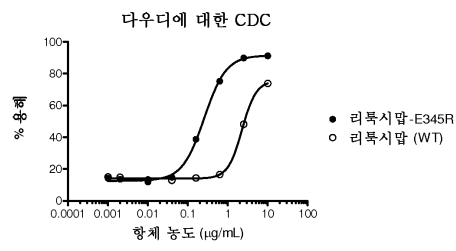
도면20



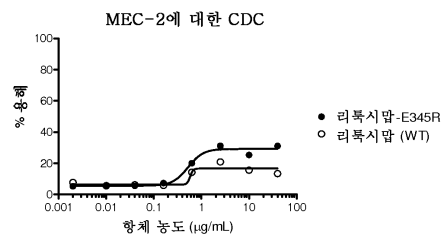
도면21



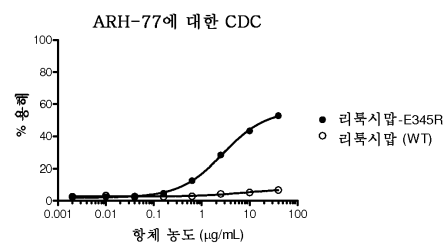
도면22a



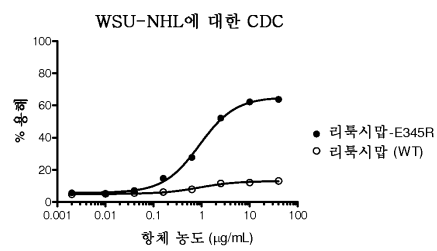
도면22b



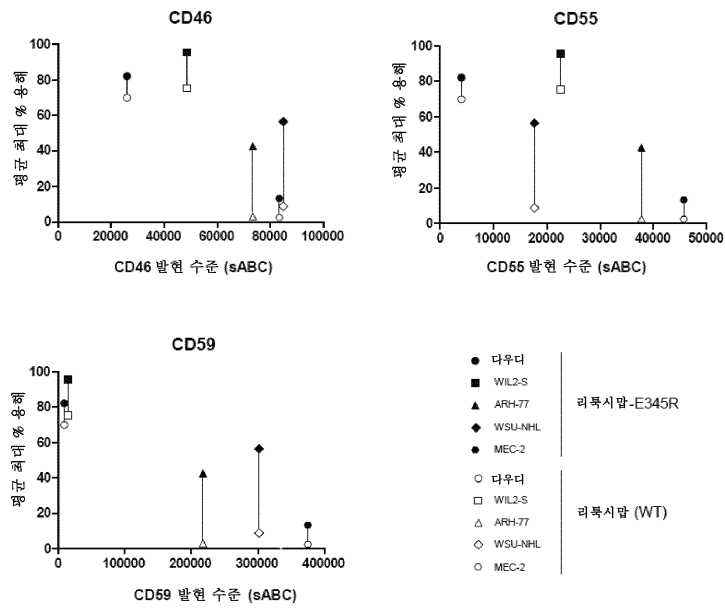
도면22c



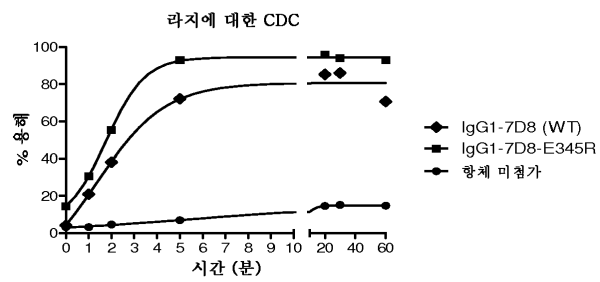
도면22d



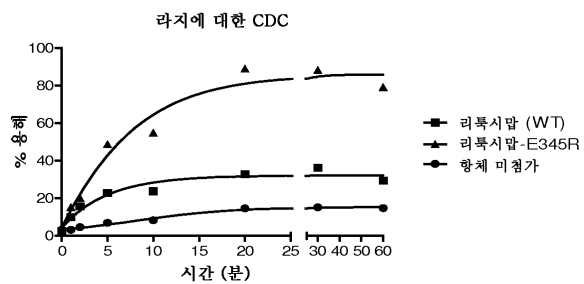
도면22e



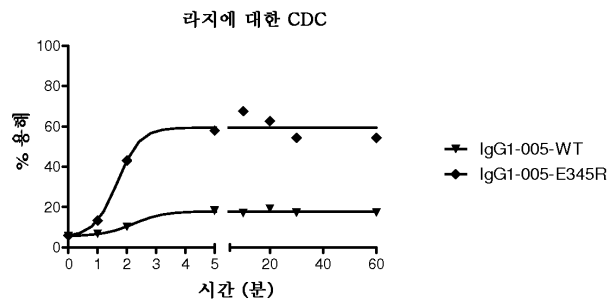
도면23a



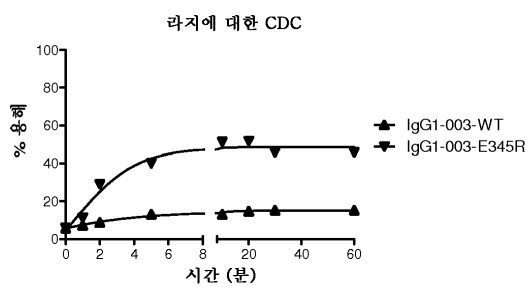
도면23b



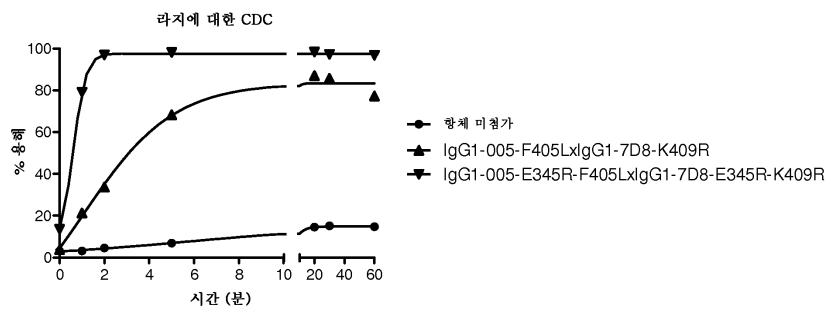
도면23c



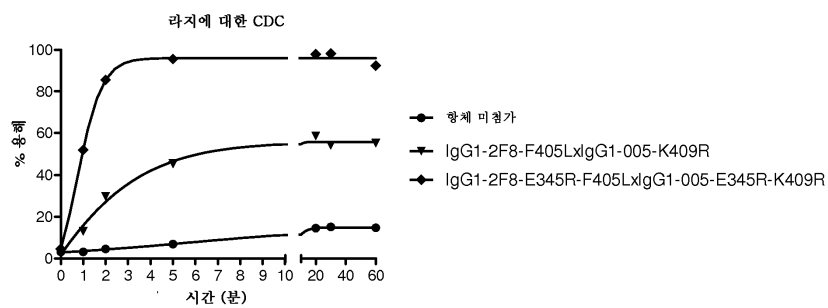
도면23d



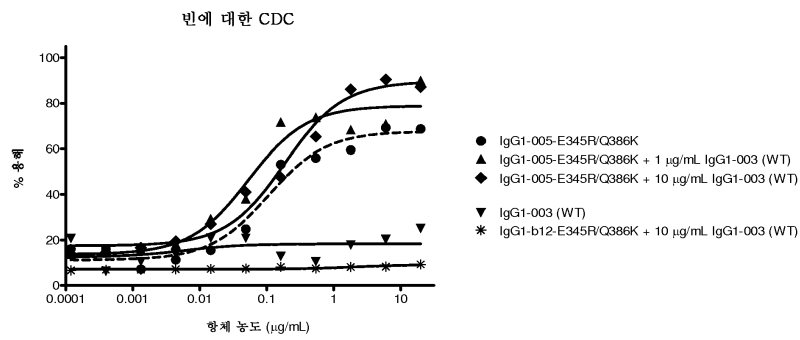
도면24



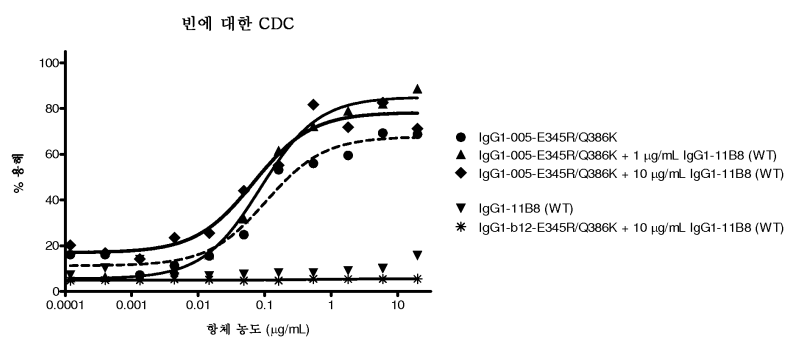
도면25



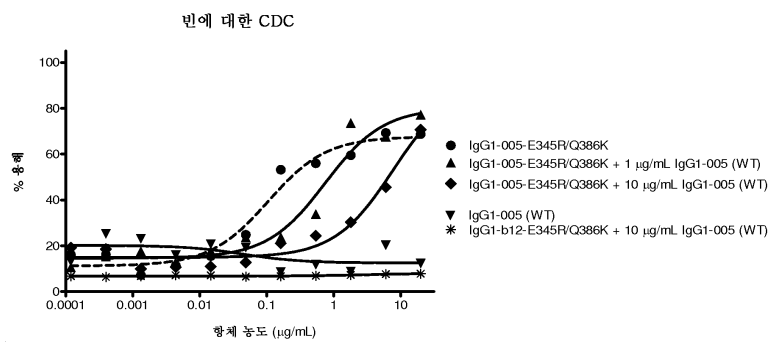
도면26a



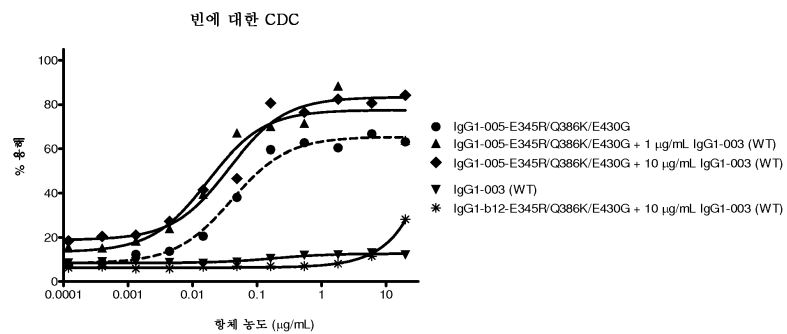
도면26b



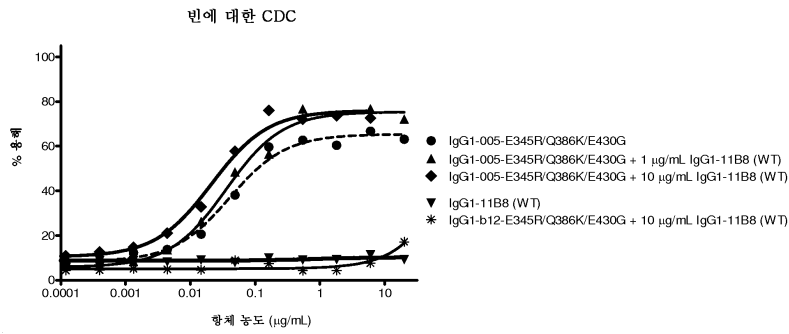
도면26c



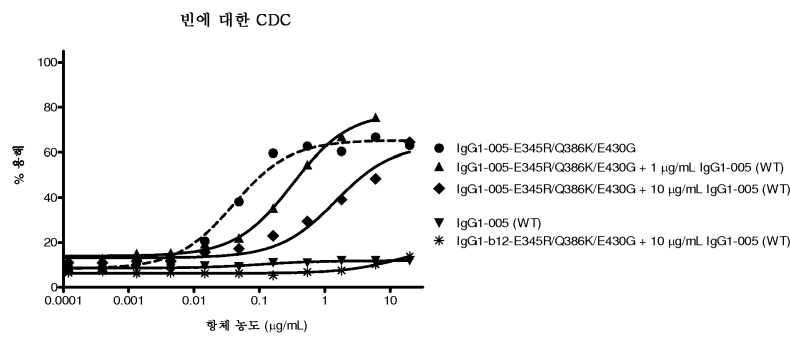
도면26d



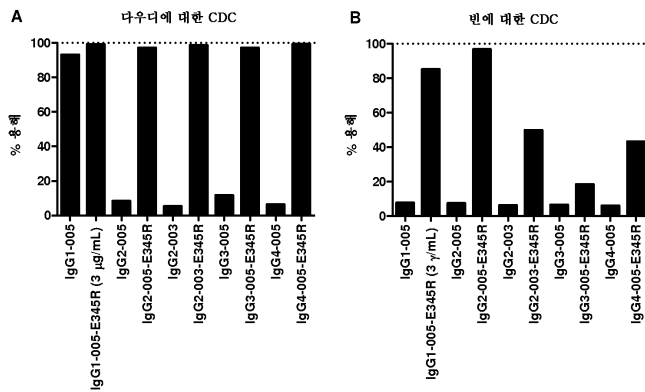
도면26e



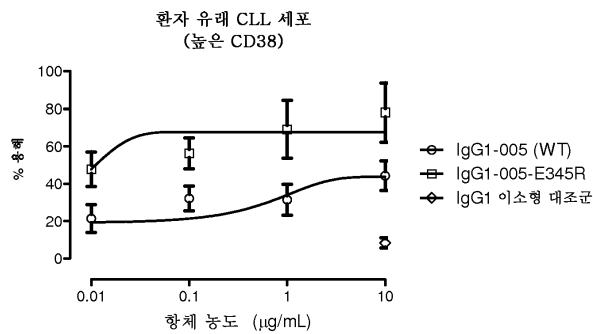
도면26f



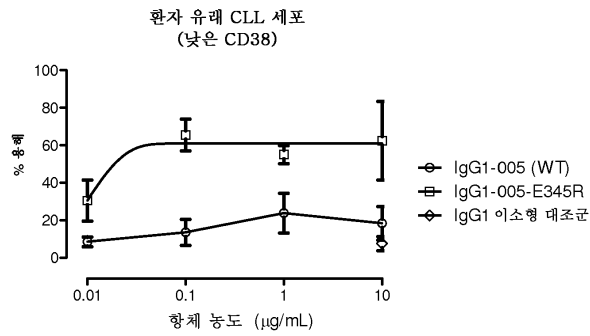
도면27



도면28a



도면28b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Antibody variants and uses thereof

<130> P/0067-W0

<140> PCT/EP/2012/063339

<141> 2012-07-06

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

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

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

325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195			200			205									
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
210			215			220									
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225			230			235			240						
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
245			250			255									
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
260			265			270									
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
275			280			285									
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
290			295			300									
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305			310			315			320						
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
325															
<210> 3															
<211> 377															
<212> PRT															
<213> homo sapiens															
<400															
> 3															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1			5			10			15						
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
20			25			30									
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
35			40			45									
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
50			55			60									
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr

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

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

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

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

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 4
 <211> 327
 <212> PRT

 <213> homo sapiens
 <400> 4
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 6

<211> 454

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

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

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

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

145	150	155	160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr			
	165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
	180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
	195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro			
210	215	220	
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
275	280	285	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
290	295	300	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
305	310	315	320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
340	345	350	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
355	360	365	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
370	375	380	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
385	390	395	400

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 7

<211> 97

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
1 5 10 15

Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
50 55 60

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu
65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
85 90 95

Thr

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

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

245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

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

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

 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Gly Lys
 450