



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0141306
(43) 공개일자 2022년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 37/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7030166
(22) 출원일자(국제) 2021년02월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/017665
(87) 국제공개번호 WO 2021/163329
국제공개일자 2021년08월19일
(30) 우선권주장
62/975,663 2020년02월12일 미국(US)

(71) 출원인
브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
맨사, 코피
미국, 매사추세츠 02155, 매드포드, 가스톤 스트리트 130
플렌지, 로버트
미국, 매사추세츠 02481, 웰레슬리, 올드 팜 로드 37
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
최덕규

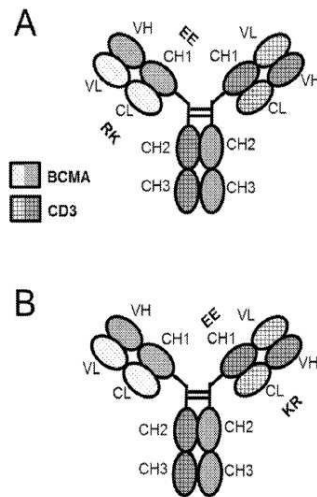
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 자가면역 질환의 항-BCMA 요법(ANTI-BCMA THERAPY IN AUTOIMMUNE DISORDERS)

(57) 요약

본 발명은 자가반응성 B 계통 세포에 의해 유발되는 자가면역 장애, 예를 들어 항-호중구 세포질 항체(ANCA)-연관 혈관염(AAV)과 같은 자가면역 장애의 치료 또는 관리에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)

(72) 발명자

로이, 소피

미국, 매사추세츠 02493, 웨스턴, 뉴튼 스트리트 179

잘러, 데니스

미국, 매사추세츠 02492, 니드햄, 노르위치 로드 54

도비, 제니퍼

미국, 매사추세츠 02466, 어번데일, 그로브 스트리트 211

샌즈, 스티븐

미국, 매사추세츠 02128, 보스톤, 아파트 3, 런던 스트리트 182

헤놀트, 질

미국, 매사추세츠 01720, 액톤, 프랭클린 플레이스 11

도이칸, 카밀

미국, 매사추세츠 01864, 리딩, 패틀리 로드 노스 8

칼비노, 제나

미국, 매사추세츠 02445, 브룩라인, 아파트 2, 비콘 스트리트 1742

진, 시

미국, 매사추세츠 02446, 브룩라인, 아파트 305, 비콘 스트리트 1600

파케트, 조셉

미국, 매사추세츠 02771, 시콘크, 페리 애브뉴 38

명세서

청구범위

청구항 1

자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법으로서, 상기 방법은 이러한 치료 또는 관리를 필요로 하는 환자에게 다중 특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 다중특이적 항체는 B-세포 성숙 항원(BCMA) 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 자가면역 장애는 항호중구 세포질 항체(ANCA)-연관 혈관염(AAV), 류마티스 관절염(RA) 또는 전신 홍반 루푸스(SLE)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

항호중구 세포질 항체(ANCA)-연관 혈관염(AAV)의 치료 또는 관리 방법으로서, 상기 방법은 이러한 치료 또는 관리를 필요로 하는 환자에게 다중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 다중특이적 항체는 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 BCMA 및 CD3에 결합하는 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이고, 선택적으로 상기 이중특이적 항체는 항-BCMA 항체의 2개의 Fab 단편, 항-CD3 항체의 하나의 Fab 단편, 및 하나의 Fc 부분을 포함하는 3가 이중특이적 항체이고, 상기 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는:

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

CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역; 또는

(c) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;

으로부터 선택되는 CDR1H, CDR2H, CDR3H CDR1L, CDR2L 및 CDR3L 영역 조합을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는:

(a) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL을 갖는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편;

(b) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL을 갖는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 또는

(c) SEQ ID NO:9의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL을 갖는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편;

을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 폴리펩티드:

(a) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57의 2개 카피;

(b) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, 및 SEQ ID NO:60의 2개 카피; 또는

(c) SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, 및 SEQ ID NO:63의 2개 카피;

로 이루어진 중쇄 및 경쇄 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환은 전신 홍반 루푸스, IgA 신병증, 막성 신병증, 중증 근무력증, 시신경 척수염, 심상 천포창, 항-PAD4-활성화 류마티스 관절염, 고형 장기 이식에서 민감화/예비형성된 항체, 길랭-바레 증후군(급성 염증성 탈수초성 다발신경병증 - AIDP), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 면역성 혈소판 감소성 자반병, 류마티스성 관절염 및 ANCA-연관 혈관염(AAV)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 다발혈관염을 동반한 육아종증(GPA), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증(EGPA), 현미경적 다발혈관염(MPA) 및 신장-제한된 ANCA-연관 혈관염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 AAV는 다발혈관염을 동반한 육아종증(GPA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 AAV는 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증(EGPA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 AAV는 현미경적 다발혈관염(MPA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 AAV는 신장-제한된 ANCA-연관 혈관염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역 장애(예: AAV)는 난치성 또는 재발성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역 장애(예: AAV)는 새로 진단되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제3항 내지 제16항, 제18항 또는 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 신경계, 눈, 코, 심장, 신장, 위, 장, 폐, 관절, 근육 및 피부에서 선택된 환자의 하나 이상의 신체 부위에 영향을 미치는 것을 특징으로 하는 방

법.

청구항 21

제3항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 생명 또는 주요 장기를 위협하는 징후의 존재와 함께 일반화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 환자는 미만성 폐포 출혈(DAH)을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제3항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 장기를 위협하는 징후 없이 국소화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 형질모세포 감소를 필요로 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 사이토카인 방출 증후군이 발병할 위험이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 감염이 발병할 위험이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 관해의 유도를 필요로 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 관해의 유지를 필요로 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 무치료 또는 기준 치료에 비해 환자의 형질모세포를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 기준 치료에 비해 환자에서 사이토카인 방출 증후군의 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 기준 치료에 비해 환자의 감염 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 기준 치료에 비해 환자의 관해를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 더 빠르게 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 기준 치료에 비해 환자의 관해가 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 더 오래 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기준 치료는 스테로이드(예: 글루코코르티코이드), 사이클로포스파미드, 항-CD20 모노클로날 항체(예: 리툭시맙), 메토트렉세이트, 아자티오프린, 미코페놀레이트, 미코페놀레이트 모페틸, 아바코판, 항-TNF 제제(예: 인플릭시맙, 아달리무맙, 골리무맙, 에타너셉트), 항-IL6R 항체(예: 토실리주맙, 사릴루맙), 공동자극 차단(예: 아바타셉트), JAK 억제제(예: 토파시티닙, 바리시티닙) 및/또는 벨리루맙을 사용한 치료이고, 바람직하게는 기준 치료는 스테로이드, 사이클로포스파미드 또는 리툭시맙을 사용한 치료인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 관해 유도에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 관해 유지에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 출원은 2020년 2월 12일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/975,663호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0001]

[0002] **서열 목록**

[0003] 이 응용 프로그램은 ASCII 텍스트 형식으로 된 서열 목록의 CRF(Computer Readable Form) 전체를 참조로 통합한다. 서열 목록 텍스트 파일의 제목은 "14247-482-228_SEQ_LISTING"이고, 2021년 2월 11일에 생성되었으며 크기는 106,995바이트이다.

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본 발명은 자가면역 장애, 자가반응성 B 계통 세포(autoresponsive B lineage cells), 예를 들어, 항-호중구 세포질 항체(ANCA) 연관 혈관염(AAV)에 의해 유발된 자가면역 장애의 치료 또는 관리에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 자가면역 장애는 대상체(subject)의 면역 체계가 대상체 자신의 신체의 건강한 조직이나 기관을 공격할 때 발생한다. 일부 경우에, 이러한 장애는 B 계통 세포("자가반응성 B 계통 세포"), 예를 들어 기억 B 세포, 형질모세포(plasmablasts) 및/또는 형질 세포(plasma cells)에 의한 대상체 자신의 조직("자가-항원(self-antigens)")에 있는 항원의 비정상적인 인식으로 인해 발생할 수 있다. 일부 경우에, 자가반응성 형질모세포 및 형질 세포는 자가-항원을 인식하거나 그리고/또는 자가-항원을 발현하는 건강한 조직 또는 기관을 공격하는 자가반응성 항체("자가항체(autoantibodies)")를 생성할 수 있다. 전신성 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus, SLE)는 전형적인 자가면역 질환으로 설명되었다(Fava, A. and Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. Journal of autoimmunity, 96, 1-13).

[0007] 항-호중구 세포질 항체(Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 연관 혈관염(vasculitis)(AAV)은 심각한 이환율 및 사망률을 갖는 자가반응성 B 계통 세포에 의해 유발되는 심각한 자가면역 장애이다. AAV 환자는 활동성 질환과 다양한 기간의 관해(remission) 기간 사이를 순환한다. AAV에 대한 치료법은 없으며 환자의 50%가 활동성 질환 동안 사망하거나 심각한 합병증을 겪는다. AAV는 ANCA 자가항체에 의해 매개되는 중소형 혈관의 파괴적인 염증을 특징으로 한다.

[0008] 자가면역 질환에 대한 기존 치료법은 관해 유도 또는 유지에 항상 효과적인 것이 아니거나 그리고/또는 바람직하지 않은 부작용이 있을 수 있다. 따라서 자가면역 장애의 치료 또는 관리를 위한 추가 요법이 필요하다.

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

[0010] 본 발명은 BCMA에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)을 사용하여 자가면역 장애가 있는 대상체를 치료하거나 관리하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 한 측면에서, 본 발명은 자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법을 제공하며, 상기 방법은 이러한 치료 또는 관리가 필요한 대상체(예: 인간)에게 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 다중특이적 항체는 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체(예를 들어, 인간)에서 자가면역 장애를 치료 또는 관리에 사용하기 위하여 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합하는 다중특이적(예, 이중특이적) 항체를 제공한다.

[0013] 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 B 계통 세포(예를 들어, 자가반응성 B 계통 세포)에 의해 유발된다. 바람직한 실시예에서, B 계통 세포, 예를 들어, 자가반응성 B 계통 세포는 기억 B 세포(memory B cells), 형질모세포 및/또는 형질 세포이다.

[0014] 일부 실시예에서, 자가면역 장애는 전신 홍반성 루푸스, IgA 신증, IgG4 연관 질환, 막성 신병증, 중증 근무력증, 시신경 척수염, 심상성 천포창, 항-PAD4-활성화 류마티스성 관절염, 고형 장기 이식에서 민감화된/예비형성된 항체, 길랭-바레 증후군(급성 염증성 탈수초성 다발신경병증 - AIDP), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 면역성 혈소판 감소성 자반병, 류마티스 관절염 및 ANCA 연관 혈관염(AAV)에서 선택된다. 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 IgG4-연관 질환이 아니다. 바람직하게는, 자가면역 장애는 ANCA 연관 혈관염(AAV), 전신 홍반성 루푸스(SLE) 및/또는 류마티스 관절염이다. 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 ANCA-연관 혈관염(AAV) 및/또는 류마티스 관절염이다.

[0015] 일부 실시예에서, 자가면역 장애는 새로 진단된다(예를 들어, 새로 진단된 AAV, SLE 또는 류마티스 관절염). 일

부 실시예에서, 자가면역 장애는 재발성(relapsed) 또는 난치성(refractory)(예를 들어, 재발성 또는 난치성 AAV, SLE 또는 류마티스 관절염)이다.

- [0016] 일부 실시예에서, AAV는 다발혈관염을 동반한 육아종증(granulomatosis with polyangiitis, GPA), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증(eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA), 현미경적 다발혈관염(microscopic polyangiitis, MPA) 및 신장-제한된 ANCA-연관 혈관염(renal-limited ANCA-associated vasculitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병을 포함한다. 일부 실시예에서, AAV는 다발혈관염을 동반한 육아종증(베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)), 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증, 현미경적 다발혈관염 또는 신장-제한된 ANCA-연관 혈관염이다.
- [0017] 일부 실시예에서, AAV는 신경계, 눈, 코, 심장, 신장, 위, 장, 폐, 관절, 근육 및 피부로부터 선택된 환자의 하나 이상의 신체 부위에 영향을 미친다. 일부 실시예에서, AAV는 선택적으로 환자가 미만성 폐포 출혈(diffuse alveolar hemorrhage, DAH)을 갖는 생명 또는 주요 기관 위협 징후의 존재와 함께 일반화된다. 다른 실시예에서, AAV는 기관을 위협하는 징후(organ-threatening manifestations) 없이 국소화된다.
- [0018] 일부 실시예에서, 환자는 형질모세포 감소(plasmablast reduction)를 필요로 한다. 일부 실시예에서, 환자는 관해(remission) 유도가 필요하다. 일부 실시예에서, 환자는 관해 유지가 필요하다. 일부 실시예에서, 방법은 환자의 형질모세포를 무치료 또는 참조 치료에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소시킨다.
- [0019] 일부 실시예에서, 환자는 관해 유도가 필요하다. 일부 실시예에서, 방법은 관해 유도를 위해 사용되며, 선택적으로 여기서 방법은 환자에서 참조 치료에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%만큼 더 빠른 관해 유도를 초래한다.
- [0020] 다른 실시예에서, 환자는 관해 유지가 필요하다. 일부 실시예에서, 방법은 관해의 유지를 위해 사용되며, 선택적으로 여기서 방법은 환자에서 참조 치료에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 만큼 더 긴 관해 유지를 초래한다.
- [0021] 일부 실시예에서, 환자는 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome)이 발병할 위험이 있다. 일부 실시예에서, 방법은 환자에서 참조 치료에 비해 사이토카인 방출 증후군의 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 감소시킨다.
- [0022] 일부 실시예에서, 환자는 감염이 발병할 위험이 있다. 일부 실시예에서, 방법은 참조 치료에 비해 환자의 감염 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 감소시킨다.
- [0023] 일부 실시예에서, 참조 치료는 스테로이드(예: 글루코코르티코이드), 사이클로포스파미드, 항-CD20 단일클론 항체(예: 리툽시맵), 메토틱렉세이트, 아자티오프린, 미코페놀레이트, 미코페놀레이트 모페틸, 아바코판, 항-TNF 제제(예: 아다리시맵, 인플릭시맵, 아달리무맵, 골리무맵, 에타네르셉트), 항-IL6R 항체(예: 토실리주맵, 사틸루맵), 공동자극 차단(예: 아바타셉트), JAK 억제제(예: 토파시티닙, 바리시티닙) 및/또는 벨리무맵으로 치료하며, 바람직하게는 여기서 참조 치료가 스테로이드, 사이클로포스파미드 또는 리툽시맵을 사용한 치료이다.
- [0024] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 하기 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, 및 CDR3L 영역 조합을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편(antigen binding fragment)을 포함한다:
- [0025] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0026] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0027] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0028] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역;

- [0029] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역;
- [0030] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역; 및
- [0031] g) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역.
- [0032] 특히 바람직한 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함한다.
- [0033] 일부 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함한다:
- [0034] a) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0035] b) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역,
- [0036] c) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역,
- [0037] d) SEQ ID NO:38의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0038] e) SEQ ID NO:39의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0039] f) SEQ ID NO:40의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역, 또는
- [0040] g) SEQ ID NO:9의 VH 영역 및 SEQ ID NO:11의 VL 영역.
- [0041] 일부 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0042] a) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH, 및 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL;
- [0043] b) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 영역 가변 영역 VL; 또는
- [0044] c) SEQ ID NO:9의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 가변 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 적어도 99% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VL.
- [0045] 특히 바람직한 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함한다.
- [0046] 일부 실시예에서, 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR ζ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3이다.
- [0047] 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 각각 중쇄 CDR1H, CDR2H 및 CDR3H로서 SEQ ID NO: 1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VH 및 각각 경쇄 CDR1L, CDR2L 및 CDR3L로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VL을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:7의 VH 영역 및 SEQ ID NO:8의 VL 영역을 포함한다.
- [0048] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열과 99% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열과 90% 이상 동일하거나, 95% 이상 동일하거나, 99% 이상 동일하거나, 또는 동일한 아미노

산 서열을 포함하는 가변 영역 VL 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0049] 특히 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 SEQ ID NO:7의 VH 영역 및 SEQ ID NO:8의 VL 영역을 포함하는 항-CD3 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0050] 일부 실시예에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 바람직한 실시예에서, 다중특이적 항체는 BCMA 및 CD3에 결합하는 이중특이적 항체이다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 2가이다(예를 들어, 1+1 형식). 일부 실시예에서, 2가 이중특이적 항체는 형식: CD3 Fab - BCMA Fab (즉, Fc가 존재하지 않는 경우)을 갖는다. 대안적으로, 2가 이중특이적 항체는 형식: Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; Fc-BCMA Fab-CD3 Fab; 또는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab(즉, Fc가 존재하는 경우)을 갖는다. 바람직한 실시예에서, 2가 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab 형식을 갖는다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 3가(예를 들어, 2+1 형식)이다. 바람직한 실시예에서, 이중특이적 항체는 3가이고 항-BCMA 항체의 2개의 Fab 단편, 항-CD3 항체의 1개의 Fab 단편, 및 1개의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시예에서, 3가 이중특이적 항체는 다음 형식을 갖는다: CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab; 또는 BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하지 않는 경우). 대안적으로, 3가 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab; 또는 CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하는 경우) 형식을 가질 수 있다. 바람직한 실시예에서, 3가 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식을 갖는다.
- [0051] 일부 실시예에서, 항-CD3 Fab는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함한다.
- [0052] 일부 실시예에서, 항-BCMA Fab 단편의 CH1 도메인은 아미노산 변형 K147E/D 및 K213E/D(EU 넘버링에 따라 넘버링됨) 및 아미노산 변형 E123K/R/H 및 Q124K/R/H(Kabat에 따라 넘버링됨)을 갖는 CL 도메인을 포함하는 상응하는 면역글로불린 경쇄를 포함한다.
- [0053] 대안적 실시예에서, 항-BCMA Fab 단편의 CH1 도메인은 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E(EU 넘버링에 따라 넘버링됨), 또는 그의 보존적 치환, 및 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R(Kabat에 따라 넘버링됨), 또는 이의 보존적 치환을 가지는 CL 도메인을 포함하는 상응하는 면역글로불린 경쇄를 포함한다.
- [0054] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 Fc를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, Fc는 IgG1 Fc이다. 일부 실시예에서, (예를 들어, IgG1) Fc는 제1 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제1 Fc 쇄, 및 제2 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제2 Fc 쇄를 포함하며, 여기서:
- [0055] a) 제1 CH3 도메인은 변형 T366S, L368A 및 Y407V, 또는 이의 보존적 치환(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)을 포함하고, 그리고
- [0056] b) 제2 CH3 도메인은 변형 T366W, 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)을 포함한다.
- [0057] 대안적 실시예에서, (예를 들어, IgG1) Fc는 제1 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제1 Fc 쇄, 및 제2 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제2 Fc 쇄를 포함하며, 여기서:
- [0058] a) 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V, 또는 이의 보존적 치환(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)을 포함하고; 그리고
- [0059] b) 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W, 또는 이의 보존적 치환을 포함하는 제2 CH3 도메인(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)을 포함한다.
- [0060] 일부 실시예에서, (예를 들어, IgG1) Fc는 다음을 포함한다:
- [0061] a) 변형 L234A, L235A 및 P329G(EU 넘버링에 따라 넘버링됨) 및/또는
- [0062] b) 변형 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따라 넘버링됨).
- [0063] 추가 실시예에서, 본 발명에 따른 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 하기 서열번호(SEQ ID NO)를 포함한다:
- [0064] 83A10-TCBcv: 45, 46, 47 (x2), 48
- [0065] 21-TCBcv: 49, 50, 51 (x2), 48

[0066] 22-TCBcv: 52, 53, 54 (x2), 48

[0067] 42-TCBcv: 55, 56, 57 (x2), 48

[0068] Mab101: 58, 59, 60 (x2), 48

[0069] Mab102: 61, 62, 63 (x2), 48

[0070] Mab103: 64, 65, 66 (x2), 48

[0071] 바람직한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 42-TCBcv, Mab101 또는 Mab102이다. 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 42-TCBcv이다.

[0072] 본 발명의 측면 및 실시예가 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 본 발명의 이들 및 다른 측면 및 실시예가 또한 본 명세서에 기재되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 본 발명은 이제 첨부된 도면을 참조하여 더 상세히 설명될 것이다.

도 1은 본 발명에서 사용하기 위한 상이한 형식의 이중특이적 2가 항체를 도시하는데, 이는 T 세포 항원(CD3이 도시됨)에 결합하는 Fab 단편 및 Fab BCMA-Fc-Fab CD3 형식의 BCMA를 포함한다. CD3 Fab는 경쇄 불일치 및 부산물을 줄이기 위해 VH-VL 교차를 포함할 수 있다. 아미노산 치환("RK/EE"가 도시됨)은 CL-CH1에 도입되어 생산 시 경쇄 불일치/부산물을 감소시킬 수 있다. CD3 Fab 및 BCMA Fab는 유연한 링커로 서로 연결될 수 있다.

도 2는 본 발명에서 사용하기 위한 상이한 형식의 이중특이적 3가 항체를 도시하는데, 이는 T 세포 항원(CD3이 도시됨) 및 BCMA에 다음 형식으로 결합하는 Fab 단편을 포함한다: Fab BCMA - Fc - Fab CD3 - Fab BCMA(A, B); Fab BCMA - Fc - Fab BCMA - Fab CD3(C, D). CD3 Fab는 경쇄 불일치 및 부산물을 줄이기 위해 VH-VL 교차를 포함할 수 있다. 아미노산 치환("RK/EE"가 도시됨)은 CL-CH1에 도입되어 생산 시 경쇄 불일치/부산물을 감소시킬 수 있다. CD3 Fab 및 BCMA Fab는 유연한 링커로 서로 연결될 수 있다.

도 3은 본 발명에서 사용하기 위한 이중특이적 2가 항체의 추가 형식을 도시하며, 이는 T 세포 항원(CD3이 도시됨) 및 BCMA에 다음 형식으로 결합하는 Fab 단편을 포함한다: Fc - Fab CD3 - Fab BCMA(A, B); Fc - Fab BCMA - Fab CD3(C, D). CD3 Fab는 경쇄 불일치 및 부산물을 줄이기 위해 VH-VL 교차를 포함할 수 있다. 아미노산 치환("RK/EE"가 도시됨)은 CL-CH1에 도입되어 생산 시 경쇄 불일치/부산물을 감소시킬 수 있다. CD3 Fab 및 BCMA Fab는 유연한 링커로 서로 연결될 수 있다.

도 4는 유세포 분석(A)에 의해 평가된 BCMA 발현 암 세포주(JEKO, RPMI-8226 및 H929)와 비교하여 4명의 정상적인 건강한 지원자(NHV)의 형질모세포(PB)에 대한 BCMA 발현을 보여준다. 가용성 BCMA 수준은 ELISA에 의해 평가된 바와 같이 NHV('정상'), 다발성 골수종('MM') 또는 ANCA 연관 혈관염('AAV') 환자(B)의 혈청 또는 혈장 샘플에 표시된다.

도 5는 JEKO 세포를 CD3+ T 세포와 1:2 표적:작동체(T:E)로 배양하고 항-BCMA 항-CD3 이중특이적 항체, 즉 BCMA T 세포 인게이지(CC-93269, Mab101 또는 Mab102)로 처리했을 때 T 세포-매개 사멸(A) 및 T 세포 활성화(B)의 용량-반응 곡선을 보여준다. JEKO 세포의 T 세포 매개 사멸은 아넥신V(annexinV) 발현에 의해 평가되었다. 20시간 시점이 표시된다. T 세포 계통 및 활성화 마커를 24시간 시점에서 유세포 분석에 의해 분석하였고; CD8+ T 세포에 대한 %CD69 발현이 표시된다.

도 6은 RPMI-8226 세포가 상이한 표적:작동체(T:E) 비율 및 다양한 농도의 CC-93269에서 NHV PBMC와 공동 배양되었을 때의 T 세포 매개 사멸(A) 및 T 세포 활성화(B)의 용량-반응 곡선을 도시한다.

도 7은 건강한 지원자의 말초혈액 단핵세포(PBMC)가 24시간 동안 다양한 농도의 BCMA T 세포 인게이지, 즉 BCMA TCE(Mab101, CC-93269 또는 Mab102) 또는 대조군 2+1 항체로 처리되었을 때 형질모세포 사멸(A), T 세포 활성화(C) 및 사이토카인 생산(D)에 대한 용량-반응 곡선을 보여준다. 대표적인 FACS 플롯은 CD3(-) CD19(+) 세포(B)에 게이트된 CD20(-) CD27(+)로서 형질모세포 식별을 보여준다. 형질모세포 사멸은 총 CD19(+) 세포(A)의 백분율로 평가된다. CD8+ T 세포에 대한 %CD69 발현이 표시된다(C).

도 8은 건강한 지원자의 PBMC를 다양한 농도의 CC-93269로 24시간 동안 처리했을 때 사이토카인 생산(IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, 그랜자임 B 및 퍼포린)에 대한 용량-반응 곡선을 보여준다.

도 9는 건강한 지원자의 PBMC를 24시간 동안 다양한 농도의 CC-93269로 처리했을 때 B 세포 계통을 보여준다. CD20(+)CD27(-)IgD(+) 발현이 있는 나이브(Naive) B 세포(A), CD20(+)CD27(+)IgD(+) 발현이 있는 비전환 메모리 B 세포(B) 및 CD20(+)CD27(+)IgD(-) 발현(C)이 있는 전환 메모리 B 세포(C)가 총 CD19(+) 세포의 백분율로 제공된다.

도 10은 현탁된 PBMC 또는 골수(BM) 상층액에 현탁된 PBMC와 비교하여, 골수(BM) 단핵 세포가 배지에 24시간 동안 CC-93269로 처리된 경우 형질모세포 사멸(A) 및 T 세포 활성화(B)에 대한 용량-반응 곡선을 보여준다. 형질모세포 사멸은 총 CD19(+) 세포(A)의 백분율로 평가된다. CD8+ T 세포에 대한 %CD69 발현이 표시된다(B).

도 11은 AAV 환자로부터의 PBMC를 다양한 농도의 BCMA TCE(Mab101, CC-93269 또는 Mab102) 또는 대조군 2+1 항체로 24시간 동안 처리했을 때 형질모세포 사멸(A), T 세포 활성화(C) 및 사이토카인 생성(D)에 대한 용량-반응 곡선을 도시한다. 대표적인 FACS 플롯은 CD3(-) CD19(+) 세포(B)에 게이트된(gated) CD20(-) CD27(+)로 형질모세포 식별을 보여준다. 형질모세포 사멸은 총 CD19(+) 세포(A)의 백분율로 평가된다. CD8+ T 세포에 대한 %CD69 발현이 표시된다(C).

도 12는 T 세포 계통(CD4, CD8)에 대한 염색 및 활성화 마커(CD69, CD25)에 의해 평가된 바와 같이 BCMA TCE(Mab101 [A], CC-93269 [B] 또는 Mab102 [C])로 24시간 동안 배양되었을 때 AAV 환자, AAV1의 PBMC에서 T 세포 활성화를 도시한다. CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포에 대한 %CD69 또는 %CD25 발현 수준이 표시된다.

도 13은 다양한 농도의 CC-93269(B, C) 또는 대조군 2+1 항체(A)와 함께 배양한 후 5개월 전에 리툭시맴을 마지막으로 받은 AAV 환자 AAV-5로부터의 PBMC에서 선택적 형질모세포(PB) 고갈을 도시한다.

도 14는 베이스라인(A)에서 AAV-2 대상체의 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 형질모세포 표적(A) 및 CD4(+)/CD8(+) T 세포를 도시한다. AAV-2로부터의 PBMC를 다양한 농도의 BCMA TCE와 함께 배양하고, 24시간 배양 후, T 세포 활성화를 유세포 분석법(C)에 의해 평가하였다.

도 15는 상이한 T:E 비율의 JEKO-1 세포가 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체와 함께 배양(incubation)된 경우 T 세포 활성화의 용량-반응 곡선을 도시한다. JEKO-1 세포를 1:10 또는 1:500의 T:E 비율로 PBMC와 함께 배양(culture)하여 각각 다발성 골수종(MM) 또는 AAV에서 관찰된 T:E 비율을 모의했다. 24시간 배양 후, 세포를 세척한 다음 CD8(+) T 세포에서 CD69(A) 및 CD25(B) 발현을 평가하였다.

도 16은 건강한 지원자의 PBMC를 ODN2006(CpG, 10 µg/mL)으로 자극하기 전에 24시간 동안 다양한 농도의 BCMA TCE와 함께 인큐베이션(incubation)하거나 성장 인자 IL-2(20U/ml) BAFF(200ng/ml) 및 IL-21(100ng/ml)과 함께 4-7일 동안 배양(culture)했을 때 형질모세포 수준(A) 및 총 IgG 분비(B)를 보여준다.

도 17은 류마티스 관절염(RA)의 PBMC를 다양한 농도의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체로 24시간 동안 처리했을 때 형질모세포 사멸(A), T 세포 활성화(B) 및 사이토카인 생산(C)에 대한 용량-반응 곡선을 도시한다.

도 18은 24시간 동안 다양한 농도의 CC-93269와 함께 배양한 후 RA로부터의 PBMC의 B 세포 계통을 도시한다. CD20(+)CD27(-)IgD(+) 발현이 있는 나이브(Naive) B 세포(A), CD20(+)CD27(+)IgD(+) 발현이 있는 비전환 메모리 B 세포(B) 및 CD20(+)CD27(+)IgD(-) 발현(C)이 있는 전환 메모리 B 세포(C)가 총 CD19(+) 세포의 백분율로 주어진다.

도 19는 다양한 농도의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체(A)와 함께 배양 후 활성화된 CD69(+)CD8(+) T 세포의 빈도(C)에서 최소 CD20(+) B 세포 고갈(B) 및 최소 엘리베이션으로 배양한 후 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque)로부터의 PBMC에서 선택적 IRF4+ 형질모세포(PB) 고갈을 도시한다.

도 20은 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 환자(n=5)로부터의 PBMC를 24시간 동안 다양한 농도의 CC-93269로 처리했을 때 형질모세포 사멸(A) 및 T 세포 활성화(B)에 대한 용량-반응 곡선을 도시한다.

도 21은 정상적인 건강한 지원자로부터의 PBMC를 CC-93269로 24시간 동안 처리했을 때 형질모세포 사멸(A) 및 T 세포 활성화(B)에 대한 외인성 가용성 BCMA(sBCMA)의 효과를 도시한다.

도 22는 정상적인 건강한 지원자(n=4) 또는 AAV 환자(n=2)로부터의 전혈 샘플이 다양한 24시간 동안 CC-93269의 농도로 처리되었을 때 T 세포 활성화(A) 및 사이토카인 생산(B)에 대한 용량-반응 곡선(dose-response curve)을 도시한다.

도 23은 실시예 18.3.3에 명시된 조건에서 보관 후 22-TCBv 분자의 대표적인 SEC 크로마토그램 오버레이를 도

시한다.

도 24는 이중특이적 항체 Mab101, Mab102, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv의 열 전개를 도시한다. 모든 이중특이적 항체는 유사한 열 전개 개시 온도(thermal unfolding onset temperatures)(~60° C)를 나타냈다. 그러나 가장 큰 전이에 대한 T_{mapp} 값은 공통 CDR 영역을 포함하는 Mab101 및 83A10-TCBcv 분자에 대해 약 5°C 더 크다.

도 25는 이중특이적 항체 Mab101, Mab102, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv의 콜로이드 안정성 평가를 도시한다. 평가는 PEG 6000 침전에 의해 수행되었으며 pH 6 완충액에서 수행되었다. 83A10의 CDR 영역을 포함하는 분자(즉, Mab101 및 83A10-TCBcv)는 배제된 부피 효과에 의해 천연 상태 침전을 유도하기 위해 거의 2배의 PEG 6000을 필요로 했다. 실선은 식(Equation) 1에 적합화된다.

도 26은 이중특이적 항체 83A10-TCBcv의 대표적인 단일 주기 동역학 SPR 센서그램을 도시한다. 항체를 pH 6에서 완충하고 2-8° C에서 2주 동안 저장하거나(A) pH 8에서 완충하고 40° C에서 2주 동안 저장했다(B). 점선은 저장 전에 스트레스를 받지 않은 샘플의 10회 독립적인 측정의 평균을 나타내고 점선은 이 평균의 3 표준 편차(SD)를 나타낸다. 퍼센트 유사성 점수는 식 2에 따라 SD 창에 속하는 스트레스를 받은 샘플의 데이터 포인트 수를 사용하여 계산되었다.

도 27은 이중특이적 항체 Mab101, Mab102, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv의 서열 배열이다. CDR 영역은 음영 처리되어 있고 퍼센트 서열 동일성은 위에 나와 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

본 명세서에 사용된 바와 같이, 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과(예를 들어, 적어도 하나)를 지칭할 수 있다.

"약"은 일반적으로 측정의 특성 또는 정밀도를 고려할 때 측정된 양에 대해 허용 가능한 오차 정도를 의미할 수 있다. 예시적인 오차 정도는 주어진 값 또는 값 범위의 20%(%) 이내, 일반적으로 10% 이내, 보다 일반적으로 5% 이내이다.

본 명세서에서 하나 이상의 특징을 "포함하는(comprising)" 것으로 설명된 실시예는 또한 이러한 특징을 "구성하는(consisting of)" 및/또는 "필수적으로 이들로만 이루어지는(consisting essentially of)" 대응하는 실시예의 개시로서 고려될 수 있다.

농도, 양, 부피, 백분율 및 기타 수치 값은 범위 형식으로 본 명세서에 표시될 수 있다. 그러한 범위 형식은 단지 편의와 간결함을 위해 사용되며 범위의 한계로서 명시적으로 언급된 수치 값뿐만 아니라 각 숫자 값과 하위 범위가 명시적으로 인용된 것처럼 모든 개별 수치 값 또는 하위 범위를 포함하도록 유연하게 해석되어야 함을 이해해야 한다.

치료 방법

본 발명은 적어도 부분적으로 하나 이상의 T 세포활성화를 촉진하는 항원(예: CD3) 및 BCMA에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애를 갖는 대상체의 치료 또는 관리에 기초한다.

특정 실시예에서, "대상체(subject)" 또는 "환자(patient)"는 인간이다. 일부 실시예에서, "대상체" 또는 "환자"는 18세 미만이다. 일부 실시예에서, "대상체" 또는 "환자"는 18세 이상이다. 일부 실시예에서, 대상체는 관해 유도가 필요하다. 일부 실시예에서, 대상체는 관해의 유지가 필요하다. 일부 실시예에서, 환자는 형질모세포 감소를 필요로 한다. 본 명세서에 사용된 용어 "치료하다(treat)", "치료하는(treating)" 또는 "치료(treatment)" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 효과는 치료적(therapeutic)이다. 즉 효과는 질병 및/또는 질병에 기인하는 유해 증상(adverse symptom)을 부분적으로 또는 완전히 치료한다. 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방적(prophylactic)이다. 즉 효과가 질병 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방할 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "관리하다(manage)", "관리하는(managing)" 또는 "관리(management)" 등은 질병 및/또는 질병에 기인하는 유해 증상의 진행 및/또는 악화를 억제 및/또는 지연시키는 것을 의미한다.

본 발명은 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원에 (예를 들어, CD3) 및 BCMA에 결합하는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애의 치료 또는 관리에 관한 것이다.

- [0084] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 자가면역 장애를 유발하는 세포, 예를 들어 자가면역 장애를 유발하는 BCMA-발현 세포에 선택적으로 결합할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 B 계통 세포(예를 들어, BCMA-발현 B 계통 세포)에 의해 유발된다. 일부 실시예에서, B 계통 세포(예: BCMA-발현 B 계통 세포)는 자가반응성 B 계통 세포이다. 일부 실시예에서, B 계통 세포(예를 들어 BCMA-발현 B 계통 세포)는 예를 들어 항원 제시 세포로 작용하거나 전염증성 사이토카인의 분비에 의해 자가면역을 구동한다.
- [0085] 본 명세서에서 용어 "자가반응성 B 계통 세포(autoreactive B lineage cells)"는 대상체 자신의 조직에 있는 항원("자가항원")을 인식할 수 있는 B 계통 세포를 의미한다. 자가반응성 B 계통 세포는 항체-분비 세포이거나 및/또는 항체를 분비할 수 있다. 일부 실시예에서, 자가반응성 B 계통 세포는 형질모세포, 형질 세포, 기억 B 세포, 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시예에서, 자가반응성 B 계통 세포는 형질모세포, 형질 세포 및 기억 B 세포이다. 특히 바람직한 실시예에서, 자가반응성 B 계통 세포는 형질모세포이다.
- [0086] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 자가면역 장애를 유발하는 자가반응성 B 계통 세포에 선택적으로 결합할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 자가반응성 B 계통 세포는 기억 B 세포, 형질모세포 및/또는 형질 세포와 같은 BCMA-발현 세포이다.
- [0087] 형질모세포는 형질 세포의 전구체이다. 이들은 CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD38(+), BCMA(+), IgD(-), CD24(-), SLAMF7(+) 및/또는 CD138(-)에서 선택된 하나 이상의 마커 조합으로 식별할 수 있다. 일부 실시예에서, 형질모세포는 BCMA(+) 및 SLAMF7(+)을 표시하는 세포로서 확인되며, 선택적으로 여기서 세포는 또한 마커 IgD(-), CD38(+) 및/또는 CD138(-) 중 하나 이상을 표시한다. 일부 실시예에서, 형질모세포는 CD19(+) CD20(-) CD27(+) BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-)을 표시하는 세포로서 확인된다. 특히 바람직한 실시예에서, 형질모세포는 마커 CD19(+) CD20(-) CD27(+)을 표시하는 세포로서 확인되며, 선택적으로 세포는 또한 마커 BCMA(+) 및/또는 CD38(+) 중 하나 이상을 표시한다.
- [0088] 형질 세포는 항체를 분비하는 세포이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "형질 세포(plasma cells)"는 단수명 및/또는 장수명의 형질 세포를 지칭할 수 있다. 이들은 CD19(+), CD20(-), CD27(+), CD38(+), BCMA(+), IgD(-), CD138(+), CD24(-) 및/또는 SLAMF7(+)에서 선택된 하나 이상의 마커 조합으로 식별할 수 있다. 일부 실시예에서, 형질 세포는 마커 BCMA(+) SLAMF7(+) CD138(+)을 표시하는 세포로서 확인되며, 선택적으로 세포는 마커 IgD(-) 및/또는 CD38(+) 중 하나 이상도 표시한다. 일부 실시예에서, 형질 세포는 CD19(+) CD20(-) CD27(+) BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(+)을 표시하는 세포로서 확인된다. 특히 바람직한 실시예에서, 형질 세포는 마커 CD19(+) CD20(-) CD27(+)을 표시하는 세포로서 확인되며, 선택적으로 여기서 세포는 또한 마커 BCMA(+) CD38(+) 및/또는 CD138(+)을 또한 표시한다.
- [0089] 기억 B 세포는 여포외(extrafollicular) 또는 GC 반응에서 항원 및 T 세포 헬퍼(-cell helpers)에 의해 활성화되는 B 세포이다. 이들은 CD19(+), CD20(+), CD27(+), CD38(-), BCMA(+/-), IgD(-) 및/또는 CD24(+)로부터 선택되는 마커들의 하나 이상의 조합에 의해 확인된다. 일부 실시예에서, 기억 B 세포는 마커 IgD(-) CD38(-) BCMA(+/-)를 표시하는 세포로서 확인된다. 일부 실시예에서, 기억 B 세포는 마커 CD19(+) CD20(+) CD27(+) IgD(-) CD38(-) BCMA(+/-)를 표시하는 세포로서 확인된다. 특히 바람직한 실시예에서, 기억 B 세포는 마커 CD19(+) CD20(+) CD27(+)을 표시하는 세포로서 확인되며, 선택적으로 여기서 세포는 BCMA(+) 및/또는 CD38(-)로부터 선택된 마커 중 하나 이상도 표시한다.
- [0090] 본 발명자들은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 자가면역 장애를 갖는 환자의 치료 또는 관리에 사용될 수 있음을 확인하였으며, 여기서 환자의 혈액 샘플은 다발성 골수종(MM) 환자의 가용성 BCMA 및/또는 정상 건강한 환자의 가용성 BCMA 양과 유사한 가용성 BCMA의 양을 가진다. 환자의 혈액 샘플(예: 분리된 혈청 또는 혈장) 중 가용성 BCMA는 ELISA, 예를 들어 Amersand Biosciences(Lake Clear, NY)의 비드 기반 면역분석을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0091] 일부 실시예에서, 자가면역 장애를 갖는 환자로부터의 혈액 샘플은 B 세포 악성종양(예를 들어, BCMA-발현 암)을 갖는 환자에서의 가용성 BCMA의 양보다 적은 양의 가용성 BCMA를 갖는다. 일부 실시예에서, 자가면역 장애가 있는 환자로부터의 혈액 샘플은 MM 환자에서 가용성 CMA의 양보다 적은 양, 바람직하게는 MM 환자에서 가용성 CMA의 양보다 약 1.5배 적은 양, 약 2배 적은 양, 약 2.5배 적은 양, 약 3배 적은 양, 약 3.5배 적은 양, 약 4배 적은 양, 약 4.5배 적은 양, 약 5배 적은 양, 약 5.5배 적은 양, 또는 약 6배 적은 양의 가용성 BCMA 양을 갖는다. 일부 실시예에서, 자가면역 장애가 있는 환자로부터의 혈액 샘플은 ELISA에 의해 측정 시 약 150ng/ml 미만, 약 100ng/ml 미만, 약 75ng/ml 미만, 약 50ng/ml 미만, 약 40ng/ml 미만, 약 35ng/ml 미만, 또는 약

30ng/ml 미만의 가용성 BCMA를 갖는다. 일부 실시예에서, 자가면역 장애가 있는 환자로부터의 혈액 샘플은 ELISA에 의해 측정된 정상인 건강한 사람의 가용성 BCMA 양의 가용성 BCMA의 양의 약 40ng/ml 이내, 약 30ng/ml 이내, 약 20ng/ml 이내, 약 15ng/ml 이내, 약 15ng/ml 이내, 10ng/ml, 또는 약 5ng/ml 이내의 가용성 BCMA의 양을 갖는다. 일부 실시예에서, 자가면역 장애가 있는 환자로부터의 혈액 샘플은 ELISA에 의해 측정 시 가용성 BCMA의 양이 적어도 5ng/ml, 적어도 7.5ng/ml, 적어도 10ng/ml, 적어도 12.5ng/ml, 또는 적어도 15ng/ml이다. 일부 실시예에서, 자가면역 장애가 있는 환자로부터의 혈액 샘플은 ELISA에 의해 측정 시 약 5ng/ml 내지 50ng/ml, 약 5ng/ml 내지 40ng/ml, 약 5ng/ml 내지 30ng/ml, 약 10ng/ml 내지 50ng/ml, 약 10ng/ml 내지 40ng/ml, 또는 약 10ng/ml 내지 30ng/ml의 가용성 BCMA의 양을 갖는다. ELISA로 측정한 환자의 혈액 샘플(예: 분리된 혈청 또는 혈장)의 가용성 BCMA는 Ampersand Biosciences(Lake Clear, NY)의 비드 기반 면역분석을 사용하여 측정할 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 형질모세포 및/또는 형질 세포에 의해 유발된 자가면역 장애를 갖는 환자의 치료 또는 관리에 사용될 수 있고, 여기서 환자는 정상적인 건강한 지원자의 형질모세포 BCMA 표면 수용체 밀도와 비교할만한 형질모세포 BCMA 표면 수용체 밀도를 갖는다.

- [0092] 일부 실시예에서, 자가면역 장애의 치료 또는 관리를 필요로 하는 환자는 항-BCMA 항체 코팅된 비드로 생성된 표준 곡선을 기반으로 하는 유세포 분석 시스템을 사용하여 측정했을 때 약 10,000 분자 미만, 약 5000 분자 미만, 약 2500 분자 미만 또는 약 2000 분자 미만의 형질모세포 상의 BCMA 표면 수용체 밀도를 갖는다.
- [0093] 일부 실시예에서, 자가면역 장애의 치료 또는 관리를 필요로 하는 환자는 항-BCMA 항체 코팅된 비드로 생성된 표준 곡선을 기반으로 하는 유세포 분석 시스템을 사용하여 측정했을 때, 약 500개 이상의 분자, 약 700개 이상의 분자, 약 900개 이상의 분자 또는 약 1000개 이상의 분자의 형질모세포 상의 BCMA 표면 수용체 밀도를 갖는다.
- [0094] 일부 실시예에서, 자가면역 장애의 치료 또는 관리가 필요한 환자는 항-BCMA 항체 코팅된 비드로 생성된 표준 곡선을 기반으로 하는 유세포 분석 시스템을 사용하여 측정했을 때, 약 800 내지 약 2200개 분자, 약 900 내지 2100개 분자, 또는 약 1000 내지 2000개 분자의 형질모세포 상의 BCMA 표면 수용체 밀도를 갖는다.
- [0095] 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 무치료 또는 참조 치료에 비해 환자의 형질모세포를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 100% 감소시킨다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질모세포를 75% 이상 감소시킨다. 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질모세포를 90% 이상 감소시킨다.
- [0096] 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 무치료 또는 참조 치료에 비해 환자의 형질 세포를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 100% 감소시킨다.
- [0097] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질 세포를 75% 이상 감소시킨다. 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질 세포를 90% 이상 감소시킨다.
- [0098] 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 무치료 또는 참조 치료에 비해 환자에서 형질 세포 및 형질 모세포를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%, 또는 100% 감소시킨다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질 세포 및 형질모세포를 75% 이상 감소시킨다. 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자의 형질 세포 및 형질모세포를 90% 이상 감소시킨다.
- [0099] AAV, SLE 또는 RA와 같은 자가면역 장애에 대한 기존 치료법에는 고용량의 스테로이드(예: 글루코코르티코이드)와 함께 사이클로포스파미드 및/또는 항-CD20 단일클론 항체(예: 리툽시맵)가 포함된다. 본 명세서에 사용된 용어 "참조 치료(reference treatment)"(예: AAV의 경우)는 바람직하게는 사이클로포스파미드, 리툽시맵 및/또는 스테로이드를 사용한 치료를 지칭한다. 대안적으로 또는 추가로, "참조 치료"(예: SLE 또는 RA)는 항-TNF 제제(예: 인플릭시맵, 아달리무맵, 골리무맵, 에타네르셉트), 항-IL6R 항체(예: 토실리주맵, 사릴루맵), 공동자극 차단(예: 아바타셉트), JAK 억제제(예: 토파시티닙, 바리시티닙) 및/또는 벨리무맵을 사용한 치료를 지칭한다. 추가 치료에는 사이클로포스파미드, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 마이코페놀레이트, 마이코페놀레이트 모페틸 및/또는 아바코판이 포함된다. 그러나, 그러한 기존 치료법이 항상 효과적이거나 및/또는 지속성(durable)이 있는 것은 아니다. 더구나, 그들은 유해한 작용을 일으킬 수 있다.

- [0100] 이론에 얽매이지 않고, 본 발명은 자가면역 장애를 유발하는 B-계통 세포, 예를 들어, 자가반응성 B-계통 세포, 예, 형질모세포, 형질 세포 및 기억 B 세포를 선택적으로 고갈시킬 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 자가면역 장애를 유발하는 B-계통 세포를 선택적으로 고갈시키지 않는 참조 치료에 비해 더 빠른 관해 유도(induction of remission) 및/또는 더 적은 비표적 효과(off-target effects) 초래할 수 있다.
- [0101] 일부 실시예에서, 치료 방법은 관해 유도를 위해 사용된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자에서 참조 치료에 비해 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 더 빠른 관해의 유도를 초래한다.
- [0102] 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 참조 치료에 비해 관해의 더 나은 유지를 초래할 수 있다.
- [0103] 예를 들어, 형질모세포 및 형질 세포의 고갈 후에, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 재발을 위해 성장 인자와 함께 배양 후에도 BCMA 음성으로부터 전구체 형질모세포 및 형질 세포(예를 들어, FACS 및/또는 IgG 분비에 의해 측정됨)의 회복을 억제 및/또는 지연시킬 수 있다.
- [0104] 추가로, 형질모세포 및 형질 세포의 고갈 후, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 항체, 예를 들어, CpG로 자극한 후에도 자가면역 장애를 일으키는 자가항체의 생성을 억제 및/또는 지연할 수 있다.
- [0105] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 형질모세포/형질 세포 분화를 유도하기 위한 IL-2, BAFF, 및 IL-21 또는 CpG(ODN2006)에 의한 자극에도 불구하고 IgG 항체의 생성을 억제 및/또는 지연시킨다. 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 CpG(ODN2006 10 μ g/mL), IL-2(20 U/mL), BAFF(200ng/mL) 및 IL-21(100ng/mL)을 7일 동안 자극하기 전에 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 EC50 농도에서 단리된 말초혈액 단핵 세포(PBMC)와 함께 배양될 수 있고, 그 후 IgG 농도는 ELISA로 측정 시 약 4000pg/mL 미만, 약 3500pg/mL 미만, 약 3000pg/mL, 약 2500pg/mL 미만, 또는 약 2000pg/mL 미만일 수 있다. 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 대안적으로 CpG(ODN2006 10 μ g/mL), IL-2(20U/mL), BAFF(200ng/mL) 및 IL-21(100ng/mL)로 7일 동안 자극하기 전에 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 EC90 농도에서 단리된 말초혈액 단핵 세포(PBMC)와 함께 배양될 수 있고, 그 후 IgG 농도는 ELISA에 의해 측정 시 약 2000pg/mL 미만, 약 1800pg/mL 미만, 약 1000pg/mL 미만, 또는 약 500pg/mL 미만일 수 있다.
- [0106] 일부 실시예에서, 치료 방법은 관해의 유도 및 유지를 위해 사용된다. 일부 실시예에서, 방법은 관해 유지를 위해 사용된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 참조 치료에 비해 환자에서 관해의 유지를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 연장시킨다.
- [0107] 일부 실시예에서, 자가면역 장애는 재발성 또는 난치성이다. 본 명세서에 사용된 용어 "재발(relapsed)"은 개선 기간 후 장애 또는 장애의 징후 및 증상의 복귀를 의미하는 것으로 의도된다. 본 명세서에 사용된 용어 "난치성(refractory)"은 특정 장애가 특정 치료제를 사용한 요법에 내성이 있거나 반응하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 장애는 특정 치료제를 사용한 치료 시작부터(즉, 치료제에 대한 초기 노출에 반응하지 않음) 또는 치료제에 대한 내성이 발달한 결과로서, 치료제를 사용한 제1 치료 기간 동안 또는 치료제를 사용한 후속 치료 기간 동안 특정 치료제를 사용한 요법에 대해 난치성(refractory)일 수 있다.
- [0108] 일부 실시예에서, 자가면역 장애는 다음에 대해 재발성이거나 난치성이다: 시클로포스파미드, 항-CD20 모노클로날 항체(예: 리툭시맵), 글루코코르티코이드(예: 메틸프레드니솔론, 텍사메타손), 항염산제(예: 메토틱렉세이트), 퓨린 합성 억제제(예: 아자티오프린, 미코페놀레이트, 미코페놀레이트 모페틸), C5a 억제제(예: 아바코판), 항-CD19 항체, BAFF/APRIL 길항제, 프로테아좀 억제제(예: 보르테조미드), 항-CD22 단일클론 항체, 항-TNF 제제(예: 인플릭시맵, 아달리무맵, 골리무맵, 에타네르셉트), 항-IL6R 항체(예: 토실리주맵, 사틸루맵), 공동자극 차단(예: 아바타셉트), JAK 억제제(예: 토파시티닙, 바리시티닙), 벨리루맵, 및/또는 브루톤의 티로신 키나제(BTK) 억제제.
- [0109] 대안적 실시예에서, 자가면역 장애가 새로 진단된다.
- [0110] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체로 치료할 수 있는 자가면역 장애는 다음을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다: 이완불능, 애디슨병, 급성 염증성 탈수초성 다발신경병증 - AIDP, 성인 스틸병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항GBM/항TBM 신염, 항PAD4 활성화 류마티스 관절염, 항인지질 피부염(antiphospholipid syndrome), 천식, 아토피 피부염, 자가면역 혈관부종, 자가면역 자율신경이상증, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 간염, 자가면역 내이질환(AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 자가면역

역 교환염, 자가면역 채장염, 자가면역 망막병증, 자가면역 혈소판 감소증, 자가면역 두드러기, 축삭 및 신경 신경병증(AMAN), 발로병, 베체트병, 양성 점막 천포창, 수포성 천포창, 캐슬만병(CD), 체강 질환, 샤가스병, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증(CIDP), 만성 재발성 다초점 골수염(CRMO), 처그-스트라우스 증후군(CSS) 또는 호산구성 육아종증(EGPA), 간질성 천포창, 코간 증후군, 한랭응집소병, 선천성 심장차단, 콕사키 심근염, CREST 증후군, 크론병, 피부염, 포진성 피부염, 피부근염, 테빅병(시신경척수염), 당뇨병, 원반형 루푸스, 드레슬러 증후군, 자궁내막증, 호산구성 식도염(EoE), 호산구성 근막염, 결절 홍반, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 에반스 증후군, 섬유 근육통, 섬유화 폐포염, 거대 세포 동맥염(측두 동맥염), 거대 세포 심근염, 굿파스처 증후군, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 하시모토 갑상선염, 자가면역 용혈성 빈혈, 헤노흐-쑤라인 자반병(HSP), 임신 포진 또는 천포창 임신(PG), 히드라데니티스수프라티바(HS)(Acne Inversa), 저감마글로불린혈증, 특발성 막성 신병증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, IgA 신병증, IgG4 연관 질환, IgG4 연관 경화성 질환, IgG 신경병증, IgM 다발신경병증, 면역 혈소판 감소성 자반병(ITP), 봉입체 근염 (IBM), 염증성 장 질환(IBM), 간질성 방광염(IC), 소아 관절염, 소아 당뇨병(1형 당뇨병), 소아 근염(JM), 가와 사키병, 램버트-이튼 증후군, 백혈구 세포성 혈관염, 편평태선, 경화성 태선, 목질 결막염, 선형 IgA 질환 (LAD), 루푸스, 만성 라임병, 막성 신병증, 메니에르병, 현미경적 다발혈관염(MPA), 혼합 결합 조직 질환 (MCTD), 무렌 궤양, 무하-하버만병, 다초점 운동 신경병증(MMN) 또는 MMNCB, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 기면증, 신생아 루푸스, 시신경척수염, 호중구감소증, 안구 반점천포창, 시신경염, 회문류머티즘(PR), PANDAS, 부종양 소뇌 변성(PCD), 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 패리 롬버그 증후군, 평면염(말초 포도막염), Parsonage-Turner 증후군, 펠피구스, 펠피구스 불가리스, 펠피구스 폴리야세우스, 말초 신경병증, 뇌척수염, 악성 빈혈(PA), POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, 다선 증후군 유형 I, II 및 III, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성근염, 심근경색후 증후군, 심낭절개 증후군, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 프로게스테론 피부염, 건선, 건선성 관절염, 순수 적혈구 무형성증(PRCA), 괴저성 농피증, 레이노 증후군, 반응성 관절염, 반사 교감신경 이영양증, 재발성 다발연골염, 하지불안 증후군(RLS), 후복막 섬유증, 류마티스열, 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 유육종증, 슈미트 증후군, 공막염, 경피증, 고형장기 이식에서 감각/예비형성된 항체, 쇼그렌 증후군, 정자 및 고환 자가면역, 강직인 증후군(UPS), 전신홍반루푸스(SLE), 아급성세균성심내막염(SBE), 수작증후군, 교감성안염(SO), 타카야스동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 혈소판 감소성 자반병, 혈전성 혈소판 감소성 자반병(TTP), 톨로사-헌트 증후군(THS), 횡단 척수염, 1형 당뇨병, 궤양성 대장염(UC), 미분화 결합 조직 질환(UCTD), 포도막염, 혈관염, 백반증, 보그트-코야나기-하라다병, 및 베게너병.

- [0111] 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 IgG4-연관 질환이 아니다. 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 AAV (예를 들어, 재발 또는 난치성 AAV), SLE(예를 들어, 재발 또는 난치성 SLE), 또는 류마티스 관절염(예를 들어, 재발 또는 난치성 류마티스 관절염)이다. 특히 바람직한 실시예에서, 자가면역 장애는 AAV(예를 들어, 재발 또는 난치성 AAV) 또는 류마티스 관절염(예를 들어, 재발 또는 난치성 류마티스 관절염)이다.
- [0112] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 AAV를 치료하거나 관리한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 류마티스 관절염을 치료 또는 관리한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SLE를 치료하거나 관리한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 AAV 및 류마티스 관절염을 치료 또는 관리한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 AAV, SLE 및 류마티스 관절염을 치료 또는 관리한다.
- [0113] 한 측면에서, 본 발명은 AAV를 치료 또는 관리하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 이러한 치료 또는 관리를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간)에게 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 다중특이적 항체는 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합한다.
- [0114] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체(예를 들어, 인간)에서 AAV를 치료하거나 관리하는데 사용하기 위하여 BCMA 및 하나 이상의 T 세포(예를 들어, CD3)의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체를 제공한다.
- [0115] 한 측면에서, 본 발명은 류마티스 관절염(예: 재발성 또는 난치성 류마티스 관절염)을 치료 또는 관리하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 이러한 치료 또는 관리가 필요한 대상체(예: 인간)에게 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 다중특이적 항체가 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합한다.
- [0116] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체(예: 인간)에서 류마티스 관절염(예: 재발성 또는 난치성 류마티스 관절

염)을 치료 또는 관리하는데 사용하기 위한 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 제공한다.

- [0117] 한 측면에서, 본 발명은 SLE(예를 들어, 재발성 또는 난치성 SLE)를 치료하거나 관리하는 방법을 제공하며, 이 방법은 이러한 치료 또는 관리를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간)에게 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 다중특이적 항체는 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합한다.
- [0118] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체(예: 인간)에서 SLE(예: 재발성 또는 난치성 SLE)를 치료 또는 관리하는데 사용하기 위한 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 제공한다.
- [0119] **T 세포 매개 용해, T 세포 활성화 및 사이토카인 생산(T-cell mediated lysis, T-cell activation and cytokine production)**
- [0120] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 하나 이상의 T 세포(예를 들어, CD3)의 활성화를 촉진하는 항원에 결합한다. 본 명세서에 사용된 용어 "T 세포 항원(T cell antigen)"은 하나 이상의 T 세포(예를 들어, CD3)의 활성화를 촉진하는 항원을 지칭한다.
- [0121] 바람직한 실시예에서, T 세포 항원(예: CD3)은 인간 T 세포 항원(예: 인간 CD3)이다. 바람직한 실시예에서, T 세포 항원은 CD3이다.
- [0122] 따라서, T 세포 항원(예: CD3)에 대한 본 발명의 다중특이적(예: 이중특이적) 항체의 결합은 T 세포를 BCMA-발현 세포로 동원하여 BCMA-발현 세포(예: 형질모세포, 형질 세포 및/또는 메모리 B 세포)의 용해를 초래할 수 있다.
- [0123] 따라서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 세포독성 T 세포를 BCMA-발현 세포로 재지정(redirecting)함으로써 BCMA-발현 세포(예를 들어 형질모세포, 형질 세포 및/또는 기억 B 세포)의 선택적 고갈을 유도할 수 있다.
- [0124] 본 발명자들은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 예를 들어, 다발성 골수종과 같은 B 세포 악성 종양과 같이 높은 T:E 비율을 특징으로 하는 질병의 치료에 필요한 것보다 작동체 T 세포에 대한 표적 BCMA 발현 세포의 낮은 비율(T:E 비율)을 특징으로 하는 장애, 예를 들어 자가면역 장애의 치료에서 더 낮은 용량으로 투여될 수 있음을 확인하였다.
- [0125] 따라서, 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 자가면역 장애를 갖는 대상체에게 투여되고, 여기서 개체의 BCMA 발현 세포 대 작동체 T 세포의 비가 약 1:15 미만, 약 1:30, 약 1:50 미만, 약 1:100 미만, 또는 1:500 미만이다. BCMA 발현 세포 대 작동체 T 세포의 비율(T:E 비율)은 자가면역 장애가 있는 대상체로부터 분리된 체액 샘플, 예를 들어 자가면역 장애를 갖는 대상체로부터의 혈액 샘플, 골수 흡인물(bone marrow aspirate) 또는 활액(synovial fluid)에서 측정될 수 있다.
- [0126] 본 발명자들은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 본 명세서에 개시된 자가면역 장애(예를 들어 BCMA-발현 B 계통 세포에 의해 유발된 자가면역 장애)의 치료에서 B 세포 악성 종양(예: 다발성 골수종과 같은 BCMA-발현 암)의 치료에서 필요한 것보다 낮은 용량으로 치료 효과를 달성할 수 있음을 확인하였다. 특히, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 자가면역 장애의 병원성 세포(예를 들어, BCMA-발현 자가반응성 B 계통 세포)의 용해(lysis)를 다발성 골수종의 병원성 세포(예: BCMA-발현 악성 세포)의 용해에 필요한 용량보다 낮은 용량(예를 들어, 10배 내지 100배 더 낮은 용량)으로 달성할 수 있다.
- [0127] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 T 세포(예: CD3) 및 BCMA의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법을 제공하며, 여기서 치료는 약 0.01mg 내지 약 1mg의 용량으로 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 투여를 포함한다. 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 본 명세서에 개시된 CC-93269 항체인 실시예에서, 용량은 약 0.01mg 내지 약 1mg 일 수 있다.
- [0128] 본 명세서에 개시된 측면 중 임의의 것의 일부 실시예에서, 치료는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의, 예를 들어, 1회 이상의 용량, 예를 들어 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 2회 이상의 용량 또는 3회 이상의 용량을 포함한다. 대안적 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 최대 3회 용량, 예를 들어 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 최대 2회 또는 단일 용량이 투여된다. 바람직한 실시예에서,

다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 단일 용량이 투여된다.

- [0129] 특히 바람직한 실시예에서, 치료는 약 0.01mg 내지 약 1mg의 용량으로 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 단일 용량을 포함한다.
- [0130] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 질환이 있는 환자로부터 단리된 PBMC)와 배양될 때 형질모세포 용해를 달성하며, 여기서 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 BCMA-발현 암 세포(예: JEKO-1 세포주 또는 MM 세포주)를 사멸시키는 데 필요한 것보다 낮은 농도이다.
- [0131] PBMC는 예를 들어 RPMI + 10% HI FBS에 재현탁된 Ficoll 구배(Ficoll gradient)를 사용하여 전혈 샘플에서 분리할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 24시간 동안 전혈(예를 들어 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 전혈 샘플)과 함께 배양될 때 형질모세포 용해를 달성하며, 여기서 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 BCMA-발현 암 세포(예: JEKO-1 세포주 또는 MM 세포주)를 사멸시키는 데 필요한 것보다 낮은 농도에 있다. 형질모세포 고갈은 FACS에 의해 측정되어 형질모세포가 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1nM 미만, 약 0.8nM 미만, 약 0.6nM 미만, 약 0.4nM 미만, 약 0.3nM 미만 또는 약 0.25nM 미만, 약 0.2nM 미만, 약 0.1nM 미만, 약 0.05nM, 약 0.02nM 미만, 약 0.01nM 미만, 또는 약 0.005nM 미만보다 낮은 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 인큐베이션될 때 형질모세포의 용해를 달성할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1nM 이하, 약 0.8nM 이하, 약 0.6nM 이하, 약 0.4nM 이하, 약 0.3nM 이하, 약 0.25nM 이하, 약 0.02nM 이하, 약 0.01nM 이하, 약 0.007nM 이하, 또는 약 0.005nM 이하의 농도에서 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 배양될 때 형질모세포의 50% 용해를 달성한다. 형질모세포 고갈은 FACS에 의해 측정되어 형질모세포가 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별된다.
- [0132] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1nM 미만, 약 0.8nM 미만, 약 0.6nM 미만, 약 0.4nM 미만, 약 0.3nM 미만, 약 0.2nM 미만, 약 0.1nM 미만, 약 0.08nM 미만 또는 약 0.06nM 미만의 90% 유효 농도(EC90)에서 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 배양될 때 형질모세포의 용해를 달성할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1nM 미만, 약 0.8nM 미만, 약 0.6nM 미만, 약 0.4nM 미만, 약 0.3nM 미만, 약 0.2nM 미만, 약 0.1nM 미만, 약 0.08nM 미만 또는 약 0.06nM 미만의 농도에서 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 배양될 때 형질모세포의 90% 용해를 달성한다. 형질모세포 고갈은 FACS에 의해 측정되어 형질모세포가 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별된다.
- [0133] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 24시간 동안 약 1nM 미만, 약 0.9nM 미만, 약 0.8nM 미만, 약 0.7nM 미만, 또는 약 0.6nM 미만의 99% 이하의 유효 농도(EC99)에서 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 배양될 때 형질모세포의 용해를 달성할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1nM 미만, 약 0.9nM 미만, 약 0.8nM 미만, 약 0.7nM 미만, 또는 약 0.6nM 미만의 농도에서 24시간 동안 단리된 PBMC(예를 들어 자가면역 장애 환자로부터 단리된 PBMC)와 함께 배양될 때 형질모세포의 99% 용해를 달성한다. 형질모세포 고갈은 FACS에 의해 측정되어 형질모세포가 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별된다.
- [0134] 사이토카인 방출 증후군(CRS)은 다발성 골수종과 같은 암 치료를 위한 T 세포-결합 면역 요법의 가장 빈번한 심각한 부작용 중 하나이다(Shimabukuro-Vornhagen, A. et. al (2018) Cytokine release syndrome. J Immunother Cancer, 6(1) 56). 이론에 얽매이지 않고, CRS는 예를 들어 면역 작동체 세포의 활성화 및/또는 증식으로 인해 사이토카인의 대량 및/또는 신속한 분비로 인해 발생할 수 있다. IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10 및/또는 그랜자임 B와 같은 증가된 사이토카인 수준은 T 세포-결합 면역요법(T cell-engaging immunotherapies)으로 다발성 골수종을 치료한 후 관찰된다.
- [0135] 자가면역 장애는 치료 이전에도 높은 사이토카인 수준과 연관된다(Kunz, M. and Ibrahim, S. (2009) Cytokines and Cytokine Profiles in Human Autoimmune Diseases and Animal Models of Autoimmunity. Mediators of Inflammation, Article ID 979258; and Andreaskos et. al (2002), Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. Cytokine & Growth Factor Reviews, Issues 4-5, Pages 299-313 참조). T 세포-결합면역 요법은 자가면역 장애에 대한 매력적이지 않은 요법으로 간주될 수 있다. 그러나, 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 유의한 T 세포 활성화 없이 또는 최소

T 세포 활성화 및 유의한 사이토카인 없이 생산 또는 최소 사이토카인 생산으로 본 발명의 자가면역 장애에 대해 치료학적 유효량으로 투여될 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 T 세포 활성화 및/또는 사이토카인 생산과 관련된 부작용, 예를 들어 CRS의 위험을 최소화하면서 본 발명의 자가면역 장애를 치료하거나 관리할 수 있다.

[0136] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 T 세포(예: CD3) 및 BCMA의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법을 제공하며, 여기서 치료는 유의한 T 세포 활성화 없이 또는 최소 T 세포 활성화로 치료 유효량으로 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 투여를 포함한다.

[0137] 본 명세서에 사용된 "유의한 T 세포 활성화 없음 또는 최소 T 세포 활성화(no significant T cell activation or minimal T cell activation)"는 CD69의 표면 발현에 의해 측정되었을 때, 단리된 PBMC 또는 전혈(예: 자가면역 질환이 있는 환자의 단리된 PBMC 또는 전혈)의 베이스라인 위로 활성화된 T 세포의 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만을 지칭한다.

[0138] 바람직하게는, "유의한 T 세포 활성화 없음 또는 최소 T 세포 활성화(no significant T cell activation or minimal T cell activation)"는 활성화 메이커 CD69의 표면 발현에 의해 측정되었을 때, 단리된 PBMC 또는 전혈(예: 단리된 PBMC 또는 자가면역 질환이 있는 환자의 전혈)의 베이스라인을 초과하여 활성화된 T 세포의 20% 미만을 의미한다. 바람직하게는, T-세포 활성화는 CD3+ T 세포(예를 들어, CD3+ CD4+ T 세포 또는 CD3+ CD8+ T 세포, 또는 둘 다)에 대해 보고된다.

[0139] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 활성화된 T 세포의 "베이스라인"(예: CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 "베이스라인")은 분리된 PBMC 또는 전혈(예: 분리된 PBMC 또는 자가면역 장애가 있는 환자의 전혈)의 대조군 샘플에서 관련 활성화 마커(예: CD69)를 발현하는 연관 T 세포(예: CD8(+) T 세포)의 백분율로 정의된다. 바람직하게는, 대조군 샘플은 대조군 항-CD3 항체, 예를 들어, 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리된다. 바람직하게는, T-세포 활성화는 CD3+ T 세포(예를 들어, CD3+ CD4+ T 세포 또는 CD3+ CD8+ T 세포, 또는 둘 다)에 대해 보고된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애를 갖는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 배양될 때 유의한 T 세포 활성화가 존재하지 않거나 최소 T 세포 활성화가 존재한다.

[0140] T 세포 활성화는 T 세포 계통(CD3, CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25 및 CD154)를 염색하여 측정할 수 있다. 바람직하게는, T-세포 활성화는 CD3+ T 세포(CD3+ CD4+ T 세포 또는 CD3+ CD8+ T 세포, 또는 둘 다)에 대해 보고된다.

[0141] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어 자가면역 장애가 있는 환자로부터 분리된 PBMC 또는 전혈)로 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 배양되었을 때, CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 유의한 증가가 없거나 또는 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 최소 증가가 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 약 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만이 존재한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 빈도 증가가 없다.

[0142] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때 CD69 및 CD8(+)을 발현하는 CD4(+) T 세포의 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 약 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만이 존재한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때 CD69를 발현하는 CD4(+) T 세포 및 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포가 베이스라인 위로 증가하지 않는다.

[0143] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전

혈)과 함께 배양될 때 유의한 T 세포 활성화가 없거나 또는 최소 T 세포 활성화가 존재한다. T 세포 활성화는 T 세포 계통(CD3, CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25 및 CD154)를 염색하여 측정할 수 있다. 바람직하게는, T-세포 활성화는 CD3+ T 세포(CD3+ CD4+ T 세포 또는 CD3+ CD8+ T 세포, 또는 둘 다)에 대해 보고된다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 유의한 증가가 없거나 또는 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 최소 증가가 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 약 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만이 존재한다.

[0144] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD4(+) T 세포 및 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 약 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만이 존재한다.

[0145] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD4(+) T 세포 및 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 증가가 없다.

[0146] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 24시간 동안 형질모세포 용해를 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 베이스라인 위로 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만이 존재한다. 바람직하게는, T-세포 활성화는 CD3+ T 세포(CD3+ CD4+ T 세포 또는 CD3+ CD8+ T 세포, 또는 둘 다)에 대해 보고된다.

[0147] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 24시간 동안 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 수가 베이스라인 위로 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 만큼 증가되는 농도에서 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 형질모세포의 40% 초과, 45% 초과, 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과 또는 약 100%의 용해(lysis)를 달성할 수 있다.

[0148] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 CD69를 발현하는 CD8(+) T 세포의 수가 베이스라인 위로 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만인 농도에서 24시간 동안 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 장애 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 배양될 때, 형질모세포의 약 50%, 약 90%, 또는 약 99%의 용해를 달성할 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 T 세포(예: CD3) 및 BCMA의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법을 제공하며, 여기서 치료는 유의미한 사이토카인 생산 없이 또는 최소 사이토카인 생산을 갖는 치료적 유효량으로 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0149] 본 명세서에 사용된 "유의한 사이토카인 생산 없음 또는 최소 사이토카인 생산(no significant cytokine production or minimal cytokine production)"은 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 단리된 자가면역질환 환자의 PBMC 또는 전혈)의 베이스라인 초과 20pg/mL 미만, 10pg/mL 미만 또는 5pg/mL 미만 사이토카인 수준을 지칭한다. 바람직하게는, "유의한 사이토카인 생산 없음 또는 최소 사이토카인 생산"은 공여자 샘플에서 베이스라인 사이토카인 수준 초과 5pg/mL 미만인 사이토카인 수준을 지칭한다. 사이토카인 수준은 MSD 전염증 I 분석을 사용하여 측정할 수 있다.

[0150] 본 명세서에 사용된 "베이스라인(baseline)" 사이토카인 수준(예: IFN γ 의 "베이스라인" 수준)은 단리된 PBMC 또는 전혈(예: 자가면역 장애가 있는 환자의 단리된 PBMC 또는 전혈)의 대조군 샘플에서 연관 사이토카인(예: IFN γ)의 수준으로 정의된다. 바람직하게는, 대조군 샘플은 대조군 항-CD3 항체, 예를 들어, 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리된다. 사이토카인 수준은 MSD 전염증(Pro-inflammatory) I 분석을 사용하여 측정할 수 있다.

- [0151] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 배양될 때 유의한 사이토카인 생산이 없거나 또는 최소 사이토카인 생산이 존재한다. 사이토카인: IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-1 β , 그랜자임 B 및/또는 퍼포린(perforin)의 생산은 MSD 전염증 I 분석을 사용하여 측정된다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 배양될 때, 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인(예를 들어, IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-1 β , 그랜자임 B 및/또는 퍼포린)의 수준은 베이스라인 위로 50pg/mL 미만, 20pg/mL 미만, 10pg/mL 미만 또는 5pg/mL 미만이다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 배양될 수 있을 때, IFN γ 의 증가가 없거나 IFN γ 의 최소 증가가 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 배양될 때, IFN γ 의 수준은 베이스라인 위로 50pg/mL 미만, 20pg/mL 미만, 10pg/mL 미만 또는 5pg/mL 미만이다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 IFN γ 가 베이스라인 위로 약 50pg/ml 미만, 약 10pg/ml 미만, 또는 약 5pg/ml 미만 만큼 증가되는 농도에서 24시간 동안 배양될 때, 형질모세포의 40% 초과, 45% 초과, 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 형질모세포의 90% 초과, 95% 초과 또는 약 100%의 용해를 달성할 수 있다.
- [0152] 항IL-6 수용체 요법(Anti-IL-6 receptor therapy)은 CRS를 유도하는 IL-6의 중심 역할을 고려할 때 CRS를 치료하는 데 사용된다(Shimabukuro-Vornhagen, A. et. al (2018) Cytokine release syndrome. J Immunother Cancer, 6(1) 56). 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 단리된 PBMC 또는 전혈(예를 들어, 자가면역 질환이 있는 환자로부터의 단리된 PBMC 또는 전혈)과 함께 형질모세포 용해를 위한 50% 유효 농도(EC50)에서 24시간 동안 배양될 때, IL-6의 수준은 베이스라인 위로 10pg/mL 미만 또는 5pg/mL 미만이다.
- [0153] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 T 세포(예: CD3) 및 BCMA의 활성화를 촉진하는 항원에 결합하는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 사용한 자가면역 장애의 치료 또는 관리 방법을 제공하며, 여기서 치료는 최소 CRS로 치료 유효량에서 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 "최소 CRS(minimal CRS)"는 환자에서 참조 치료에 비해 CTCAE v. 5.0 등급 1 사이토카인 방출 증후군(CRS)의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 만큼 낮추어진 발생률을 가리킨다. 바람직하게는, "최소 CRS"는 CTCAE v. 5.0 1등급 CRS를 지칭한다. CTCAE v. 5.0 1등급 CRS는 NIH의 National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD), Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP)에 의해 정의된다.
- [0155] 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자에서 사이토카인 방출 증후군의 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 낮춘다.
- [0156] 일부 실시예에서, 본 발명의 치료 또는 관리 방법은 환자에서 감염 발생률을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 적어도 95%, 또는 100% 낮춘다.
- [0157] **다중특이적 항체**
- [0158] 본 발명의 다중특이적(예: 이중특이적) 항체는 BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 특이적으로 결합한다. 용어 "BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 대한 항체(antibody against BCMA and an antigen that promotes activation of one or more T cells (e.g. CD3))", 또는 "BCMA 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합하는 항체(an antibody that binds to BCMA and to an antigen that promotes activation of one or more T cells (e.g. CD3))"는 BCMA 및 항체가 치료제로 유용하기에 충분한 친화도로 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합할 수 있는 다중특이적(예: 이중특이적) 항체를 가리킨다. 이는 BCMA에 결합하는 제1 항체, 또는 항원-결합 단편, 및 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원(예: CD3)에 결합하는 제2 항체, 또는 항원-결합 단편을 포함하는

분자를 제조함으로써 달성된다. 그러한 다중특이적 항체는 삼중특이적 항체 또는 이중특이적 항체일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다.

- [0159] 본 명세서에 사용된 용어 "BCMA"는 BCMA로도 공지된 인간 B 세포 성숙 항원(human B cell maturation antigen; TR17_HUMAN, TNFRSF17(UniProt Q02223))에 관한 것으로, 이는 분화된 형질 세포에서 우선적으로 발현되는 종양 괴사 수용체(tumor necrosis receptor) 슈퍼패밀리의 구성원이다. BCMA의 세포 외 도메인은 UniProt에 따라 아미노산 1-54(또는 5-51)로 구성된다. 본 명세서에 사용된 용어 "BCMA에 대한 항체", "항-BCMA 항체" 또는 "BCMA에 결합하는 항체"는 BCMA의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.
- [0160] 용어 "BCMA에 특이적으로 결합하는(specifically binding to BCMA)"은 항체가 BCMA를 표적화함에 있어 치료제로 유용하도록 하는 충분한 친화도로 정의된 표적에 결합할 수 있는 항체를 가리킨다. 일부 실시예에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 항원에 결합하지 않거나 생리학적 효과를 생성하기에 충분한 친화도로 다른 항원에 결합하지 않는다.
- [0161] 일부 실시예에서, 비연관 비-BCMA 단백질에 대한 항-BCMA 항체의 결합 정도는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)(예. Biacore®), ELISA(enzyme-linked immunosorbent) 또는 유세포 분석(FACS)에 의해 측정되었을 때 BCMA에 대한 항체의 결합보다 약 10배, 바람직하게는 >100배 더 작다. 일 실시예에서, BCMA에 결합하는 항체는 10-8M 이하, 바람직하게는 10-8M 내지 10-13M, 바람직하게는 10-9M 내지 10-13M의 해리 상수(Kd)를 갖는다.
- [0162] 일 실시예에서, 항-BCMA 항체는 상이한 종으로부터의 BCMA, 바람직하게는 인간 및 시노몰구스, 추가로 바람직하게는 또한 마우스 및 래트 BCMA에 보존된 BCMA의 에피토프에 결합한다.
- [0163] 바람직하게는, 항-BCMA 항체는 인간 BCMA 및 비-인간 포유동물 기원의 BCMA, 바람직하게는 시노몰구스, 마우스 및/또는 래트로부터의 BCMA로 이루어진 BCMA 그룹에 특이적으로 결합한다. 항-BCMA 항체는 플레이트-결합 BCMA를 사용하여 인간 BCMA에 대한 결합에 대해 ELISA에 의해 분석된다. 이 분석을 위해 플레이트-결합(plate-bound) BCMA의 양은 바람직하게는 1.5 μ g/mL이고 농도는 0.1pM 내지 200nM 범위의 항-BCMA 항체가 사용된다.
- [0164] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 하나 이상의 T 세포, 예를 들어, T 세포 항원의 활성화를 촉진하는 항원에 결합한다. 바람직한 실시예에서, T 세포 항원은 인간 T 세포 항원이다. 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR ζ , ICOS, CD28, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, SLAM, CD2, 또는 CD226으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 T 세포의 활성화를 촉진하는 항원은 CD3, 예를 들어 인간 CD3이다. 따라서, 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 CD3, 예를 들어, 인간 CD3에 결합한다.
- [0165] 용어 "CD3"은 인간 CD3 단백질 다중-서브유닛 복합체(multi-subunit complex)를 지칭한다. CD3 단백질 다중-서브유닛 복합체는 6개의 독특한 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 따라서 이 용어는 CD3 γ 사슬(SwissProt P09693), CD3 δ 사슬(SwissProt P04234), 2개의 CD3 ϵ 사슬(SwissProt P07766) 및 1개의 CD3 ζ 사슬 동종이량체(SwissProt 20963)를 포함하며, 이는 T 세포 수용체 α 및 β 사슬과 연관된다. 이 용어는 "전장(full-length)", 처리되지 않은 CD3 뿐만 아니라 세포(T 세포 포함)에 의해 자연적으로 발현되거나 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 또는 cDNA로 형질감염된 세포에서 발현될 수 있는 임의의 CD3 변이체(variant), 이소형(isoform) 및 종 상동체(species homolog)를 포괄한다.
- [0166] 용어 "CD3에 특이적으로 결합하는(specifically binding to CD3)"은 항체가 CD3을 표적화하는데 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 정의된 표적에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 일부 실시예에서, CD3에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 항원에 결합하지 않거나 생리학적 효과를 생성하기에 충분한 친화도로 다른 항원에 결합하지 않는다.
- [0167] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SPR, 예를 들어 CD3 결합용 Biacore®에 의해 분석될 수 있다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 바람직하게는 25°C에서 Biacore 8K를 사용하여 측정된 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정되었을 때, 약 10-7M 이하의 해리 상수(KD), 약 10-8M 이하의 KD, 약 10-9M 이하의 KD, 약 10-10M 이하의 KD, 약 10-11M 이하의 KD, 또는 약 10-12M 이하의 KD로 인간 CD3에 결합한다. 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 10-8M 이하의 해리 상수(KD)로 인간 CD3에 결합한다.
- [0168] 본 명세서에서 용어 "항체(antibody)"는 원하는 항원-결합 활성(antigen-binding activity)을 나타내는 한 단 일클론 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 및 항체 단편을 포함하나 이에 제한되

지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다.

- [0169] "중쇄(heavy chain)"는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 "VH"로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역(본 명세서에서 "CH"로 약칭됨)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3(항체 부류 IgA, IgD 및 IgG) 및 선택적으로 중쇄 불변 도메인 CH4(항체 부류 IgE 및 IgM)를 포함한다.
- [0170] "경쇄(light chain)"는 경쇄 가변 도메인(본 명세서에서 "VL"로 약칭됨) 및 경쇄 불변 도메인(본 명세서에서 "CL"으로 약칭됨)을 포함한다. 가변 영역 VH 및 VL은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(complementarity determining regions, CDR)이라고 하는 초가변 영역(regions of hypervariability)으로 더 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 "불변 도메인(constant domains)"은 항체가 표적에 결합하는 데 직접적으로 관여하지 않지만 다양한 작동체 기능을 나타낸다.
- [0171] 항체와 이의 표적 항원 또는 에피토프 간의 결합은 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 매개된다.
- [0172] CDR은 항원-결합 부위(antigen-binding site)를 형성하는 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 내에 위치하는 서열 가변성이 높은 영역이다. CDR은 항원 특이성의 주요 결정 요인이다. 전형적으로, 항체 중쇄 및 경쇄는 각각 비연속적으로 배열된 3개의 CDR을 포함한다. 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화성에서 특히 중요한 역할을 하므로 본 발명의 추가적 측면을 제공한다.
- [0173] 본 명세서에 사용된 용어 "항원 결합 단편(antigen binding fragment)"은 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR, 및/또는 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 항원 결합 폴리펩티드의 임의의 자연 발생 또는 인공적으로 구성된 구성(configuration)을 포함하며, 여기서 폴리펩티드는 항원에 결합할 수 있다. 따라서, 이 용어는 온전한 항체(intact antibody)가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예: scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체를 포함하나 이에 국한되지는 않는다.
- [0174] 용어 "Fab 단편(Fab fragment)" 및 "Fab"는 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되며 단일 경쇄(즉, 불변 도메인 CL 및 VL) 및 단일 중쇄(즉, 불변 도메인 CH1 및 VH)를 함유한다. Fab 단편의 중쇄는 다른 중쇄와 디설파이드 결합을 형성할 수 없다.
- [0175] "Fab' 단편(Fab' fragment)"은 단일 경쇄 및 단일 중쇄를 함유하지만 CH1 및 VH 외에도 "Fab' 단편"은 사슬간 디설파이드 결합의 형성에 요구되는 CH1 및 CH2 사이의 중쇄의 영역들을 함유한다. 따라서, 두 개의 "Fab' 단편"은 디설파이드 결합의 형성을 통해 연관(associate)되어 F(ab')₂ 분자를 형성할 수 있다.
- [0176] "F(ab')₂ 단편"은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함한다. 각 사슬은 2개의 중쇄 사이에 사슬간 디설파이드 결합의 형성에 필요한 불변 영역의 일부를 포함한다.
- [0177] "Fv 단편"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역만을 포함한다. 그것은 불변 영역을 함유하지 않는다.
- [0178] "단일-도메인 항체(single-domain antibody)"는 단일 항체 도메인 단위(예를 들어, VH 또는 VL)를 함유하는 항체 단편이다.
- [0179] "단일-사슬 Fv("scFv")는 단일 사슬을 형성하기 위해 함께 연결된 항체의 VH 및 VL 도메인을 함유하는 항체 단편이다. 폴리펩티드 링커가 일반적으로 scFv의 VH 및 VL 도메인을 연결하는 데 사용된다.
- [0180] TandAb®로도 알려진 "탠덤 scFv"는 유연한 펩티드 링커를 사용하여 탠덤 배향으로 2개의 scFv를 공유 결합하여 형성된 단일-사슬 Fv 분자이다.
- [0181] "이중특이적 T 세포 인계이저"(BiTE®)는 단일 펩티드 사슬에 2개의 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 구성된 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해 T 세포에 결합하고 다른 하나는 종양 세포 항원에 결합한다.
- [0182] "디아바디(diabody)"는 동일한 사슬 상의 두 도메인 사이의 페어링(pairing)을 허용하기에는 너무 짧은 펩티드 링커에 의해 연결된 동일한 폴리펩티드 사슬(VH-VL) 상의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄(VH) 가변 도메인을 포함하는 작은 2가(bivalent) 및 이중특이적 항체 단편이다(Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772). 이것은 다른 사슬의 상보적 도메인과 페어링(pairing)을 이루도록 하고 두 개의 기능성 항원 결합 부위를 가진 이량체 분자(dimeric molecule)의 조립을 촉진한다.

[0183] "DARPin"은 이중특이적 안키린 반복 분자(ankyrin repeat molecule)이다. DARPin은 인간 게놈에서 발견될 수 있고 가장 풍부한 유형의 결합 단백질 중 하나인 천연 안키린 단백질에서 파생된다. DARPin 라이브러리 모듈은 천연 안키린 단백질 서열에 의해 정의되고 초기 디자인을 위한 229개의 안키린 반복 및 후속 개선을 위한 또 다른 2200개의 안키린 반복을 사용한다. 모듈은 DARPin 라이브러리의 빌딩 블록 역할을 한다. 라이브러리 모듈은 인간 게놈 서열과 유사하다. DARPin은 4~6개의 모듈로 구성된다. 각 모듈은 약 3.5kDa이기 때문에, 평균 DARPin의 크기는 16-21kDa이다. 결합제(binders)의 선택은 리보솜 디스플레이에 의해 수행되며, 이는 완전히 무세포이며 He M. and Taussig MJ., Biochem Soc Trans. 2007, Nov;35(Pt 5):962-5에 기재되어 있다.

[0184] CDR의 서열은 당업계에 공지된 임의의 번호 시스템, 예를 들어 Kabat 시스템(Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); the Chothia 시스템(Chothia & Lesk, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)); 또는 IMGT 시스템(Lefranc et al., "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77 (2003))을 참조하여 확인할 수 있다.

표 1

	Kabat	Chothia	IMGT
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-56	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	24-34	27-38
VL CDR2	50-56	50-56	56-65
VL CDR3	89-97	89-97	105-117

표 1: CDR 정의

[0187] 본 발명에서 논의된 중쇄 불변 영역 아미노산 위치의 경우, 번호링은 Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85에 처음 설명된 EU 인덱스에 따른다.

[0188] Edelman의 EU 번호링은 Kabat et al.에도 명시되어 있다. (1991) (상기). 따라서 용어는 "Kabat에 명시된 EU 인덱스", "EU 인덱스"와 같이 된다. 중쇄의 맥락에서 "Kabat의 EU 인덱스" 또는 "EU 번호링"은 Kabat et al.에도 명시되어 있는 바와 같이 Edelman et al.의 인간 IgG1 EU 항체를 기반으로 하는 잔기(residue) 번호링 시스템을 의미한다. 경쇄 불변 영역 아미노산 서열에 사용되는 번호링 시스템은 유사하게 Kabat et al.(상기)이다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "Kabat에 따라 번호링이 된"은 Kabat et al.(상기)의 Kabat를 지칭한다(상기).

[0189] 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합 단편은 재조합 수단에 의해 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편은 마우스, 래트, 염소, 말, 돼지, 소, 닭, 토끼, 낙타과, 당나귀, 인간 또는 이들의 키메라 버전일 수 있다. 인간에 대한 투여에 사용하기 위해, 비-인간 유래 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 환자에게 투여시 덜 항원성이라도 유전적으로 또는 구조적으로 변경될 수 있다.

[0190] 인간 또는 인간화 항체, 특히 재조합 인간 또는 인간화 항체가 특히 바람직하다.

[0191] "인간화 항체(humanized antibody)"라는 용어는 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 모 면역글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 예를 들어, 뮤린(murine) CDR은 "인간화 항체"를 제조하기 위해 인간 항체의 프레임워크 영역에 이식될 수 있다(Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270 참조). 일부 실시예에서, "인간화 항체"는 불변 영역이, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 항체의 특성을 생성하기 위해 원래 항체의 불변 영역이 추가로 변형되거나 변경된 것들이다.

[0192] 용어 "인간 항체(human antibody)"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 이용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성될

수 있다.

- [0193] 용어 "키메라 항체(chimeric antibody)"는 즉 하나의 공급원 또는 중 및 일반적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 무인 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 바람직하다. 본 발명에 포함되는 "키메라 항체"의 다른 바람직한 형태는 불변 영역이 원래 항체의 불변 영역에서 변형되거나 변경되어 특히 C1q 결합 및 /또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 항체의 성질을 생성하도록 한다. 이러한 키메라 항체는 또한 "클래스-전환 항체(class-switched antibodies)"로 지칭된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 영역을 암호화하는 DNA 단편 및 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 DNA 단편을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 생성물이다. 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 형질감염 기술을 포함하는 키메라 항체를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US Patent Nos. 5,202,238 and 5,204,244 참조).
- [0194] 용어 "Fc 영역" 및 "Fc"는 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되며 2개의 Fc 사슬에 의해 형성되는 천연 면역글로불린의 부분을 지칭한다. 각각의 "Fc 사슬(Fc chain)"은 불변 도메인 CH2 및 불변 도메인 CH3을 포함한다. 각각의 Fc 사슬은 또한 힌지 영역을 포함할 수 있다. 천연 Fc 영역은 동종이량체이다. 일부 실시예에서, Fc 영역은 Fc 이종이량체화를 시행하기 위한 변형을 함유할 수 있다.
- [0195] 용어 "Fc 부분(Fc part)"은 Fc 영역에 상응하는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 부분을 지칭한다.
- [0196] IgA, IgG, IgD, IgE 및 IgM으로 분류되는 중쇄 불변 영역의 5가지 주요 클래스가 있으며, 각각은 이소형으로 지정된 특징적인 작동체 기능을 가지고 있다. 예를 들어, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 알려진 4개의 하위 클래스로 분리된다. Ig 분자는 여러 종류의 세포 수용체와 상호 작용한다. 예를 들어, IgG 분자는 항체의 IgG 부류, 즉 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII에 대해 특이적인 3가지 클래스의 Fcγ 수용체(FcγR)와 상호 작용한다. FcγR 수용체에 대한 IgG의 결합을 위한 중요한 서열은 CH2 및 CH3 도메인에 위치하는 것으로 보고되었다.
- [0197] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 임의의 이소형, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 4쇄 면역글로불린(Ig) 구조의 합성 다량체(synthetic multimer)일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG 이소형이다. 항체 또는 항원 결합 단편은 임의의 IgG 서브클래스(subclass), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소형(isotype)일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 이소형의 것이다.
- [0198] 일부 실시예에서, 항체는 IgG 이소형인 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 IgG 이소형인 중쇄 불변 영역의 일부를 포함한다. 일부 실시예에서, IgG 불변 영역 또는 그의 일부는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 불변 영역이다. 바람직하게는, IgG 불변 영역 또는 그의 부분은 IgG1 불변 영역이다.
- [0199] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 람다 경쇄(a lambda light chain) 또는 카파 경쇄(kappa light chain)를 포함할 수 있다.
- [0200] 바람직한 실시예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 카파 경쇄인 경쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 카파 불변 영역인 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0201] 일부 실시예에서, 항체는 카파 가변 영역인 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 경쇄를 포함한다. 바람직하게는, 카파 경쇄는 카파 VL인 VL 및 카파 CL인 CL을 포함한다.
- [0202] 대안적으로, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 람다 경쇄인 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 람다 불변 영역인 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 람다 가변 영역인 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0203] 조작된 항체 및 그의 항원 결합 단편은 VH 및/또는 VL 내의 프레임워크 잔기에 변형이 이루어진 것을 포함한다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 면역원성을 감소시키고 그리고/또는 항체 생산 및 정제를 개선하기 위해 항체의 특성을 개선할 수 있다.
- [0204] 본 명세서에 개시된 항체 및 그의 항원 결합 단편은 당업계에 공지된 통상적인 기술, 예를 들어 아미노산 결실(deletion)(들), 삽입(insertion)(들), 치환(substitution)(들), 부가(addition)(들) 및/또는 또는 단독으로 또는 조합하여 조합(들) 및/또는 당업계에 공지된 임의의 다른 변형(들)을 포함한다. 면역글로불린 사슬의 아미노산 서열의 기초가 되는 DNA 서열에 이러한 변형을 도입하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

- [0205] 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 공유 부착(covalent attachment)(예를 들어, 항체에 대한 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의해)이 항체가 이의 에피토프에 결합하는 것을 방해하지 않도록 또는 달리 항체의 생물학적 활성을 방해하지 손상시키지 않도록 변형된 유도체를 포함한다. 적합한 유도체의 예는 푸코실화된 항체, 글리코실화된 항체, 아세틸화된 항체, PEG화된 항체, 인산화된 항체 및 아미드화된 항체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0206] 아미노산 서열(들)의 변이가 본 발명의 항체 또는 본 명세서에 다른 곳에서 정의된 이의 항원-결합 단편에 대해 적어도 75%, 더 바람직하게는 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99% 서열 동일성을 유지한다면, 본 발명의 항체의 아미노산 서열의 사소한 변이는 본 발명에 포함되는 것으로 고려된다.
- [0207] 본 발명의 항체는 보존 또는 비보존 위치에서 한 종의 아미노산 잔기가 다른 종의 상응하는 잔기로 치환된 변이체를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 비보존적 위치의 아미노산 잔기는 보존적 또는 비보존적 잔기로 치환된다. 특히, 보존적 아미노산 대체가 고려된다.
- [0208] "보존적 아미노산 치환(conservative amino acid substitution)"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 정의되었는데, 염기성 측쇄(예: 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘), 산성 측쇄(예: 아스파르트산 또는 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예: 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신 또는 시스테인), 비극성 측쇄(예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 또는 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 또는 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 폴리펩티드의 아미노산이 동일한 측쇄 패밀리의 다른 아미노산으로 대체되는 경우, 아미노산 치환은 보존적인 것으로 간주된다. 본 발명의 항체에 보존적으로 변형된 변이체의 포함은 다른 형태의 변이체, 예를 들어 다형성 변이체(polymorphic variants), 중간 상동체(interspecies homologs) 및 대립유전자를 배제하지 않는다.
- [0209] "비보존적 아미노산 치환(Non-conservative amino acid substitutions)"은 (i) 전기양성 측쇄를 갖는 잔기(예를 들어, Arg, His 또는 Lys)가 전기음성 잔기(예를 들어, Glu 또는 Asp)로, 또는 이에 의해 치환되거나, (ii) 친수성 잔기(예: Ser 또는 Thr)가 소수성 잔기(예: Ala, Leu, Ile, Phe 또는 Val)로 또는 이에 의해 치환되거나, (iii) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기로 또는 이에 의해 치환되거나, 또는 (iv) 부피가 큰 소수성 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기(예: Val, His, Ile 또는 Trp)가 더 작은 측쇄(예: Ala 또는 Ser)를 갖거나 또는 측쇄가 없는 것(예: Gly)으로 또는 이에 의해 치환된 것을 포함한다.
- [0210] **항체 형식(Antibody format)**
- [0211] 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 형식은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체 형식은 다음에 설명되어 있다: Kontermann RE, mAbs 4:2 1-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech.23 (2005) 1126-1136, Chan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010) 및 Cuesta AM et al., Trends Biotech 28 (2011) 355-362.
- [0212] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 임의의 형식을 가질 수 있다. 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 형식은 예를 들어 다가 단일쇄 항체, 디아바디(diabodies) 및 트리아바디(triabodies), 및 하나 이상의 링커를 통해 추가적인 항원-결합 도메인들(...)이 결합하는 전장 항체의 불변 도메인 구조를 갖는 항체뿐만 아니라 항원 결합 도메인(예를 들어, 단일쇄 Fv, 직렬 scFv, VH 도메인 및/또는 VL 도메인, Fab, 또는 (Fab)₂)은 하나 이상의 펩티드-링커뿐만 아니라 DARPin과 같은 항체 모의체(mimetics)도 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 이중특이적 T 세포 인게이지(BITE®)와 같은 scFv의 형식을 갖는다. 일부 실시예에서, 본 발명의 항체는 BCMA에 결합하는 제1 도메인, T 세포 항원(예: CD3)에 결합하는 제2 도메인, 및 각각 힌지, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 단량체를 포함하는 제3 도메인을 포함하는 단쇄 항체이며, 여기서 2개의 폴리펩티드 단량체는 펩티드 링커(예: 힌지-CH2-CH3-링커-힌지-CH2-CH3)를 통해 서로 융합된다.
- [0213] 항체의 "가(valency)"는 결합 도메인의 수를 나타낸다. 이와 같이, 용어 "2가(bivalent)", "3가(trivalent)" 및 "다가(multivalent)"는 각각 2개의 결합 도메인, 3개의 결합 도메인 및 다중 결합 도메인의 존재를 나타낸다. 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 각각의 표적 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 도메인을 가질 수 있다(즉, 항체는 3가 또는 다가임). 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 각각의 표적 항원의 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 도메인을 갖는다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 각각의 표적 항원 상의 상

이한 에피토프에 결합할 수 있는 하나보다 많은 결합 도메인을 갖는다.

- [0214] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 2가, 3가 또는 4가일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 3가이고, 바람직하게는 여기서 3가 항체는 BCMA에 대해 2가이다. 따라서, 이중특이적 항체는 3가일 수 있고, 여기서 3가 항체는 BCMA에 대해 2가이다.
- [0215] 다중특이적(예: 이중특이적) 항체는 단일 종의 전장일 수 있거나 키메라화 또는 인간화될 수 있다. 2개 이상의 항원 결합 도메인을 갖는 항체의 경우, 단백질이 2개의 상이한 항원에 대한 결합 도메인을 갖는 한 일부 결합 도메인은 동일할 수 있다.
- [0216] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 이중특이적 이종이량체(heterodimeric) 형식을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 2개의 상이한 중쇄 및 2개의 상이한 경쇄를 포함한다. 다른 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 상이한 중쇄를 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체에서 중쇄 및 경쇄(HC/LC)의 두 쌍 중 하나는 CD3에 특이적으로 결합하고 다른 하나는 BCMA에 특이적으로 결합한다.
- [0217] 본 발명의 이중특이적 항체가 2가인 실시예에서, 이들은 하나의 항-BCMA 항체 및 하나의 항-CD3 항체(본 명세서에서 "1+1" 형식으로 지칭됨)를 포함할 수 있다.
- [0218] BCMA 및 CD3 항체가 Fab인 실시예에서, 1+1 형식의 2가 이중특이적 항체는 CD3 Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하지 않는 경우) 형식을 가질 수 있다. 대안적으로, 이중특이적 항체는 Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; Fc-BCMA Fab-CD3 Fab; 또는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab(즉, Fc가 존재하는 경우) 형식을 가질 수 있다. 바람직한 실시예에서, 2가 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab 형식을 갖는다.
- [0219] "CD3 Fab - BCMA Fab"는 CD3 Fab가 그 N-말단을 통해 BCMA Fab의 C-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0220] "Fc - BCMA Fab - CD3 Fab"는 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합되고 CD3 Fab가 그 C-말단을 통해 BCMA Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0221] "Fc - CD3 Fab - BCMA Fab"는 CD3 Fab가 그 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합되고 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 CD3 Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0222] "BCMA Fab - Fc - CD3 Fab"는 BCMA 및 CD3 Fab 단편이 그들의 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합된다는 것을 의미한다.
- [0223] 본 발명의 이중특이적 항체가 3가인 실시예에서, 이들은 2개의 항-BCMA 항체 및 1개의 항-CD3 항체 (본 명세서에서 "2+1" 형식으로 지칭됨)를 포함할 수 있다.
- [0224] BCMA 및 CD3 항체가 Fab인 실시예에서, 2+1 형식의 3가 이중특이적 항체는 다음의 형식을 가질 수 있다: CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab; 또는 BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하지 않는 경우). 대안적으로, 이중특이적 항체는 다음의 형식을 갖는다: BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab; 또는 CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하는 경우). 바람직한 실시예에서, 3가 이중특이적 항체는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식을 갖는다.
- [0225] "CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab"는 CD3 Fab가 그 C-말단을 통해 제1 BCMA Fab의 N-말단에 결합되고 제1 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 제2 BCMA Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0226] "BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab"는 제1 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 CD3 Fab의 N-말단에 결합되고 CD3 Fab가 그 C-말단을 통해 제2 BCMA Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0227] "BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab"는 제1 BCMA Fab 및 CD3 Fab가 그들의 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합되고 제2 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 CD3 Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0228] "BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab"는 제1 BCMA Fab 및 제2 BCMA Fab가 그들의 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합되고 CD3 Fab가 그 C-말단을 통해 제2 BCMA Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0229] "CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab"는 CD3 Fab 및 제1 BCMA Fab가 그들의 C-말단을 통해 Fc의 N-말단에 결합되고 제2 BCMA Fab가 그 C-말단을 통해 제1 BCMA Fab의 N-말단에 결합됨을 의미한다.
- [0230] 일부 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 BCMA에 특이적으로 결합하는 하나 이하의 BCMA Fab, 및 CD3에

특이적으로 결합하는 하나 이하의 CD3 Fab 및 하나 이하의 Fc 부분을 포함할 수 있다.

- [0231] 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 하나 이하의 CD3 Fab, BCMA에 특이적으로 결합하는 2개 이하의 BCMA Fab 및 하나 이하의 Fc 부분을 포함한다.
- [0232] 일부 실시예에서, 1개 이하의 CD3 Fab 및 하나 이하의 BCMA Fab가 Fc 부분에 연결되고 연결은 Fc 부분의 힌지 영역에 대한 Fab(들)의 C-말단 결합을 통해 수행된다. 일부 실시예에서, 제2 BCMA Fab는 그의 C-말단을 통해 CD3 Fab의 N-말단 또는 Fc 부분의 힌지 영역에 연결되고, 따라서 이중특이적 항체의 Fc 부분과 CD3 Fab 사이에 있다.
- [0233] 2개의 BCMA Fab를 포함하는 실시예에서, BCMA Fab는 바람직하게는 동일한 항체로부터 유래되고 바람직하게는 CDR 서열, 가변 도메인 서열 VH 및 VL 및/또는 불변 도메인 서열 CH1 및 CL에서 동일하다. 바람직하게는, 2개의 BCMA Fab의 아미노산 서열은 동일하다.
- [0234] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한 Fab 대신 scFv를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서, 이중특이적 항체는 각각의 Fab가 상응하는 scFv로 대체되는 상기 형식 중 임의의 하나를 갖는다.
- [0235] 본 발명의 이중특이적 항체의 구성 요소, 예를 들어 Fab 단편은, 최신 기술에 따른 적절한 링커를 사용하여 화학적으로 함께 연결될 수 있다. 바람직한 실시예에서, (Gly4-Ser1)3 링커가 사용된다(Desplancq DK et al., Protein Eng. 1994 Aug;7(8):1027-33 및 Mack M. et al., PNAS July 18, 1995 vol. 92 no. 15 7021-7025). 본 명세서에 사용된 "화학적으로 연결된(Chemically linked)"(또는 "연결된")은 구성요소가 공유 결합에 의해 연결됨을 의미한다. 링커는 펩티드 링커이기 때문에 이러한 공유 결합은 일반적으로 생화학적 재조합 수단에 의해 수행된다. 예를 들어, 항체가 Fc를 포함하는 경우 각각의 Fab 단편, 링커 및 Fc 부분체의 VL 및/또는 VH 도메인을 암호화하는 핵산을 사용하여 결합을 수행할 수 있다.
- [0236] 링커가 사용되는 경우, 이 링커는 각각의 제1 및 제2 도메인이 서로 독립적으로 차등 결합 특이성(differential binding specificities)을 유지할 수 있도록 하기에 충분한 길이 및 서열일 수 있다.
- [0237] **항체 서열(antibody sequences)**
- [0238] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 하기 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, 및 CDR3L 영역 조합을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0239] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0240] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0241] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0242] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역;
- [0243] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역;
- [0244] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역; 및
- [0245] g) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역.
- [0246] 본 명세서에 개시된 실시예 중 임의의 것에서, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역은, SEQ ID NO:67의 CDR1L 영역으로 대체될 수 있고, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역은 SEQ ID NO:68의 CDR2L 영역으로 대체될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:67의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:68의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0247] 본 명세서에 개시된 실시예 중 임의의 것에서, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역은 SEQ ID NO:71의 CDR1L 영역으로

대체될 수 있고; SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역은 SEQ ID NO:72의 CDR2L 영역으로 대체될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:71의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:72의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

- [0248] 본 명세서에 개시된 실시예 중 임의의 것에서, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역은 SEQ ID NO:69의 CDR1L 영역으로 대체될 수 있고, 서열 26의 CDR2L 영역은 서열 70의 CDR2L 영역으로 대체될 수 있다. 따라서, 일부 실시예에서 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:69의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:70의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0249] 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 다음으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR3H CDR1L, CDR2L 및 CDR3L 영역 조합을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0250] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0251] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역; 또는
- [0252] c) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역.
- [0253] 특히 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0254] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0255] a) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0256] b) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역,
- [0257] c) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역,
- [0258] d) SEQ ID NO:38의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0259] e) SEQ ID NO:39의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0260] f) SEQ ID NO:40의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역, 또는
- [0261] g) SEQ ID NO:9의 VH 영역 및 SEQ ID NO:11의 VL 영역.
- [0262] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0263] a) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO:14의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 아미노산 서열을 포함하는 VL;
- [0264] b) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO:13의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는
- [0265] c) SEQ ID NO:9의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL.
- [0266] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:

- [0267] a) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역,
- [0268] b) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역, 또는
- [0269] c) SEQ ID NO:9의 VH 영역 및 SEQ ID NO:11의 VL 영역.
- [0270] 특히 바람직한 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함한다.
- [0271] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 항-CD3 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0272] 항-CD3 항체의 예는 OKT3, TR66, APA 1/1, SP34, CH2527, WT31, 7D6, UCHT-1, Leu-4, BC-3, H2C, HuM291(비실리주맵), Hu291(PDL), ChAglyCD3(오텔릭시주맵), hOKT3 γ 1(Ala-Ala)(테플리주맵) 및 NI-0401(포랄루맵)을 포함한다.
- [0273] 생성된 제1 항-CD3 항체는 CD3 ε 도메인에 결합하는 뮤린(murine) 항체인 OKT3(muromonab-CD3)이었다. 후속 항-CD3 항체는 인간화 또는 인간 항체, 및 조작된 항체, 예를 들어 변형된 Fc 영역을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0274] 항-CD3 항체는 단일 폴리펩티드 사슬 상의 에피토프, 예를 들어 APA 1/1 또는 SP34(Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137: 1097-1100), 또는 CD3의 2개 이상의 서브유닛, 예를 들어, WT31, 7D6, UCHT-1(WO2000041474 참조) 및 Leu-4에 위치한 형태적 에피토프(conformational epitope)를 인식할 수 있다. BC-3(Anaseti et al., Transplantation 54: 844(1992)) 및 H2C(WO2008119567A2)를 비롯한 여러 항-CD3 항체를 사용하여 임상 시험이 수행되었다. 임상 개발 중인 항-CD3 항체에는 HuM291(비실리주맵)(Norman et al., Transplantation. 2000 Dec 27;70(12):1707-12.) Hu291(PDL), ChAglyCD3(오텔릭시주맵)(H Waldmann), hOKT3 γ 1(Ala-Ala)(테플리주맵) (J Bluestone and Johnson and Johnson) 및 (NI-0401) 포랄루맵(Foralumab)이 포함된다.
- [0275] 임의의 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체에 사용하기에 적합할 수 있다. 예를 들어, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 OKT3, TR66, APA 1/1, SP34, CH2527, WT31, 7D6, UCHT-1, Leu-4, BC-3, H2C, HuM291(비실리주맵), Hu291(PDL), ChAglyCD3(오텔릭시주맵), hOKT3 γ 1(Ala-Ala)(테플리주맵) 및 NI-0401(포랄루맵)에서 선택된 항-CD3 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 인간화 SP34 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0276] 일부 바람직한 실시예에서, 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SP34로부터 유래될 수 있고 항체 SP34로서 에피토프 결합과 관련하여 유사한 서열 및 동일한 특성을 가질 수 있다.
- [0277] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 각각 중쇄 CDR1H, CDR2H 및 CDR3H로서 SEQ ID NO: 1, 2 및 3의 중쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VH 및 각각 경쇄 CDR1L, CDR2L 및 CDR3L로서 SEQ ID NO: 4, 5 및 6의 경쇄 CDR을 포함하는 가변 도메인 VL을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0278] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:7(VH) 및 SEQ ID NO:8(VL)의 가변 도메인을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:7의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 VH 및 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하거나, 적어도 90% 동일하거나, 적어도 95% 동일하거나, 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-CD3 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0279] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 하기 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, 및 CDR3L 영역 조합을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0280] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0281] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역;
- [0282] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:27의

CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L;

- [0283] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L;
- [0284] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L;
- [0285] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역 SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L;
- [0286] g) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역,
- [0287] 및 SEQ ID NO:1의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:2의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:3의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:4의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:5의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L 영역을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0288] 특히 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음을 포함한다:
- [0289] SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역 및 SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및
- [0290] SEQ ID NO:1의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:2의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:3의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:4의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:5의 CDR2L 영역 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L 영역을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편.
- [0291] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다:
- [0292] a) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역;
- [0293] b) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역;
- [0294] c) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역;
- [0295] d) SEQ ID NO:38의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역;
- [0296] e) SEQ ID NO:39의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역;
- [0297] f) SEQ ID NO:40의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역; 또는
- [0298] g) SEQ ID NO:9의 VH 영역 및 SEQ ID NO:11의 VL 영역, 및
- [0299] SEQ ID NO:7의 VH 영역 및 SEQ ID NO:8의 VL 영역을 포함하는 항-CD3 항체, 또는 이의 항원 결합 단편.
- [0300] 특히 바람직한 실시예에서, 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 SEQ ID NO:7의 VH 영역 및 SEQ ID NO:8의 VL 영역을 포함하는 CD3 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0301] 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 GSK2857916, AMG-420, AMG-701, JNJ-957, JNJ-64007957, PF-06863135, REGN-5458 또는 TNB-383B 중 하나의 CDR3H, CDR3L, CDR1H, CDR2H, CDR1L, 및 CDR2L을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 GSK2857916, AMG-420, AMG-701, JNJ-957, JNJ-64007957, PF-06863135, REGN-5458 또는 TNB-383B 중 하나의 VH 및 VL을 포함하는 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0302] **Fc**
- [0303] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 Fc를 가질 수 있거나 Fc를 갖지 않을 수 있다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 Fc, 바람직하게는 인간 Fc를 포함한다.
- [0304] 특정 실시예에서, Fc는 변이체(variant) Fc, 예를 들어, 바람직한 구조적 특징 및/또는 생물학적 활성을 제공하기 위해 모 Fc 서열(예를 들어, 후속적으로 변이체를 생성하는 비변형된 Fc 폴리펩티드)에 비해 변형된 Fc 서열

(예를 들어, 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입에 의해)이다.

- [0305] 따라서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 전형적으로 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포 세포독성을 변경하기 위해 하나 이상의 변형을 포함하는 Fc일 수 있다. Fc는 본 발명의 항체에서 항-BCMA 및/또는 항-CD3 Fab 단편에 연결될 수 있다.
- [0306] Fc의 존재는 항체의 제거 반감기를 연장시키는 이점이 있다. 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 마우스 또는 시노물구스 원숭이, 바람직하게는 시노물구스 원숭이에서 12시간 초과, 바람직하게는 3일 이상의 제거 반감기를 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약 1 내지 12일의 제거 반감기를 가지며, 이는 적어도 주 1회 또는 2회 투여를 허용한다.
- [0307] **감소된 작동체 기능(Reduced effector function)**
- [0308] 바람직하게는, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 FcR 및 C1q 결합을 피하고 ADCC/CDC를 최소화하기 위한 변형을 포함하는 Fc 영역(예를 들어, IgG1 서브클래스의)을 포함한다. 이것은 이중특이적 항체가 순수하게 작동체 세포의 강력한 메커니즘, 예를 들어 T 세포, 리디렉션/활성화(redirection/activation)에 의해 종양 세포 사멸 효능을 매개한다는 이점을 제공한다. 따라서, FcR을 발현하는 보체 시스템(complement system) 및 작동체 세포에 대한 효과와 같은 추가 작용 기전이 방지되고 주입 관련 반응(union-related reactions)과 같은 부작용의 위험이 감소한다.
- [0309] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 IgG, 특히 IgG1, 변형 L234A, L235A 및 P329G(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.
- [0310] **이종이량체화(Heterodimerization)**
- [0311] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 이종다량체성 항체일 수 있다. 이러한 이종다량체 항체는 항체의 정확한 조립을 촉진하기 위해 항체 사슬 사이의 상호작용에 관여하는 영역의 변형을 포함할 수 있다.
- [0312] 예를 들어, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 Fc 이종이량체화를 시행하기 위해 CH2 및 CH3 도메인에 하나 이상의 변형(들)을 갖는 Fc를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 Fab 단편의 중쇄와 경쇄 사이의 우선적인 페어링(pairing)을 촉진하기 위해 CH1 및 CL 영역에 변형을 포함할 수 있다.
- [0313] 이종이량체화를 촉진하기 위한 많은 전략이 존재한다. 이러한 전략은 2개의 항체 사슬 각각에 비대칭 상보적 변형을 도입하여 두 사슬이 서로 양립가능하여 이종이량체를 형성할 수 있지만 각 사슬이 그 자체로 이량체화할 수 없도록 하는 것을 포함할 수 있다. 그러한 변형은 삽입, 결실, 보존적 및 비보존적 치환 및 재배열을 포함할 수 있다.
- [0314] 이종이량체화는 하전된 잔기의 도입에 의해 촉진되어 제1 항체 사슬과 제2 항체 사슬 사이에 유리한 정전기적 상호작용을 생성할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 양으로 하전된 아미노산 아미노산은 제1 항체 사슬에 도입될 수 있고, 하나 이상의 음으로 하전된 아미노산은 제2 항체 사슬의 상응하는 위치에 도입될 수 있다.
- [0315] 대안적으로 또는 추가로, 이종이량체화는 접촉 잔기 사이에 입체 장애(steric hindrance)의 도입에 의해 촉진될 수 있다. 예를 들어, 부피가 큰 측쇄를 갖는 하나 이상의 잔기가 제1 항체 사슬에 도입될 수 있고, 부피가 큰 측쇄를 수용할 수 있는 하나 이상의 잔기가 제2 항체 사슬에 도입될 수 있다.
- [0316] 대안적으로 또는 추가로, 이종이량체 형성을 동종이량체 형성보다 엔트로피적으로 및 엔탈피적으로 유리하게 만들기 위해 사슬 사이의 계면에서 친수성 및 소수성 잔기에 하나 이상의 변형(들)을 도입함으로써 이종이량체화를 촉진할 수 있다.
- [0317] 이종이량체화를 촉진하기 위한 추가 전략은 각 사슬이 상응하는 재배열을 포함하는 사슬과만 양립을 유지하도록 항체 사슬의 일부를 재배열하는 것이다. 예를 들어, CrossMAB 기술은 정확한 사슬 결합을 가능하게 하기 위해 항체 도메인의 교차를 기반으로 한다. CrossMAB 형식에는 세 가지 주요 형식이 있다: (i) VH 및 VL이 교환되고 CH1 및 CL이 교환되는 CrossMABFab; (ii) VH 및 VL이 교환되는 CrossMABVH-VL; 및 (iii) CH1과 CL이 교환되는 CrossMABCH1-CL(Klein et al., 2016. MABS, 8(6):1010-1020).
- [0318] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 VH 및 VL의 교환을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 CH1 및 CL의 교환을 포함할 수 있다. 일

부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 VH 및 VL의 교환 및 CH1 및 CL의 교환을 포함할 수 있다.

[0319] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 VH 및 VL의 교환을 포함한다.

[0320] 이중이량체화를 촉진하기 위한 다른 접근법에는 가닥 교환 조작 도메인(SEED)의 사용이 포함된다(Davis et al., 2010. Protein Eng Des Sel, 23(4); 195-202).

[0321] 위 전략의 조합은 항체 안정성에 대한 영향을 최소화하면서 조립 효율을 최대화하는 데 사용될 수 있다.

[0322] **Fc 이중이량체화(Fc heterodimerization)**

[0323] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 이중이량체 Fc를 가질 수 있고, 예를 들어 이들은 항-BCMA 항체로부터 유래하는 하나의 중쇄 및 항-CD3 항체로부터 유래하는 하나의 중쇄를 포함할 수 있다.

[0324] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 제1 CH2 및/또는 CH3 도메인과 제2 CH2 및/또는 CH3 도메인의 연관(association)을 촉진하는 하나 이상의 변형(들)을 포함하는 이중이량체 Fc를 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 변형(들)은 예를 들어 CH3 도메인에 대한 비대칭 변형을 초래함으로써 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인의 연관을 촉진한다. 하나 이상의 변형(들)은 아미노산 삽입, 결실, 보존적 및 비보존적 치환 및 재배열, 및 이들의 조합으로부터 선택된 변형을 포함할 수 있다.

[0325] 일반적으로 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인은 모두 상보적인 방식으로 조작되어 각 CH3 도메인(또는 이를 포함하는 중쇄)이 더 이상 자체적으로 동중이량체화할 수 없지만 상보적으로 조작된 다른 CH3 도메인과 강제로 이중이량체화된다(그래서 제1 및 제2 CH3 도메인은 이중이량체화되고 2개의 제1 또는 2개의 제2 CH3 도메인 사이에 동중이량체가 형성되지 않음).

[0326] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 하나 이상의 "노브-인-홀(knob-into-hole)" 변형(들)을 갖는 Fc를 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어 WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621, Merchant, A.M. et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68, 및 WO 98/050431에 몇가지 예가 설명되어 있다.

[0327] 이 방법에서, 2개의 CH3 도메인의 상호작용 표면은 이들 2개의 CH3 도메인을 함유하는 2개의 Fc 사슬의 이중이량체화를 증가시키기 위해 변경된다. 두 개의 CH3 도메인(두 개의 Fc 사슬 중) 중 하나는 "노브(knob)"가 될 수 있고 다른 하나는 "홀(hole)"이 될 수 있다.

[0328] 따라서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 2개의 CH3 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제1 Fc 쇠의 제1 CH3 도메인 및 제2 Fc 쇠의 제2 CH3 도메인은 각각 항체 CH3 도메인 사이의 원래 계면을 포함하는 계면에서 만나며, 여기서 상기 인터페이스는 항체의 형성을 촉진하도록 변경된다.

[0329] 일부 실시예에서:

[0330] i) 한 Fc 사슬의 CH3 도메인이 변경되어, 다른 Fc 사슬의 CH3 도메인의 원래 인터페이스와 만나는 한 Fc 사슬의 CH3 도메인의 원래 인터페이스 내에서 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 다른 Fc 쇠의 CH3 도메인 인터페이스 내의 공동에 위치할 수 있는 한 Fc 사슬의 CH3 도메인 인터페이스 내에 돌출부(protruberance)를 생성하고; 그리고

[0331] ii) 다른 Fc 사슬의 CH3 도메인이 변경되어, 한 Fc 사슬의 CH3 도메인의 원래 인터페이스와 만나는 다른 Fc 사슬의 CH3 도메인의 원래 인터페이스 내에서 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기와 대체되고, 이에 의해 하나의 Fc 쇠의 CH3 도메인의 인터페이스 내 돌출부가 위치가능한 다른 Fc 쇠의 CH3 도메인의 인터페이스 내에 공동을 생성한다.

[0332] 바람직하게는, 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0333] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 위치 T366, L368 및 Y407에서의 변형들, 예를 들어 T366S, L368A 및 Y407V(EU 넘버링에 따름)을 포함하는 제1 CH3 도메인을 포함한다.

[0334] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 위치 T366에서의 변형("노브 변형"), 예를 들어 T366W(EU 넘버링에 따름)을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

[0335] 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 변형 T366S, L368A, 및 Y407V, 또는 그의 보존적 치환을 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T366W 또는 그의 보존적 치환을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다(EU 넘버링에 따름).

[0336] 일 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 표 2에 제시된 변형을 포함하는 제1 CH3 도메인 및 표 2에 제시된 변형을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

표 2

제1 CH3 도메인		제2 CH3 도메인	
Kabat	EU 넘버링	Kabat	EU 넘버링
T389S	T366S	T389W	T366W
L391A	L368A		
Y438V	Y407V		

[0338] **표 2: "노브-인-홀(Knob-into-holes)" 변형**

[0339] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 US 9,562,109 및 US 9,574,010(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 변형(들) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0340] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 위치 T350, L351, F405 및/또는 Y407(EU 넘버링에 따름)에서 하나 이상의 변형(들), 예를 들어 T350V, L351Y, F405A 및/또는 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 위치 T350, L351, F405 및 Y407(EU 넘버링에 따름)에서 변형(들), 예를 들어 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인을 포함한다.

[0341] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 위치 T350, T366, K392 및/또는 T394(EU 넘버링에 따름)에서 하나 이상의 변형(들), 예를 들어 T350V, T366L, K392L 및/또는 T394W를 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 위치 T350, T366, K392 및 T394(EU 넘버링에 따름)에서 변형(들), 예를 들어 T350V, T366L, K392L 및 T394W를 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

[0342] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 위치 T350, L351, F405 및/또는 Y407에서 하나 이상의 변형(들)(예를 들어, T350V, L351Y, F405A 및/또는 Y407V)을 포함하는 제1 CH3 도메인 및 위치 T350, T366, K392 및/또는 T394(예를 들어, T350V, T366L, K392L 및/또는 T394W)에서 하나 이상의 변형(들)을 포함하는 제2 CH3 도메인(EU 넘버링에 따름)을 포함한다.

[0343] 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어 이중특이적) 항체는 위치 T350, L351, F405 및 Y407에서 변형(들)(예를 들어, T350V, L351Y, F405A 및 Y407V)을 포함하는 제1 CH3 도메인 및 위치 T350, T366, K392 및 T394에서의 변형(들)(예를 들어, T350V, T366L, K392L 및 T394W)(EU 넘버링에 따름)을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

[0344] 하나 이상의 변형(들)은 정전기 전하, 소수성/친수성 상호작용, 및/또는 측쇄 사이의 입체 간섭을 변형할 수 있다. 특히 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V, 또는 그의 보존적 치환을 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W, 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름)을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

[0345] 일 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 표 3에 제시된 변형을 포함하는 제1 CH3 도메인 및 표 3에 제시된 변형을 포함하는 제2 CH3 도메인을 포함한다.

표 3

제1 CH3 도메인		제2 CH3 도메인	
Kabat	EU 넘버링	Kabat	EU 넘버링
T371V	T350V	T371V	T350V
L372Y	L351Y	T389L	T366L
F436A	F405A	K420L	K392L

Y438V	Y407V	T422W	T394W
-------	-------	-------	-------

[0347] **표 3: Fc 이종이량체화 변형(Fc Heterodimerization modifications)**

[0348] 이종이량체화를 시행하기 위한 CH3 변형을 위한 다른 기술이 본 발명의 대안으로 고려되며, 예를 들어 W096/27011, W098/050431, EP1870459, W02007/110205, W02007/147901, W02009/089004, W02010/129304, W02011/90754, W02011/143545, W02012/058768, W02013/157954, W02013/157953, 및 W02013/096291에 설명되어 있다.

[0349] 일부 실시예에서, 본 발명에 따른 이종특이적 항체는 IgG2 이소형(isotype)이고 W02010/129304에 기재된 이종이량체화 접근법이 사용될 수 있다.

[0350] **기타 Fc 변형들**

[0351] 일부 실시예에서, 본 발명의 이종특이적 항체는 Fc를 포함할 수 있으며, 두 CH3 도메인 사이의 디설파이드 가교(disulphide bridge)가 형성되도록 각 CH3 도메인의 상응하는 위치의 아미노산으로서 시스테인(C)의 도입에 의해 두 CH3 도메인이 변경된다. 시스테인은 CH3 도메인 중 하나의 위치 349 및 다른 CH3 도메인의 위치 354에 도입될 수 있다(EU 넘버링에 따름).

[0352] 바람직하게는, 위치 354에 도입된 시스테인은 제1 CH3 도메인에 있고 위치 349에 도입된 시스테인은 제2 CH3 도메인에 있다(EU 넘버링에 따름).

[0353] Fc는 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, 및 V422I(EU 넘버링에 따름)와 같은 변형을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 두 CH3 도메인은 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따름)을 포함한다.

[0354] **경쇄 및 중쇄 이종이량체화(Light and heavy chain heterodimerization)**

[0355] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이종특이적) 항체에서, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 중 하나 이상은 하나 이상의 변형(들), 예를 들어, 중쇄 및 경쇄가 동시 발현되거나 동시 생성될 때 특정 중쇄와 특정 경쇄의 우선적인 페어링을 형성할 수 있는 아미노산 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 BCMA에 대한 결합과 같은 생물학적 특성을 변경하지 않고 상당히 개선된 생산/정제를 제공할 수 있다. 특히, 아미노산 교환과 같은 하나 이상의 변형(들)을 도입함으로써 경쇄 불일치 및 생산에서의 부산물의 형성을 현저히 감소시킬 수 있으므로 수율이 증가하고 정제가 용이해진다.

[0356] 하나 이상의 변형(들)은 입체 장애, 반대 전하로 하전된 아미노산의 치환 및/또는 소수성 또는 친수성 상호작용을 도입함으로써 우선적인 이종이량체 페어링을 촉진할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 변형(들)은 입체 장애 및 반대 전하를 갖는 하전된 아미노산의 치환(들)을 도입함으로써 우선적인 이종이량체 페어링을 촉진한다.

[0357] 아미노산 교환은 경쇄 불일치(light chain mispairing), 예를 들어, Bence-Jones 유형의 부산물을 감소시키는 반대 전하(예를 들어, CH1/CL 인터페이스에서)를 갖는 하전된 아미노산의 치환일 수 있다.

[0358] 바람직한 실시예에서, 경쇄 및 중쇄 이종이량체화를 보조하는 하나 이상의 변형(들)은 CDR 외부의 경쇄 및 중쇄에서의 아미노산 변형이다. 하나 이상의 변형(들)은 항-BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 존재할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 변형(들)은 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 존재할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 하나 이상의 변형(들)은 항-BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 존재한다.

[0359] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이종특이적) 항체는 아미노산 변형 K147E/D 및 K213E/D(EU 넘버링에 따름)를 갖는 CH1 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 및 아미노산 변형 E123K/R/H 및 Q124K/R/H(Kabat에 따름)를 갖는 CL 도메인을 포함하는 상응하는 면역글로불린 경쇄를 포함한다.

[0360] 바람직하게는, CH1 도메인은 아미노산 변형 K147E 및 K213E(EU 넘버링에 따름) 또는 이의 보존적 치환을 포함하고, 상응하는 CL 도메인은 아미노산 변형 E123R 및 Q124K 또는 이의 보존적 치환(Kabat에 따름)을 포함한다. 이러한 다중특이적(예를 들어, 이종특이적) 항체는 고수율로 생산할 수 있고 쉽게 정제할 수 있다.

[0361] 일 실시예에서, 표 4에 기재된 아미노산 변형은 BCMA 항체 또는 CD3 항체에 있을 수 있다.

[0362] 일 실시예에서, 본 발명의 이종특이적 항체는 2가이고, 하나의 항-BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 하나의 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편 ("1+1" 형식)을 포함하며, 여기서:

- [0363] (a) BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예: BCMA Fab)은 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 4의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함하고; 또는
- [0364] (b) CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예: CD3 Fab)은 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 4의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함한다.
- [0365] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 3가이고 2개의 항-BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1개의 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편("2+1" 형식)을 포함하며, 여기서:
- [0366] (a) 하나 또는 둘 모두의 BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예: BCMA Fab)은 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 4의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함하고; 또는
- [0367] (b) CD3 항체(예: CD3 Fab)는 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함한다.
- [0368] 특히, 각각의 BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 표 4에 기재된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함할 수 있다.

표 4

CH1 도메인		CL 도메인	
Kabat	EU 넘버링	Kabat	EU 넘버링
K145E	K147E	E123R	E123R
K221E	K213E	Q124K	Q124K

표 4: 경쇄 및 중쇄 이중이량체화 변형(Light and heavy chain

heterodimerization modifications)

- [0370] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 표 2에 제시된 변형과 조합하여 표 4에 제시된 변형을 포함한다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 2가이고, 다음을 포함한다:
- [0371] (a) 하나의 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나의 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편("1+1" 형식), 여기서 (i) BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예를 들어, BCMA Fab)은 아미노산 변형 K147E 및 K213E를 포함하는 CH1 도메인, 및 아미노산 변형 E123R 및 Q124K(즉, 표 4에 제시된 변형)를 포함하는 상응하는 CL 도메인, 또는 (ii) CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예를 들어, CD3 Fab)은 아미노산 변형 K147E 및 K213E를 포함하는 CH1 도메인, 및 아미노산 변형 E123R 및 Q124K를 포함하는 상응하는 CL 도메인(즉, 표 4에 제시된 변형)을 포함하고; 그리고
- [0372] (b) 변형 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T366W를 포함하는 제2 CH3 도메인(즉, 표 2에 제시된 변형).
- [0373] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 3가이고 다음을 포함한다:
- [0374] (a) 2개의 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 1개의 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편("2+1" 형식), 여기서 (i) 하나 또는 둘 모두의 BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예: BCMA Fab)은 아미노산 변형 K147E 및 K213E를 포함하는 CH1 도메인, 및 아미노산 변형 E123R 및 Q124K를 포함하는 상응하는 CL 도메인을 포함하거나(즉, 표 4에 제시된 변형), 또는 (ii) CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편(예: CD3 Fab)은 아미노산 변형 K147E 및 K213E를 포함하는 CH1 도메인, 및 아미노산 변형 E123R 및 Q124K를 포함하는 상응하는 CL 도메인을 포함하고(즉, 표 4에 제시된 변형); 그리고
- [0375] (b) 변형 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T366W를 포함하는 제2 CH3 도메인(즉, 표 2에 제시된 변형).
- [0376] 특히, 각각의 BCMA 항체(예를 들어, BCMA Fab)는 표 4에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 4의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 제1 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 제1 항-BCMA 항체의 C-말단에 결합되고, 제2 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-CD3 항체의 C-말단에 결합된다.
- [0377] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 위치(들) A141, L145, K147, Q175(EU

넘버링에 따름) 중 하나 이상에서 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인을 포함하는 면역글로불린 중쇄 및 위치(들) F116, Q124, L135, T178(Kabat에 따라 넘버링됨) 중 하나 이상에서 아미노산 변형을 갖는 CL 도메인을 포함하는 상응하는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 바람직하게는, CH1 도메인은 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T, Q175E 또는 이의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름)을 포함하고, 상응하는 CL 도메인은 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V, T178R 또는 이의 보존적 치환을 포함한다(Kabat에 따라 넘버링됨).

- [0380] 일 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CL 도메인을 포함하는 상응하는 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체가 본 발명의 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 본 발명의 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 실시예에서, 표 5에 기술된 아미노산 변형은 BCMA 항체 또는 CD3 항체에 있을 수 있다.
- [0381] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 2가이고, 하나의 항-BCMA 항체 및 하나의 항-CD3 항체("1+1" 형식)를 포함하며, 여기서:
- [0382] (a) BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함하고; 또는
- [0383] (b) CD3 항체(예: CD3 Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함한다.
- [0384] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 3가이고 2개의 항-BCMA 항체 및 1개의 항-CD3 항체 ("2+1" 형식)를 포함하며, 여기서:
- [0385] (a) 하나 또는 둘 모두의 BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함하고; 또는
- [0386] (b) CD3 항체(예: CD3 Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함한다.
- [0387] 특히 바람직한 실시예에서, 각각의 BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5의 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함할 수 있다.

표 5

[0388]

CH1 도메인		CL 도메인	
Kabat	EU 넘버링	Kabat	EU 넘버링
A139W	A141W	F116A	F116A
L143E	L145E	Q124R	Q124R
K145T	K147T	L135V	L135V
Q179E	Q175E	T178R	T178R

[0389] **표 5: 경쇄 및 중쇄 이중이량체화 변형(Light and heavy chain heterodimerization modifications)**

- [0390] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 표 3에 제시된 아미노산 변형과 조합하여 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 2가이고, 다음을 포함한다:
- [0391] (a) 하나의 항-BCMA 항체 및 하나의 항-CD3 항체("1+1" 형식), 여기서 (i) BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E를 포함하는 CH1 도메인 및 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R(즉, 표 5에 제시된 변형)을 포함하는 상응하는 CL 도메인을 포함하고, 또는 (ii) CD3 항체(예: CD3 Fab)는 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E를 포함하는 CH1 도메인, 및 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R을 포함하는 상응하는 CL 도메인(즉, 표 5에 제시된 변형)을 포함하고; 그리고
- [0392] (b) 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W를 포함하는 제2 CH3 도메인(즉, 표 3에 제시된 변형).
- [0393] 바람직한 실시예에서, 제1 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-BCMA 항체의 C-말단에 결합되고, 제2 Fc쇄는 Fc의 N-말

단에서 항-CD3 항체의 C-말단에 결합된다.

[0394] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 3가이고 다음을 포함한다:

[0395] (a) 2개의 항-BCMA 항체 및 1개의 항-CD3 항체("2+1" 형식), 여기서 (i) 하나 또는 둘 모두의 BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E를 포함하는 CH1 도메인 및 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R(즉, 표 5에 제시된 변형)을 포함하는 상응하는 CL 도메인을 포함하고, 또는 (ii) CD3 항체(예: CD3 Fab)는 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E를 포함하는 CH1 도메인 및 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R을 포함하는 상응하는 CL 도메인(즉, 표 5에 제시된 변형)을 포함하고; 그리고

[0396] (b) 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하는 제1 CH3 도메인, 및 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W를 포함하는 제2 CH3 도메인(즉, 표 3에 제시된 변형).

[0397] 특히, 각각의 BCMA 항체(예: BCMA Fab)는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 CH1 도메인 및 표 5에 제시된 아미노산 변형을 갖는 상응하는 CL 도메인을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 제1 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 제1 항-BCMA 항체의 C-말단에 결합되고, 제2 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-CD3 항체의 C-말단에 결합된다.

[0398] 대안적으로, CH1 도메인은 위치 Q175(EU 넘버링에 따름)에서 아미노산 변형을 포함할 수 있고 상응하는 CL 도메인은 위치(들) F116, Q124, L135, T178(Kabat에 따라 넘버링됨) 중 하나 이상에서 아미노산 변형을 포함할 수 있다. CH1 도메인은 아미노산 변형 Q175K(EU 넘버링에 따름), 또는 이의 보존적 치환을 포함할 수 있고, 상응하는 CL 도메인은 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V, T178R(Kabat에 따라 넘버링됨), 또는 보존적 치환을 포함할 수 있다.

[0399] 대안적 실시예에서, CH1 도메인은 위치 Q175(EU 넘버링에 따름)에서 아미노산 변형을 포함할 수 있고, 상응하는 CL 도메인은 위치(들) Q124, L135, Q160, T180(Kabat에 따름) 중 하나 이상에서 아미노산 변형을 포함할 수 있다. CH1 도메인은 아미노산 변형 Q175K(EU 넘버링에 따름), 또는 이의 보존적 치환을 포함할 수 있고, 상응하는 CL 도메인은 아미노산 변형 Q124E, L135W, Q160E 및 T180E, 또는 이의 보존적 치환(Kabat에 따라 넘버링됨)을 포함할 수 있다.

[0400] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 아미노산 티로신(Y), 글루탐산(E), 세린(S) 및 히스티딘(H)의 군으로부터 선택된 VL 영역의 위치 49에서 아미노산 변형 및/또는 트레오닌(T) 또는 알라닌(A)인 VL 영역의 위치 74에서 아미노산 치환을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0401] **CrossMab**

[0402] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 CrossMab 기술을 포함할 수 있다. CrossMab 기술은 올바른 사슬 연관을 가능하게 하기 위해 항체 도메인의 교차를 기반으로 한다. 그것은 다중특이적(예: 이중특이적) 항체 형성을 촉진하는 데 사용된다. CrossMab 형식에는 세 가지 주요 형식이 있다. (i) VH 및 VL이 교환되고 CH1 및 CL이 교환되는 CrossMabFab; (ii) VH 및 VL이 교환되는 CrossMabVH-VL; 및 (iii) CH1과 CL이 교환되는 CrossMabCH1-CL(Klein et al., 2016. MABS, 8(6):1010-1020).

[0403] CrossMab 기술은 최신 기술로 알려져 있다. 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 대체된 이중특이적 항체는 W02009080251 및 W02009080252에 기재되어 있다.

[0404] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 내의 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편에서, 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체될 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 VH 및 VL의 교환 및 CH1 및 CL의 교환을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 교차 경쇄 및 교차 중쇄를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 "교차 경쇄(crossover light chain)"는 VH-CL, VL-CH1 또는 VH-CH1을 포함할 수 있는 경쇄이다. 본 명세서에 사용된 "교차 중쇄(crossover light chain)"는 VL-CH1, VH-CL 또는 VL-CL을 포함할 수 있는 중쇄이다.

[0405] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 다음을 포함한다:

[0406] (a) CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄; 및

[0407] (b) BCMA에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 및 중쇄,

[0408] 여기서 가변 도메인 VL 및 VH 및/또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 (i) 항-BCMA 항체; 및/또는 (ii) 항-CD3 항체에서 서로 대체된다.

- [0409] 일부 실시예에서, 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다. 보다 바람직하게는, 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 가변 도메인 VL 및 VH는 서로 대체된다.
- [0410] 1+1 형식의 이중특이적 항체가 형식 CD3 Fab - BCMA Fab(즉, Fc가 존재하지 않는 경우); Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; Fc-BCMA Fab-CD3 Fab; 또는 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab;을 갖는 실시예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 형식, 예를 들어 CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 포함할 수 있다. BCMA Fab는 CrossMab 형식, 예를 들어 CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 가질 수 있다. 대안적으로, CD3 Fab는 CrossMab 형식, 예를 들어, CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 가질 수 있다. 바람직한 실시예에서, 이중특이적 항체의 CD3 Fab는 CrossMabVH-VL 형식을 포함한다.
- [0411] CrossMab 기술을 포함하는 2+1 형식을 갖는 본 발명의 이중특이적 항체가 특히 바람직하다. 따라서, 2+1 형식의 3가 이중특이적 항체가 형식 CD3 Fab - BCMA Fab - BCMA Fab; BCMA Fab - CD3 Fab - BCMA Fab (즉, Fc가 존재하지 않는 경우); BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab; BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab; 또는 CD3 Fab - Fc - BCMA Fab - BCMA Fab를 갖는 실시예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 형식, 예를 들어 CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 가질 수 있다. BCMA Fab는 CrossMab 형식, 예를 들어, CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 가질 수 있다. 대안적으로, CD3 Fab는 CrossMab 형식, 예를 들어, CrossMabFab, CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH1-CL을 가질 수 있다. 바람직한 실시예에서, 이중특이적 항체의 CD3 Fab는 CrossMabVH-VL 형식을 포함한다.
- [0412] 일부 실시예에서, 1+1 형식을 갖는 본 발명의 이중특이적 항체는 CrossMab 기술을 포함하지 않으며, 즉 항-BCMA 항체도 항-CD3 항체도 가변 도메인 VL 및 VH 또는 불변 도메인 CL 및 CH1을 서로에 의해 대체하게 하지 않는다.
- [0413] **예시적인 실시예(Exemplary Embodiments)**
- [0414] 예시적인 실시예들이 도 1-3에 제시되어 있다.
- [0415] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 하나의 Fab 단편, 항-BCMA 항체의 하나의 Fab 단편 및 BCMA Fab-Fc-CD3 Fab 형식에 따른 하나의 Fc 부분을 포함하는 2가 이중특이적 항체이다. 항-BCMA Fab 단편은 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 1a에 예시되어 있다.
- [0416] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 하나의 Fab 단편, 항-BCMA 항체의 하나의 Fab 단편 및 BCMA Fab-Fc-CD3 Fab 형식에 따른 하나의 Fc 부분을 포함하는 2가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 (a) 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고; 및 또한 (b) 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 1b에 예시되어 있다.
- [0417] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개 및 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 각각의 항-BCMA Fab 단편은 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 2A에 예시되어 있다.
- [0418] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개 및 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 (a) 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고; 그리고 또한 (b) 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 2B에 예시되어 있다.
- [0419] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개

및 BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 각각의 항-BCMA Fab 단편은 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 2C에 예시되어 있다.

[0420] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개 및 BCMA Fab - Fc - BCMA Fab - CD3 Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 (a) 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고; 그리고 또한 (b) 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 2D에 예시되어 있다.

[0421] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 하나의 Fab 단편, 항-BCMA 항체의 하나의 Fab 단편 및 Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 하나의 Fc 부분을 포함하는 2가 이중특이적 항체이다. 항-BCMA Fab 단편은 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 3A에 예시되어 있다.

[0422] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 하나의 Fab 단편, 항-BCMA 항체의 하나의 Fab 단편 및 Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 하나의 Fc 부분을 포함하는 2가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 (a) 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고; 및 또한 (b) 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 3B에 예시되어 있다.

[0423] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 하나, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 하나 및 Fc - BCMA Fab - CD3 Fab 형식에 따른 Fc 부분 하나를 포함하는 2가 이중특이적 항체이다.

[0424] 항-BCMA Fab 단편은 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 3C에 예시되어 있다.

[0425] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 하나, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 하나 및 Fc - BCMA Fab - CD3 Fab 형식에 따른 Fc 부분 하나를 포함하는 2가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 (a) 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고; 및 또한 (b) 표 4 또는 표 5에 제시된 아미노산 변형을 포함한다. 이 실시예는 표 4에 제시된 아미노산 변형과 함께 도 3D에 예시되어 있다.

[0426] 일 실시예에서, 도 2에 예시된 항체는 표 2 또는 표 3에 제시된 변형을 추가로 포함한다. 예를 들어, 도 2에 예시된 항체는 표 2에 제시된 변형과 조합하여 표 4에 제시된 변형을 포함할 수 있다. 대안적으로, 도 2에 예시된 항체는 표 3에 제시된 변형과 조합하여 표 5에 제시된 변형을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개 및 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 각각의 항-BCMA Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 아미노산 변형 K147E 및 K213E(EU 넘버링에 따름)를 포함하는 CH1 도메인을 포함하고, 여기서 경쇄는 아미노산 변형 E123R 및 Q124K(Kabat에 따라 넘버링됨)(즉, 표 4에 제시된 변형)를 포함하는 상응하는 CL을 포함한다. Fc 부분은 제1 Fc쇄 및 제2 Fc쇄를 포함하고, 여기서 제1 Fc쇄는 제1 불변 도메인 CH2 및 제1 불변 도메인 CH3을 포함하고, 제2 Fc쇄는 제2 불변 도메인 CH2 및 제2 불변 도메인 CH3을 포함한다. 제1 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 제1 항-BCMA Fab의 C-말단에 결합되고, 제2 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-CD3 Fab의 C-말단에 결합된다. 제1 CH3 도메인은 변형 T366S, L368A 및 Y407V("홀 변형")를 포함하고 제2 CH3 도메인은 변형

T366W("노브 변형")(EU 넘버링에 따름)(즉, 표 2에 제시된 변형)를 포함한다. 추가로, 두 Fc쇄는 변형 L234A, L235A 및 P329G, 및 선택적으로 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따름)을 더 포함한다. 선택적으로, 제1 CH3 도메인은 아미노산 변형 S354C를 더 포함하고, 제2 CH3 도메인은 아미노산 변형 Y349C(EU 넘버링에 따름)를 더 포함하여 두 CH3 도메인 사이에 디설파이드 가교가 형성되도록 한다.

- [0427] 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, 항-BCMA 항체의 Fab 단편 2개 및 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 Fc 부분 1개를 포함하는 3가 이중특이적 항체이다. 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이다. 각각의 항-BCMA Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 아미노산 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E(EU 넘버링에 따름)를 포함하는 CH1 도메인을 포함하고, 여기서 경쇄는 아미노산 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R(Kabat 넘버링에 따름) (즉, 표 5에 제시된 변형)을 포함하는 상응하는 CL 도메인을 포함한다. Fc 부분은 제1 Fc쇄 및 제2 Fc쇄를 포함하고, 여기서 제1 Fc쇄는 제1 불변 도메인 CH2 및 제1 불변 도메인 CH3을 포함하고, 제2 Fc쇄는 제2 불변 도메인 CH2 및 제2 불변 도메인 CH3을 포함한다. 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하고 제2 CH3 도메인은 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W(EU 넘버링에 따름) (즉, 표 3에 제시된 변형)를 포함한다. 추가로, 두 Fc쇄는 변형 L234A, L235A 및 P329G, 및 선택적으로 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따름)을 더 포함한다.
- [0428] 일부 실시예에서, 항-BCMA Fab 단편은 하기 군으로부터 선택된 CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L 및 CDR3L 영역 조합을 포함한다:
- [0429] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:23의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:24의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역,
- [0430] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역,
- [0431] c) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역,
- [0432] d) SEQ ID NO:29의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:30의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역,
- [0433] e) SEQ ID NO:34의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:35의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역,
- [0434] f) SEQ ID NO:36의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:37의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:31의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:32의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:33의 CDR3L 영역,
- [0435] g) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, 및 SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역, 및
- [0436] 항-CD3 Fab 단편은 SEQ ID NO:1의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:2의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:3의 CDR3H 영역, SEQ ID NO:4의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:5의 CDR2L, 및 SEQ ID NO:6의 CDR3L 영역을 포함한다.
- [0437] 일부 실시예에서, 항-BCMA Fab 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL을 포함한다:
- [0438] a) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0439] b) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:13의 VL 영역,
- [0440] c) SEQ ID NO:10의 VH 영역 및 SEQ ID NO:14의 VL 영역,
- [0441] d) SEQ ID NO:38의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0442] e) SEQ ID NO:39의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역,
- [0443] f) SEQ ID NO:40의 VH 영역 및 SEQ ID NO:12의 VL 영역, 또는
- [0444] g) SEQ ID NO:9의 VH 영역 및 SEQ ID NO:11의 VL 영역; 및
- [0445] 항-CD3 Fab 단편은 SEQ ID NO:7의 VH 영역 및 SEQ ID NO:8의 VL 영역을 포함한다.

- [0446] 추가 실시예에서, 본 발명에 따른 다중특이성(예를 들어, 이중특이적 항체)은 하기 서열 번호(SEQ ID NO)(하기 표 6A, 7B 및 7C에 언급됨)를 포함한다:
- [0447] 83A10-TCBcv: 45, 46, 47 (x2), 48 (도 2A)
- [0448] 21-TCBcv: 49, 50, 51 (x2), 48 (도 2A)
- [0449] 22-TCBcv: 52, 53, 54 (x2), 48 (도 2A)
- [0450] 42-TCBcv: 55, 56, 57 (x2), 48 (도 2A)
- [0451] Mab101: 58, 59, 60(x2), 48(도 2A, 그러나 경쇄 불일치/부산물을 줄이기 위해 CL-CH1에서 대안적인 아미노산 치환 있음: A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR"), 예시된 "RK/EE" 치환보다는)
- [0452] Mab102: 61, 62, 63(x2), 48(도 2A, 그러나 경쇄 불일치/부산물을 감소시키기 위해 CL-CH1에서 대안적 아미노산 치환 있음: A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR"), 예시된 "RK/EE" 치환보다는)
- [0453] Mab103: 64, 65, 66(x2), 48(도 2A, 그러나 경쇄 불일치/부산물을 줄이기 위해 CL-CH1에서 대안적 아미노산 치환 있음: A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR"), 예시된 "RK/EE" 치환보다는).
- [0454] 본 명세서에 사용된 용어 "83A10-TCBcv"는 SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47(2x), 및 SEQ ID NO:48의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해 특정된 것과 같이, 또 도 2A에 예시되고 EP14179705에 기재된 것과 같이 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다.
- [0455] 본 명세서에서 사용된 용어 "21-TCBcv, 22-TCBcv, 42-TCBcv"는 각각 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, 및 SEQ ID NO:51(2x)의 중쇄 및 경쇄 조합으로 특정되는 Mab21, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, 및 SEQ ID NO:54 (2x)의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해 특정된 Mab22, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, 및 SEQ ID NO:57-(2x)의 중쇄 및 경쇄 조합에 의해 특정된 Mab42의 이중특이적 항체를 지칭하며, 도 2A에 보인 것과 WO 2017/021450에 기재된 것과 같다.
- [0456] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "Mab101"이라는 용어는 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60(2x), 및 SEQ ID NO:59의 중쇄 및 경쇄 조합으로 특정되는 것과 같이 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 의미하며, 도 2A에 도시된 바와 같다(그러나 예시된 "RK/EE" 치환 보다는 경쇄 미스페어링/부산물을 감소시키기 위해 CL-CH1에서 대안적인 아미노산 치환으로서 A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR")으로). 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "Mab102"라는 용어는 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63(2x)의 중쇄 및 경쇄 조합으로 특정되는 바와 같이, 그리고 도 2A에 나타난 바와 같이 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 의미한다(그러나 예시된 "RK/EE" 치환 보다는 경쇄 미스페어링/부산물을 감소시키기 위해 CL-CH1에서 대안적인 아미노산 치환으로서 A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR")으로). 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "Mab103"이라는 용어는 SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66(2x) 및 SEQ ID NO:65의 그 중쇄 및 경쇄 조합에 의해 특정된 것과 같이, 그리고 도 2에 보인 것과 같이 BCMA 및 CD3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체를 의미한다(그러나 예시된 "RK/EE" 치환 보다는 경쇄 미스페어링/부산물을 감소시키기 위해 CL-CH1에서 대안적인 아미노산 치환으로서 A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR")으로).
- [0457] 바람직한 실시예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 42-TCBcv이다. 본 명세서에 사용된 용어 "CC-93269"는 이중특이적 항체 42-TCBcv를 지칭한다.
- [0458] **안정성이 향상된 항체(Antibodies with improved stability)**
- [0459] 본 명세서에서는 이러한 변형(들)이 없는 항체와 비교하여 개선된 안정성(예: 개선된 물리화학적 특성)을 제공하는 하나 이상의 아미노산 변형(들)을 갖는 BCMA 및 T-세포 항원(예: CD3)에 대한 다중특이적(예: 이중특이적) 항체가 제공된다. 또한, 핵산 분자, 벡터, 숙주 세포 및 이를 포함하는 약학 조성물, 이를 제조하는 방법 및 치료 방법을 포함하는 이의 용도가 제공된다.
- [0460] 본 발명의 한 측면에서, BCMA 및 T-세포 항원에 결합하는 다중특이적 항체가 제공되며, 여기서 다중특이적 항체는 (i) 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편; (ii) 항-T 세포 항원 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

(iii) Fc를 포함하며, 여기서 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:

- [0461] a) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO:27의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:28의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 VL 도메인;
- [0462] b) SEQ ID NO:21의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:22의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 도메인 및 SEQ ID NO:25의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:26의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 VL 도메인; 또는
- [0463] c) SEQ ID NO:15의 CDR1H 영역, SEQ ID NO:16의 CDR2H 영역, SEQ ID NO:17의 CDR3H 영역을 포함하는 VH 영역 및 SEQ ID NO:18의 CDR1L 영역, SEQ ID NO:19의 CDR2L 영역, 및 SEQ ID NO:20의 CDR3L 영역을 포함하는 VL 도메인,
- [0464] 여기서, 다중특이적 항체는 CH1 도메인 및 CL 도메인을 포함하고, 여기서 CH1 도메인은 위치 A141, L145, K147 및 Q175(EU 넘버링에 따름)에서의 변형을 포함하고, CL 도메인은 위치 F116, Q124, L135 및 T178(Kabat에 따름)에서의 변형을 포함하고, 그리고 여기서, Fc는 제1 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제1 Fc쇄, 및 제2 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하는 제2 Fc쇄를 포함하고, 여기서 제1 CH3 도메인은 위치 T350, L351, F405 및 Y407(EU 넘버링에 따름)에서의 아미노산 변형을 포함하고 및 제2 CH3 도메인은 위치 T350, T366, K392 및 T394(EU 넘버링에 따름)에서의 아미노산 변형을 포함하며, 선택적으로 여기서 T 세포 항원은 CD3이다.
- [0465] 일부 실시예에서, CH1 도메인은 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E, 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름) 중 2개 이상(예를 들어, 모두)을 포함하고, 여기서 CL 도메인은 변형 F116A, Q124R, L135V 및 T178R, 또는 그의 보존적 치환(Kabat에 따름) 중 2개 이상(예를 들어, 모든)을 포함한다.
- [0466] 아미노산 변형을 함유하는 CH1 도메인 및 CL 도메인은 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 항-T 세포 항원 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 항-BCMA 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 아미노산 변형을 포함하는 CH1 도메인 및 CL 도메인을 포함한다.
- [0467] 일부 실시예에서, 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V 중 하나 이상, 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름) 중 하나 이상을 포함하고, 제2 CH3 도메인은 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W, 또는 이들의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름) 중 하나 이상을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V, 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름); 제2 CH3 도메인은 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W, 또는 이들의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름)을 포함한다.
- [0468] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하고, 여기서 항-CD3 항체의 VH 도메인은 각각 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로서 SEQ ID NO:1, 2 및 3의 CDR을 포함하고, 그리고 항-CD3 항체의 VL 도메인은 각각 경쇄 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로서 SEQ ID NO:4, 5 및 6의 CDR을 포함한다.
- [0469] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 SEQ ID NO:7의 VH 및 SEQ ID NO:8의 VL을 포함하는 항-CD3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0470] 일부 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 IgG1 Fc를 포함하고, 선택적으로 Fc는 다음을 포함한다:
- [0471] a) 변형 L234A, L235A 및 P329G(EU 넘버링에 따름) 및/또는
- [0472] b) 변형 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따름).
- [0473] 일 실시예에서, 본 발명의 다중특이적 항체는 항-BCMA 항체의 2개의 Fab 단편 및 항-CD3 항체의 1개의 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 3가 항체이고, 선택적으로 항체는 Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식이다.
- [0474] 본 발명의 한 측면에서, BCMA 및 CD3에 결합하는 다중특이적 항체가 제공되며, 여기서 다중특이적 항체는 3가 이중특이적 항체의 형식이고, 여기서 다중특이적 항체는 항-CD3 항체의 Fab 단편 1개, BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식에 따른 항-BCMA 항체의 2개의 Fab 단편 하나의 Fc를 포함하고, 여기서:
- [0475] a) 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고,

- [0476] b) 각각의 항-BCMA Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CL을 포함하고, 중쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CH1을 포함하고, 여기서:
- [0477] (i) 가변 도메인 VH는 각각 SEQ ID NO: 21, 22 및 17의 중쇄 CDR 1-3을 포함하고, 가변 도메인 VL은 각각 SEQ ID NO: 27, 28 및 20의 경쇄 CDR 1-3을 포함하고;
- [0478] (ii) 가변 도메인 VH는 각각 SEQ ID NO: 21, 22 및 17의 중쇄 CDR 1-3을 포함하고, 가변 도메인 VL은 각각 SEQ ID NO: 25, 26 및 20의 경쇄 CDR 1-3을 포함하고; 또는
- [0479] (iii) 가변 도메인 VH는 각각 SEQ ID NO: 15, 16 및 17의 중쇄 CDR 1-3을 포함하고, 가변 도메인 VL은 각각 SEQ ID NO: 18, 19 및 20의 경쇄 CDR 1-3을 포함하고;
- [0480] c) 각각의 항-BCMA Fab 단편의 CH1 도메인은 변형 A141W, L145E, K147T 및 Q175E 또는 그의 보존적 치환(EU 넘버링에 따름)을 포함하고, 각 항-BCMA Fab 단편의 상응하는 CL 도메인은 변형 F116A, Q124R, L135V, T178R 또는 그의 보존적 치환(Kabat 넘버링에 따름)을 포함하고,
- [0481] d) Fc는 제1 Fc쇄 및 제2 Fc쇄를 포함하고, 제1 Fc쇄는 제1 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하고, 제2 Fc쇄는 제2 불변 도메인 CH2 및 CH3을 포함하고, 여기서 제1 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-BCMA Fab 단편의 C-말단에 연결되고, 그리고 제2 Fc쇄는 Fc의 N-말단에서 항-CD3 Fab 단편의 C-말단에 결합되고, 여기서:
- [0482] (i) 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하고 제2 CH3 도메인은 변형 T350V, T366L, K392L 및 T394W(EU 넘버링에 따름)를 포함하고, 그리고
- [0483] (ii) 두 Fc 사슬은 변형 L234A, L235A 및 P329G, 및 선택적으로 변형 D356E 및 L358M(EU 넘버링에 따름)을 포함한다.
- [0484] 본 발명의 추가적 측면에서, BCMA 및 CD3에 결합하는 3가 이중특이적 항체가 제공되며, 여기서 3가 이중특이적 항체는 다음 SEQ ID NO들을 포함한다:
- [0485] i. Mab101: 58, 59, 48, and 2x 60.
- [0486] ii. Mab102: 61, 62, 48, and 2x 63.
- [0487] iii. Mab103: 64, 65, 48, and 2x 66.
- [0488] 각 분자 Mab101, Mab102 및 Mab103은 도 2A에 나타난 바와 같이 2+1 이중특이적 형식이지만 CL-CH1에 대체 아미노산 치환을 사용하여 경쇄 불일치/부산물물을 감소시킨다: 예시된 "RK/EE" 치환보다는 A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR").
- [0489] 또 다른 측면에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제(excipient)를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 관련된 측면에서, 본 발명의 3가 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0490] 또 다른 측면에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체, 본 발명의 3가 이중특이적 항체 또는 본 발명의 약학 조성물은 의약으로서 사용하기 위한 것이다.
- [0491] 관련 측면에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체, 본 발명의 3가 이중특이적 항체, 또는 본 발명의 약학 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간)에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0492] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체, 본 발명의 3가 이중특이적 항체 또는 본 발명의 약학 조성물은 형질 세포 장애의 치료를 위한 의약으로서 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 형질 세포 장애는 암이다. 바람직한 실시예에서, 암은 다발성 골수종 또는 형질 세포 백혈병이다.
- [0493] **약학 조성물(Pharmaceutical Compositions)**
- [0494] 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 약학 조성물로서 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0495] 본 명세서에 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전(Pharmacopeia), 유럽 약전 또는 동물, 보다 특히 인간에서의 사용에 대해 일

반적으로 인정되는 기타 약전에 나열된 것을 의미한다.

- [0496] 본 명세서에 개시된 약학 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하고, 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 관리 또는 개선하는데, 및/또는 연구에 사용하기 위한 것이지만 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에 개시된 약학 조성물은 수의학적 용도 또는 인간의 약학적 용도에 적합할 수 있다.
- [0497] 적합한 부형제의 예는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 많은 경우에, 당, 다가알코올 또는 염화나트륨과 같은 등장제(isotonic agents)를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 특히, 적합한 부형제의 관련 예에는 (1) 약 1mg/mL 내지 25mg/mL 인간 혈청 알부민을 함유하거나 함유하지 않는 등배 인산염 완충 식염수(pH 약 7.4), (2) 0.9% 식염수(0.9% w/v 염화나트륨(NaCl)), 및 (3) 5%(w/v) 텍스트로스가 포함되고, 트립타민과 같은 항산화제 및 Tween 20®과 같은 안정화제를 함유할 수도 있다.
- [0498] 당업자는 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체와 함께 사용하기 위한 부형제 또는 부형제의 적절한 선택이 약학 조성물의 원하는 특성에 의존할 것임을 이해할 것이다.
- [0499] 본 발명의 약학 조성물 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 임의의 적절한 진신 또는 국소 투여 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 투여는 경구, 흡입, 설하, 안과, 비강, 기관 내, 폐, 국소, 경피, 비노생식기, 직장, 피하, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 두개 내, 척추강 내, 경막 외, 뇌실 내 또는 종양 내일 수 있다. 일부 실시예에서, 약학 조성물 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 정맥 내 또는 피하 투여된다. 바람직한 실시예에서, 약학 조성물 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체는 정맥 내 투여된다.
- [0500] 본 발명의 약학 조성물은 임의의 적절한 수단, 예를 들어 표피 또는 경피 패치, 연고, 로션, 크림 또는 젤; 분무기, 기화기 또는 흡입기에 의한 것; 주사 또는 주입에 의해; 또는 캡슐, 정제, 물 또는 비수성 매질 중 액체 용액 또는 현탁액, 점적제, 좌제, 관장제, 스프레이 또는 분말 형태로 제형화될 수 있다. 주어진 경우에 가장 적합한 투여 경로는 환자의 신체적, 정신적 상태, 질병의 특성 및 중증도, 제형의 원하는 특성에 따라 다르다.
- [0501] **단독 요법 및 조합 요법(Monotherapies and Combination Therapies)**
- [0502] 일부 실시예에서, 치료는 단일요법으로서 대상체에 대한 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 투여를 포함한다.
- [0503] 일부 실시예에서, 치료는 조합 요법으로서 대상체에게 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 투여를 포함하고, 여기서 조합 요법은 본 발명의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 및 하나 이상의 추가 치료제의 투여를 포함한다. 용어 "조합 요법(combination therapy)"은 단일 환자에게 선택된 치료제의 투여를 포함하는 것을 의미하고, 제제가 동일하거나 상이한 투여 경로에 의해 또는 동일하거나 상이한 시간에 투여되는 치료를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0504] 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 항염산(예: 메토틱세이트), 퓨린 합성 억제제(예: 아자티오프린, 미코페놀레이트 및/또는 미코페놀레이트 모페틸), C5a 억제제(예: 아바코판), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체(예: 리툽시맙), 스테로이드, 브루톤의 티로신 키나제(BTK) 억제제 및/또는 BAFF/APRIL 길항제(예: 항-BAFF 항체)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0505] 본 발명자들은 관해 유도(remission induction) 및/또는 관해 유지에서 스테로이드가 최소한으로 필요하다는 것을 확인하였다. 따라서, 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 예를 들어 글루코코르티코이드와 같은 스테로이드가 아니다.
- [0506] 일부 실시예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 탈리도마이드 및 그의 면역치료 유도체, 항-CD38 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 감마 세크레타제 억제제(GSI), 항-BCMA 항체 약물 접합체 및 항-BCMA CAR T-세포 요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0507] 본 명세서에 사용된 용어 "항-CD38 항체"는 인간 CD38에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에서 항-CD38 항체는 다라투무맙(US20150246123)이다. 본 발명의 일 실시예에서 항-CD38 항체는 이사툽시맙(SAR650984, US8877899)이다. 본 발명의 일 실시예에서 항-CD38 항체는 MOR202이다(WO 2012041800). 본 발명의 일 실시예에서 항-CD38 항체는 Ab79(US8362211)이다. 본 발명의 일 실시예에서 항-CD38 항체는 Ab19(US8362211)이다. 이러한 항-CD38 항체의 투여량은 최신 기술에 따라 수행되고 각각의 처방 정보에 설명되

어 있다. 예를 들어 다라투무맙 용량은 일반적으로 16mg/kg이다(www.ema.europa.eu).

- [0508] 본 명세서에 사용된 용어 "탈리도마이드 화합물" 또는 "탈리도마이드 및 면역치료 유도체"는 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2,3-디히드로-1H-이소인돌-1,3-디온 및 이의 면역치료 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 실시예에서 탈리도마이드 화합물은 탈리도마이드(CAS 등록 번호 50-35-1), 레날리도마이드(CAS 등록 번호 191732-72-6), 포말리도마이드(CAS 등록 번호 19171-19-8), CC122(CAS 등록 번호 1398053-45-6) 및 CC-220(CAS 등록 번호 1323403-33-3) 및 각각의 염(바람직하게는 HCl 염 1:1)으로 이루어지는 군으로부터 선택되나 이에 한정되지는 않는다. CC-122의 화학식은 2,6-피페리딘디온, 3-(5-아미노-2-메틸-4-옥소-3(4H-퀴나졸리닐), 염산염(1:1)이고 CC-220의 화학식은 2,6-피페리딘디온, 3-[1,3-디히드로-4-[[4-(4-포르폴리닐메틸)페닐]메톡시]-1-옥소-2H-이소인돌-2-일]-, (3S)-, 염산염 (1:1)이다. CC-220을 제조하는 방법은 예를 들어, US 20110196150에 기재되어 있으며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0509] 탈리도마이드 화합물의 투여량은 최신 기술에 따라 수행되며 각각의 처방 정보에 설명되어 있다. 예를 들어 Revlimid®(레날리도마이드) 투여량은 일반적으로 반복되는 28일 주기의 1-21일에 1일 1회 25mg이고(www.revlimid.com) 다발성 골수종 치료를 위한 POMALYST®(포말리도마이드) 투여량은 일반적으로 반복되는 28일 주기의 1-21일에 경구로 1일 4mg이다. 일 실시예에서, 3-(5-아미노-2-메틸-4-옥소-4H-퀴나졸린-3-일)-피페리딘-2,6-디온은 1일 약 5 내지 약 50 mg의 양으로 투여된다.
- [0510] 일 실시예에서, CC-122 및 CC-220은 1일 약 5 내지 약 25 mg의 양으로 투여된다. 또 다른 실시예에서, CC-122 및 CC-220은 1일 약 5, 10, 15, 25, 30 또는 50 mg의 양으로 투여된다. 또 다른 실시예에서, 10 또는 25 mg의 CC-122 및 CC-220이 하루에 투여된다. 일 실시예에서, CC-122 및 CC-220은 1일 2회 투여된다.
- [0511] 본 명세서에 사용된 용어 "항-PD-1 항체(anti-PD-1 antibody)"는 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 이러한 항체는 예를 들어 WO2015026634(MK-3475, 캄브롤리주맙), US7521051, US8008449, 및 US8354509에 기술되어 있다. 캄브롤리주맙(Keytruda®, MK-3475)은 또한 WO 2009/114335, Poole, R.M. Drugs (2014) 74: 1973; Seiwert, T., et al., J. Clin. Oncol. 32,5s (suppl;abstr 6011)에 기재되어 있다. 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 MK-3475(WHO Drug Information, Vol. 27, No. 2, pages 161-162 (2013))이고 이는 WO 2015026634의 도 6에 나타난 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 캄브롤리주맙의 아미노산 서열은 WO2008156712(경쇄 CDR SEQ ID NOS:15, 16, 및 17 및 중쇄 CDR 서열 번호 18, 19 및 20)에 기재되어 있다. 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 니볼루맙이다(BMS-936558, MDX 1106; WHO Drug Information, Vol. 27, No. 1, pages 68-69 (2013), WO2006/121168 WO에 제시된 아미노산 서열 2015026634). 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 다음과 같다: 피딜리주맙(CT-011, hBAT 또는 hBAT-1로도 알려짐; 아미노산 서열 참조 WO2003/099196; WO 2009/101611, Fried I. et al.; Neuro Oncol (2014) 16 (suppl 5): v111-v112.). 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 MEDI-0680이다(AMP-514, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, Hamid O. et al.; J Clin Oncol 33, 2015(suppl; abstr TPS)). 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 PDR001이다(Naing A. et al.; J Clin Oncol 34, 2016(suppl; abstr 3060)). 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 REGN2810이다(Papadopoulos KP et al., J Clin Oncol 34, 2016(suppl; abstr 3024)).
- [0512] 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 캄브롤리주맙(WO2008/156712)이다. 본 발명의 일 실시예에서 PD-1 항체는 WO2008/156712에 기재된 h409A1 I, h409A16 또는 h409A17이다. 이러한 항-PD-1 항체의 투여량은 최신 기술에 따라 수행되며 각각의 처방 정보에 설명되어 있다. 예를 들어 Keytruda®는 일반적으로 3주마다 체중에 대해 2mg/kg의 농도로 투여된다(http://ec.europa.eu/health/documents).
- [0513] 본 명세서에 사용된 용어 "항-PD-L1 항체(anti-PD-L1 antibody)"는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 이러한 항체는 예를 들어 WO2015026634, WO2013/019906, WO2010/077634 및 US8383796에 기술되어 있다. 본 발명의 일 실시예에서 PD-L1 항체는 MPDL3280A이다(아테졸리주맙, YW243.55.S70, WO2010/077634, McDermott DF. Et al., JCO March 10, 2016 vol. 34 no. 8 833-842). 본 발명의 일 실시예에서 PD-L1 항체는 MDX-1105이다(BMS-936559, WO2007/005874, Patrick A. Ott PA et al., DOI: 10.1158/1078-0432, Clinical Cancer Research-13-0143). 본 발명의 일 실시예에서 PD-L1 항체는 MEDI4736이다(두르발루맙, WO 2016/040238 Gilbert J. et al., Journal for ImmunoTherapy of Cancer 20153(Suppl 2):P152). 본 발명의 일 실시예에서 PD-L1 항체는 MSB001071 8C이다(아벨루맙, Disis ML. et al., Journal of Clinical Oncology, Vol 33, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2015: 5509). 본 발명의 일 실시예에서 PD-L1 항체는 WO2016007235에 기재된 바와 같은 SEQ ID NO:16의 VH 서열 및 SEQ ID NO:17의 VL 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체이다. 이러한 항-PD-L1 항체의 투여량은 최신 기술에 따라 수행되며 각각의 처방 정보에 설명되어 있다. 예를 들어 아테졸리주맙은

일반적으로 3주마다 60분에 걸쳐 정맥 내 주입으로 1200mg의 농도로 투여된다(www.accessdata.fda.gov).

[0514] 본 명세서에 사용된 용어 "감마 세크레타제(gamma secretase)"는 감마 세크레타제 절단 서열을 갖는 기질에 결합하고, 기질 절단물(substrate cleavage products)을 생산하기 위해 감마 세크레타제 절단 부위에서 감마 세크레타제 절단 서열의 절단을 촉매하는 것을 포함하는 감마 세크레타제 활성을 나타내는 임의의 단백질 또는 단백질 복합체를 지칭한다. 일 실시예에서, 감마 세크레타제는 하기 서브유닛 중 하나 이상을 포함하는 단백질 복합체이다: 프레세닐린, 니카스트린, 감마-세크레타제 서브유닛 APH-1, 및 감마-세크레타제 서브유닛 PEN-2.

[0515] 본 명세서에 사용된 용어 "감마 세크레타제 억제제(gamma secretase inhibitor)" 또는 "GSI"는 감마 세크레타제의 발현 및/또는 기능을 억제하거나 감소시킬 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 특정 실시예에서, GSI는 감마 세크레타제의 서브유닛(예를 들어, 프레세닐린, 니카스트린, APH-1, 또는 PEN-2)의 발현 및/또는 기능을 감소시킨다. 염, 공결정(co-crystal), 결정형, 전구약물 등과 같은 임의의 형태의 "감마 세크레타제 억제제"가 이 용어에 포함된다. 일부 실시예에서, GSI는 항체 또는 항원-결합 단편, 소분자, 단백질 또는 펩티드 및 핵산으로부터 선택된다.

[0516] **유해 사례(Adverse events)**

[0517] 일부 실시예에서, 환자는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체의 투여와 관련된 유해 사례를 발병하거나 발병할 위험이 있다. 유해 사례는 사이토카인 유발 독성(예: 사이토카인 방출 증후군(CRS)), 주입 연관 반응(IRR), 감염, 대식세포 활성화 증후군(MAS), 신경학적 독성, 중증 중앙 용해 증후군(TLS), 호중구 감소증, 혈소판 감소증, 간 효소 상승 및/또는 중추 신경계(CNS) 독성일 수 있다. 특정 실시예에서, 유해 사례는 CRS이다.

[0518] 환자가 다중특이적(예: 이중특이적) 항체의 투여와 관련된 유해 사례(adverse event)를 발생시키거나 발병할 위험이 있는 경우, 치료는 유해 사례의 발병 또는 발병 위험을 치료, 예방, 지연, 감소, 또는 약화시킬 수 있는 제제(agent)의 투여를 더 포함할 수 있다. 제제는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체로 치료를 시작하기 전에(예를 들어, 유해 사례 발생 위험을 예방하거나 감소시키기 위한 예방으로서) 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체로 치료하는 동안 환자에게 투여될 수 있다(예: 유해 사례 발생 반응하여).

[0519] 일부 실시예에서, 제제는 코르티코스테로이드와 같은 스테로이드를 포함한다. 본 명세서에 사용된 "코르티코스테로이드"는 콜레스테롤로부터 유도될 수 있고 수소화된 시클로펜타노페히드로페난트렌 고리 시스템을 특징으로 하는 임의의 천연 발생 또는 합성 스테로이드 호르몬을 의미한다. 자연적으로 발생하는 코르티코스테로이드는 일반적으로 부신 피질에서 생성된다. 합성 코르티코스테로이드는 할로겐화될 수 있다. 활성화에 필요한 작용기는 $\Delta 4$ 의 이중 결합, C3 케톤 및 C20 케톤을 포함한다. 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드 및/또는 무기질 코르티코이드 활성을 가질 수 있다. 예시적인 코르티코스테로이드의 예는 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론, 베타메타손, 부데소니드, 및 텍사메타손을 포함한다.

[0520] 일부 실시예에서, 제제는 GM-CSF, IL-10, IL-10R, IL-6, IL-6 수용체(IL-6R), IFN γ , IFNGR, IL-2, IL-2R/CD25, MCP-1, CCR2, CCR4, MIP1 β , CCR5, TNF α , TNFR1, IL-1, 및 IL-1 α /IL-1 β 중에서 선택되는 사이토카인 수용체 또는 사이토카인의 길항제(antagonist)를 포함하며, 여기서 길항제는 항체 또는 항원-결합 단편, 소분자, 단백질 또는 펩티드 및 핵산으로부터 선택된다. 길항제(antagonist)는 항-IL-6 항체 및/또는 항-IL6R 항체일 수 있다. 예를 들어, 길항제는 토실리주맙, 실툽시맙, 클라자키주맙, 사릴루맙, 올로키주맙, 엘실리모맙, ALD518/BMS-945429, 시루쿠맙(CNT0136), CPSI-2634, ARGX-109, FE301 및 FM101 중에서 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 길항제는 토실리주맙 및/또는 실툽시맙이다.

[0521] 일부 실시예에서, 작용제는 조절 T 세포(Treg) 집단을 감소시키는 분자를 포함한다. Treg 세포의 수를 감소시키는(예를 들어, 고갈시키는) 제제는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 CD25 고갈, 시클로포스파미드 투여, 항-CTLA4 항체 및 글루코코르티코이드-유도된 TNLR 패밀리에 연관 유전자(GITR) 기능 조절을 포함한다. GITR은 활성화된 T 세포에서 상향 조절되는 TNLR 슈퍼패밀리의 구성원으로 면역 체계를 강화한다. 일부 실시예에서, 치료는 시클로포스파미드의 투여를 포함한다.

[0522] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 이중특이적 항체로 처리한 후 유의하거나 최소의 사이토카인 방출을 관찰하지 않았다. 따라서, 유해 사례가 사이토카인-유도 독성(예: CRS)인 일부 실시예에서, 치료는 사이토카인 수용체 또는 사이토카인의 길항제와 같은 부작용과 같은 유해 사례의 발병 또는 발병 위험을 치료, 예방, 지연, 감소 또는 약화시킬 수 있는 제제의 투여를 추가로 포함하지 않는다.

[0523] **주의 사항**

[0524] 상기 실시예는 예시적인 것으로 이해되어야 한다. 추가 실시예들이 예상된다. 임의의 일 실시예와 관련하여 설명된 임의의 특징은 단독으로, 또는 설명된 다른 특징과 조합하여 사용될 수 있으며, 또한 임의의 다른 실시예 또는 임의의 다른 실시예들의 임의의 조합의 하나 이상의 특징과 조합하여 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 첨부된 특허청구범위에 정의된 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 위에서 설명되지 않은 균등물 및 변형이 사용될 수도 있다.

[0525] 본 발명의 맥락에서 본 명세서에 기재된 항체 및 방법의 다른 예 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 예 및 변형은 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 있다.

[0526] 본 명세서에 인용된 모든 문서는 인용된 문서에 제공된 모든 데이터, 표, 도면 및 텍스트를 포함하여 각각 전체적으로 참조로 통합된다.

표 6

[0527] 표6A: 항체 서열(Antibody sequences)

SEQ ID NO:	명칭(들)	아미노산 서열
1	CD3 CDR1H	TYAMN
2	CD3 CDR2H	RIRSKYNNYATYYADSVKG
3	CD3 CDR3H	HGNFGNSYVSWFAY
4	CD3 CDR1L	GSSTGAVTTSNYAN
5	CD3 CDR2L	GTNKRAP
6	CD3 CDR3L	ALWYSNLWV
7	CD3 VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWWSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLTVTS
8	CD3 VL	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
9	83A10 VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFQDYWGQGLTVTVSS
10	Mab21 VHMab22 VH Mab42 VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFQDYWGQGLTVTVSS
11	83A10 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
12	Mab21 VLMab27 VL Mab33 VL Mab39 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEYLLAWYQQKPGQAPRLLIEHASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
13	Mab22 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
14	Mab42 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSEYLLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKVEIK
15	83A10 CDR1H	SYAMS
16	83A10 CDR2H	AISGSGGSTYYADSVKG
17	83A10 CDR3HMab21 CDR3H Mab22 CDR3H Mab42 CDR3H Mab27 CDR3H Mab33 CDR3H Mab39 CDR3H	VLGWFQDY
18	83A10 CDR1L	RASQSVSSSYLA
19	83A10 CDR2L	GASSRAT
20	83A10 CDR3LMab21 CDR3L Mab22 CDR3L Mab42 CDR3L	QQYGYPPDFT
21	Mab21 CDR1HMab22 CDR1H Mab42 CDR1H	DNAMG
22	Mab21 CDR2HMab22 CDR2H Mab42 CDR2H	AISGPGSSTYYADSVKG
23	Mab21 CDR1L	RASQSVSEYLLAW

24	Mab21 CDR2L	EHASTRAT
25	Mab22 CDR1L	RASQSVSSYYLA
26	Mab22 CDR2L	GAGSRAT
27	Mab42 CDR1L	RASQSVSDEYLS
28	Mab42 CDR2L	SASTRAT
29	Mab27 CDR1H	SAPMG
30	Mab27 CDR2H	AISYIGHTYYADSVKG
31	Mab27 CDR1LMab33 CDR1L Mab39 CDR1L	RASQSVSEYYLA
32	Mab27 CDR2LMab33 CDR2L Mab39 CDR2L	HASTRAT
33	Mab27 CDR3LMab33 CDR3L Mab39 CDR3L	QQYGYPPDFT
34	Mab33 CDR1H	TNAMG
35	Mab33 CDR2H	AINRFGGSTYYADSVKG
36	Mab39 CDR1H	QNAMG
37	Mab39 CDR2H	AISPTGFSTYYADSVKG
38	Mab27 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAPMGWVRQAPGKGLEWVSAISYI GHTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSS
39	Mab33 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYTNAMGWVRQAPGKGLEWVSAINRFGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSS
40	Mab39 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTQNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISPTGFSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSS
41	83A10 BCMA CH1Mab21 BCMA CH1 Mab22 BCMA CH1 Mab42 BCMA CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
42	83A10 BCMA CLMab21 BCMA CL Mab22 BCMA CL Mab42 BCMA CL	RTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
44	CD3 CL	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
45	83A10 knob HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSAQAVVTQEPSTLTVSPGGTV TLTCCSGSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGLTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	83A10 hole HC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
47	83A10 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	CD3 LC	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWSVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

49	Mab21 knob HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
50	Mab21 hole HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
51	Mab21 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSEYYLAWYQQKPGQAPRLLIEHA STRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGGQTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
52	Mab22 knob HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
53	Mab22 hole HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
54	Mab22 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYYLAWYQQKPGQAPRLLISGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGGQTKVEIKRTVAAPS VFI FPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	Mab42 knob HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGSGGGGSAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTTSNYANWVQEPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
56	Mab42 hole HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWWSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

57	Mab42 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAIISRLPEPDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFFPSDRKLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	Mab101 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
59	Mab101 HC-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
60	Mab101 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKEIKRTVAAPSVAFIPPSDERLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSRRLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	Mab102 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	Mab102 HC-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
63	Mab102 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI SGAGSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKEIKRTVAAPSVAFIPPSDERLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSRRLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
64	Mab103 HC-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

65	Mab103 HC-2	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFWDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYVLPSPREEMTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
66	Mab103 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLAIISRLPEDFAVYYCQYGYPPDFTFGQGTKEIKRTVAAPSVAIFPPSERLKSQTASVVCVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
67	83A10 CDR1L (SEQ NO:18에 대한 대안)	ID RASQSVSSSYLAW
68	83A10 CDR2L (SEQ NO:19에 대한 대안)	ID YGASSRAT
69	Mab22 CDR1L (SEQ NO:25에 대한 대안)	ID RASQSVSSSYLAW
70	Mab22 CDR2L (SEQ NO:26에 대한 대안)	ID SGAGSRAT
71	Mab42 CDR1L (SEQ NO:27에 대한 대안)	ID RASQSVSDEYLSW
72	Mab42 CDR2L (SEQ NO:28에 대한 대안)	ID HSASTRAT

[0528]

주: SEQ ID NO:20 및 SEQ ID NO:33 은 동일

[0529]

표 6B: 항체 서열(짧은 목록)

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

[0530]

표 7

[0531]

표 7A: 추가 구성체(Additional constructs)

	SEQ ID NO:			
단편/구성체(Fragment/Construct)	83A10	Mab21	Mab22	Mab42
BCMA CH1	41	41	41	41
BCMA CL	42	42	42	42
CD3 CH1	43	43	43	43
CD3 CL	44	44	44	44

표 7B: 추가 구성체(Additional constructs)

구성체(construct)	SEQ ID NO:			
	83A10-TCBcv	21-TCBcv	22-TCBcv	42-TCBcv
BCMA VH-CH1cv x CD3 VL-CH1 Fc 노브 LALA PG (노브 HC)	45	49	52	55
BCMAcv HC 홀 LALA PG (홀 HC)	46	50	53	56
BCMAcv hum IgG1 LC (BCMAcv LC)	47	51	54	57
CD3 VH-CL (CD3 LC)	48	48	48	48

표 7C: 추가 구성체(Additional constructs)

구성체	SEQ ID NO:		
	Mab101	Mab102	Mab103
BCMA VH-CH1zw Fc_zwA (HC-1)	58	61	64
BCMA VH-CH1zw x CD3 VL-CH1 Fc_zwB (HC-2)	59	62	65
BCMAzw hum IgG1 LC (BCMA LC)	60	63	66
CD3 VH-CL (CD3 LC)	48	48	48

실시예

실시예 1: 정상적인 건강한 지원자(NHV) 및 AAV 환자의 샘플에서의 형질모세포 및 형질 세포 상의 BCMA 표면 발현 및 가용성 BCMA 수준

말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 Ficoll 구배를 사용하여 4명의 정상적인 건강한 지원자(NHV)로부터 수집된 전혈에서 분리되었다. BMCA 발현은 유세포 분석에 의해 형질모세포(PB)에서 평가되었다. 형질모세포는 CD19(+) CD20(-) CD27(+) CD38(+)로 식별되었다. 항-BCMA 항체 코팅된 형광 비드를 사용하여 평균 형광 강도를 BCMA 표면 수용체 밀도와 비교하는 표준 곡선을 생성하였다. BCMA-발현 암 세포주(JEKO, RPMI-8226 및 H929)는 비교를 위해 프로파일링되었다(도 4A). BCMA 표면 발현은 테스트된 모든 NHV에 대해 다발성 골수종 세포주 RPMI-8226 및 H929보다 NHV에서 파생된 형질모세포에서 훨씬 더 낮다.

가용성 BCMA 수준은 NHV('정상'), 다발성 골수종('MM') 또는 ANCA-연관 혈관염('AAV') 환자의 혈청 또는 혈장 샘플에서 ELISA에 의해 평가되었다(도 4B). 가용성 BCMA 수준은 MM 샘플보다 NHV 샘플에서 훨씬 더 낮고, 이는 MM 환자와 비교하여 NHV의 형질모세포에서 더 낮은 수준의 BCMA 세포 표면 발현을 반영한다. AAV의 혈청 및 혈장(PR3+) 샘플 모두에서 가용성 BCMA 수준은 NHV 샘플과 비슷하고, MM 샘플보다 훨씬 낮다. 이러한 상관관계의 관점에서, AAV에서 형질모세포 및 형질 세포 상의 BCMA 표면 발현은 NHV에서의 것과 유사할 것으로 예상된다.

실시예 2: T 세포 이중특이적 항체의 생성

제1 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - 제2 BCMA Fab 형식(본 명세서에서 "2+1" 형식으로 지칭됨)을 갖는 항-BCMA 항-CD3 이중특이적 항체를 생성하였다. 항-BCMA 항-CD3 이중특이적 항체의 제조 방법은 WO2017/021450에서 찾을 수 있고, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다.

HD1은:

- Fc의 CH3 도메인은 아미노산 치환 T366W를 갖는 1개의 사슬 및 아미노산 치환 T366S, L368A, 및 Y407V를 갖는 1개의 사슬을 포함하고(표 2에 기재된 바와 같음); 그리고

- BCMA Fab 둘 모두는 CH1 도메인에 아미노산 치환 K147E 및 K213E를 포함하고 CL 도메인에 아미노산 치환 E123R 및 Q124K를 포함함(표 4에 기재된 바와 같음);

나타낸다.

HD2는:

Fc의 CH2-CH3 도메인은 아미노산 치환 T350V, L351Y, F405A, Y407V를 갖는 1개의 사슬 및 아미노산 치환 T350V, T366L, K392L, T394W를 갖는 1개의 사슬을 포함하고(표 3에 기재된 바와 같음);

두 BCMA Fab는 CH1 도메인에 아미노산 치환 A141W, L145E, K147T, Q175E를 포함하고 CL 도메인에 아미노산 치환 F116A, Q124R, L135V, T178R을 포함함(표 5에 기재된 바와 같음);

나타낸다.

- [0550] (EU 넘버링에 따라 넘버링된 중쇄 불변 영역 아미노산 위치; Kabat에 따라 넘버링된 경쇄 불변 영역 아미노산 위치).
- [0551] HD1 및 HD2에서 언급된 상기 변형에 더하여, 본 실시예에서 이중특이적 항체의 Fc는 아미노산 치환 P329G, L234A 및 L235A(EU 넘버링에 따라 넘버링된 위치)를 함유한다.
- [0552] 본 실시예의 이중특이적 항체는 또한 CD3 Fab의 VH 및 VL이 교환된 "CrossMAb" 기술을 포함한다.
- [0553] 본 실시예에서 생성된 항체의 요약은 표 8에 제공된다.

표 8

이중특이적 항체명	구조
CC-93269	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+14)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD1
Mab101	2+1 (BCMA SEQ ID NO:9+11)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD2
Mab102	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+13)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD2

[0555] **표 8: 본 실시예에서 생성된 항-BCMA 항-CD3 이중특이적 항체.**

[0556] **실시예 3: BCMA-발현 세포의 용량-의존적 BCMA T 세포 인게이지 사멸은 T-세포 활성화와 함께 일어난다**

[0557] **JEKO 세포**

[0558] JEKO 세포를 1:2 표적:작동체(T:E) 비율 및 다양한 농도의 항-BCMA 항-CD3 이중특이적 항체(BCMA T 세포 인게이지)에서 CD3+ T 세포(밤새 휴지)와 함께 배양하였다. JEKO 세포의 T-세포 매개 사멸은 24시간에 걸쳐 측정된 아넥신(annexin) V 발현에 의해 평가되었고, 이미지는 2시간마다 기록되었다. 아넥신 V+ 세포 수는 Incucyte ZOOM 소프트웨어를 사용하여 결정되었다. 20시간 시점에서 계산된 데이터 및 EC50 값을 도 5A 및 표 9에 나타내었다.

표 9

이중특이적 항체명	구조
CC-93269	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+14)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD1
Mab101	2+1 (BCMA SEQ ID NO:9+11)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD2
Mab102	2+1 (BCMA SEQ ID NO:10+13)(CD3 SEQ ID NO:7+8)HD2

[0560] **표 9: BCMA T 세포 인게이지를 사용한 JEKO 세포 사멸에 대한 EC50**

[0561] 이 데이터는 BCMA T 세포 인게이지(BCMA TCE)가 정상적인 건강한 지원자의 형질모세포와 유사한 수준으로 BCMA를 발현하는 세포를 사멸시킬 수 있음을 보여준다.

[0562] T 세포 활성화를 24시간 시점에서 유세포 분석에 의해 분석하였다. 세포를 세척한 다음 T 세포 계통 마커(CD3, CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25 및 CD154)에 대해 염색하였다. 유세포 분석 샘플은 BD LSRFortessa에서 수집하고 Treestar FlowJo X 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. Incucyte Live Cell Analysis Imaging System에서 세포 이미징을 수행하였다. Graphpad Prism 7 소프트웨어를 사용하여 플롯된 데이터 및 EC50 값을 계산하였다.

[0563] 도 5B는 CD8+ T 세포에서 CD69 발현으로 표시되는 T 세포 활성화를 도시한다.

[0564] 이 데이터는 JEKO 세포를 사멸시키기 위한 BCMA T 세포 인게이지의 50% 유효 농도(EC50)에서 활성화된 T 세포의 빈도 증가를 도시한다.

[0565] **MM 세포**

[0566] 다발성 골수종 세포주 RPMI-8226은 다른 표적:작동체(T:E) 비율 및 다양한 농도의 CC-93269에서 NHV PBMC와 공동-배양되었다. RPMI-8226 세포의 T-세포 매개 사멸은 매시간 기록된 이미지와 함께 96시간에 걸쳐 측정된 아넥신 V 발현에 의해 평가되었다. 아넥신 V+ 세포 수는 Incucyte ZOOM 소프트웨어를 사용하여 결정되었고; 25시간 및 72시간 시점은 도 6a에 도시되어 있다.

[0567] T-세포 활성화는 25시간 및 72시간 시점에서 유세포분석에 의해 분석하여 분석하였다. 25시간 후, 세포를 세척

한 다음 T-세포 활성화의 마커로서 CD8 T 세포 계통 및 CD69 발현에 대해 염색하였다(도 6b).

[0568] 이들 데이터는 상당한 T-세포 활성화가 MM 세포 사멸에 대한 용량과 같거나 더 적은 용량의 CC-93269에서 일어난다는 것을 도시한다.

[0569] **실시예 4: 건강한 지원자로부터 형질모세포의 용량-의존적 BCMA T 세포 인계이저 사멸은 최소한의 T-세포 활성화로 일어난다**

[0570] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 RPMI + 10% HI FBS에 채현탁된 Ficol1 구배를 사용하여 건강한 지원자로부터 채취된 전혈에서 분리되었다. PBMC를 다양한 농도의 BCMA TCE 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리하였다. 24시간 배양 후, 형질모세포 사멸, T 세포 활성화 및 사이토카인 생성을 평가하였다.

[0571] 형질모세포 사멸은 FACS에 의해 평가되었고, 이로써 형질모세포는 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별되고 처리되지 않은 대조군으로 정규화된 총 CD19(+) 세포의 백분율로 제공된다. CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포는 형질모세포의 추가로 알려진 마커가 있는 것으로 확인되었다: BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-). 도 7A는 대표적인 용량-반응 곡선이고, 도 7B는 CD3(-) CD19(+) 세포에 게이트된 대표적인 FACS 플롯이다. 건강한 지원자(n=12)의 형질모세포 사멸에 대한 CC-93269의 50% 유효 농도(EC50)는 0.005nM이다. 형질모세포 사멸은 BCMA-발현 암 세포주(예: JEKO 세포)를 사멸시키는 데 필요한 것보다 낮은 BCMA TCE 농도에서 발생한다.

[0572] T 세포 활성화를 위해, 세포를 세척한 다음 T 세포 계통(CD3, CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25, 및 CD154)에 대해 염색하였다. 도 7C에 나타난 데이터는 CD8(+) T 세포 상의 CD69 발현이다. 배양 상청액을 MSD 전염증 I 분석을 사용하여 사이토카인 생산(IFN γ , IL-6, IL-2, IL-10, 그랜자임 B 및 퍼포린)에 대해 분석하였다(도 7D, 도 8). 도 8의 데이터는 CC-93269에 대한 것이다.

[0573] 함께, 이들 데이터는 건강한 지원자의 PBMC로부터 형질모세포를 사멸시키기 위한 BCMA TCE의 50% 유효 농도(EC50)에서 활성화된 T 세포 빈도의 최소 상승(즉, 기준선 초과 20% 미만) 및 사이토카인의 최소 생산(즉, 기준선 초과 20pg/mL 미만)을 나타낸다.

[0574] 표 10은 CC-93269에 대한 데이터를 요약하고, 형질모세포의 고갈에 대한 90% 유효 농도(EC90)에서 활성화된 T 세포 빈도의 최소 상승을 나타낸다. CC-93269는, 상당한 T 세포 활성화가 없는 상태에서, 시험관 내에서 건강한 지원자로부터 PBMC에서 형질모세포의 깊은 고갈(> 90%)을 나타낸다.

표 10

	형질모세포 고갈		CD69+ CD8+ T cells at:	
	EC ₉₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)	EC ₉₀ PB 고갈	EC ₉₀ PB 고갈
CC-93269 (n=11)	0.054	0.594	기준선	보통 (< 5% CD8 ⁺ 세포)

[0576] **표 10: CC-93269를 가진 건강한 지원자의 PBMC에서 형질모세포 사멸 및 T 세포 활성화**

[0577] **실시예 5: CC-93269로 배양한 후 건강한 지원자로부터의 PBMC에서 다른 B 세포 집단에 대한 효과**

[0578] 실시예 4의 CC-93269-처리된 PBMC 샘플을 B 세포 계통 마커(CD20, CD27, 및 IgD)에 대해 염색하였다. 메모리 B 세포는 마커 CD19(+) CD20(+) CD27(+)을 표시하는 세포로 식별된 다음, 마커 IgD(-) CD38(-) BCMA(+/-)로 추가로 확인되었다. 데이터는 총 CD19(+) CD20(+) 세포의 백분율로 제공된 도 9A-C에 나타내었다. 이 데이터는 CC-93269가 형질모세포 사멸에 대한 90% 유효 농도(EC90)에서 시험관 내 건강한 지원자로부터 PBMC의 나이브, 비전환 또는 전환 기억 B 세포 집단을 유의하게 고갈시키지 않는다는 것을 나타낸다.

[0579] **실시예 6: 최소 T-세포 활성화로 조작된 골수에서 형질모세포의 용량-의존적 BCMA TCE 매개된 사멸**

[0580] 골수(BM) 단핵 세포를 Ficol1 구배를 사용하여 건강한 지원자의 골수에서 분리한 다음 다양한 농도의 BCMA TCE 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리하였다. 24시간 배양 후, 형질모세포 사멸(도 10A, 표 11) 및 T 세포 활성화(도 10B)를, 실시예 4에서와 같이, 유세포분석에 의해 평가하였다. 건강한 지원자로부터 분리된 PBMC를 배지 또는 골수(BM) 상청액에 현탁시킨 다음 비교를 위해 BCMA TCE 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 24시간 동안 처리하였다.

표 11

[0581]

	Mab101	CC-93269	Mab102
BM 형질모세포 사멸을 위한 EC50 (nM)	0.2662	0.02012	0.002807

[0582]

표 11: BCMA TCE를 사용한 골수 단핵 세포에서의 형질모세포 사멸

[0583]

이러한 데이터는, BCMA TCE가 배지에 현탁된 PBMC의 형질모세포와 유사한 농도에서, 최소 T 세포 활성화로, 골수에서 형질모세포의 사멸을 유도한다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 수명이 긴 형질모세포와 형질 세포가 골수에서 우선적으로 발견되기 때문에 중요하다.

[0584]

실시예 7: 최소 T-세포 활성화를 갖는 AAV로부터의 형질모세포의 용량-의존성 BCMA TCE 매개된 사멸

[0585]

Ficoll 구배를 사용하여 리툽시맙, 메토크세이트 및 엽산에 대한 재발성 또는 난치성 AAV를 포함하는 AAV 환자로부터 수집된 전혈에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리한 다음 다양한 농도의 BCMA TCE(CC-93269, Mab101 또는 Mab102) 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리하였다. 24시간 배양 후, 형질모세포 사멸(도 11A-11B), T 세포 활성화(도 11C, 12A-12C) 및 사이토카인 생산(도 11D)을 평가하였다.

[0586]

형질모세포 사멸을 FACS에 의해 평가하여 형질모세포를 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별하고, 미처리 대조군에 대해 정규화된 총 CD19(+) 세포의 백분율로 제공하였다(도 11A). CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포는 형질모세포의 추가로 알려진 마커가 있는 것으로 확인되었다: BCMA(+) SLAMF7(+) IgD(-) CD38(+) CD138(-). 도 11B는 CD3(-) CD19(+) 세포에 게이트된 대표적인 FACS 플롯이다. AAV에서 형질모세포 사멸을 위한 CC-93269의 50% 유효 농도(EC50)는 0.007nM이다. AAV 형질모세포 사멸은 유사한 수준의 BCMA 발현에도 불구하고 JEKO 암 세포주를 사멸시키는 데 필요한 것보다 낮은 BCMA TCE 농도에서 발생한다.

[0587]

T 세포 활성화를 위해, 세포를 세척한 다음 T 세포 계통(CD3, CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25, 및 CD154)에 대해 염색하였다. 도 11C에 나타난 데이터는 CD8(+) T 세포 상의 CD69 발현이다. 도 12A-C에 나타난 데이터는 CD4(+) T 세포 또는 CD8(+) T 세포 상의 CD69 또는 CD25 발현 수준이다.

[0588]

배양 상청액은 MSD 전염증성 I 분석을 사용하여 사이토카인 생성(IFN γ , IL-6, TNF α , IL-1 β , 그랜자임 A, 그랜자임 B 및 퍼포린)에 대해 분석되었다. IFN γ 에 대한 데이터는 도 11D에 도시되어 있다.

[0589]

함께, 이들 데이터는, BCMA TCE의 AAV 형질모세포 사멸-적격 용량에서, 활성화된 T 세포의 빈도(즉, 기준선 초과 20% 미만) 및 사이토카인 생성(즉, 기준선 초과 20pg/mL 미만)의 상당한 상승을 나타내지 않는다.

[0590]

표 12는 실시예 4 및 7의 데이터를 요약하고, T 세포 활성화 없이 형질모세포(PB) 사멸에 대한 BCMA TCE 농도의 창을 강조 표시한다. 이 창에서, T 세포 활성화 또는 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 과도한 사이토카인 생성과 관련된 부작용이 발생할 가능성이 적다.

표 12

[0591]

TCE 치료	공여체	EC ₅₀ PB 사멸 (nM)	EC ₅₀ T 세포 활성화 (nM)		사멸과 T 세포 활성화 사이의 창
			CD8, CD69+ (nM)	IFN γ 분비 (nM)	
Mab101 (Kd BCMA =1.1 nM)	건강한 지원자 (n=2)	0.257 +/- 0.087	>1	>1	≥ 3
	AAV-1 (n=1)	0.236	>1	>1	≥ 4
CC-93269 (Kd BCMA =0.14 nM)	건강한 지원자 (n=6)	0.029 +/- 0.029	≥ 0.68 +/- 0.04	≥ 0.92 +/- 0.12	16-22
	AAV-1 (n=1)	0.010	>1	>1	> 100
Mab102 (Kd BCMA =0.06 nM)	건강한 지원자 (n=3)	0.007 +/- 0.006	0.63 +/- 0.61	0.91 +/- 1.1	90 - >100
	AAV-1 (n=1)	0.003	0.77	>1	> 100

[0592]

표 12: T 세포 활성화 없이 형질모세포(PB) 사멸을 달성하기 위한 BCMA TCE에 대한 치료적 창

[0593]

실시예 8: 리툽시맙으로 치료된 AAV 환자로부터의 형질모세포의 용량-의존적 CC-93269 매개 사멸

- [0594] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는, 5개월 전에 마지막으로 리톡시마를 수용한, AAV 환자 AAV-5의 전혈에서, Ficoll 구배에 의해 분리되었고 RPMI +10% HI FBS에 재현탁되었다. PBMC를 24시간 동안 증가하는 농도의 CC-93269(도 13B-13C) 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체(도 13A)로 처리한 다음, 유세포 분석에 의해 평가하였다. 살아있는 세포 FACS 플롯에 도달하기 위해 생존 및 단일항에 대해 세포를 게이팅하였다(도 13). 형질모세포는 CD19+ CD27+ CD20-으로 정의된다. 형질모세포는 또한 CD38+, BCMA+, 및 CD138-인 것으로 확인되었다(데이터는 표시되지 않음). CD19+ CD20+ 게이트에서, 나이브 B 세포는 CD27- IgD+로, 비전환 기억 B 세포는 CD27+ IgD+로, 전환 기억 B 세포는 CD27+ 및 IgD-로 정의된다. 정상적인 건강한 지원자의 대표적인 점 도표가 표시된다. CD20(+) B 세포가 부족하지만 높은 CD20(-) CD27(+) 형질모세포 수가 대조군에서 관찰되었고(도 13A), 이는 리톡시마가 형질모세포 고갈 없이 B 세포 고갈을 초래한다는 것을 나타낸다. CC-93269는 서브-나노몰 농도에서 최소 B 세포 고갈로 형질모세포의 선택적 고갈을 유도하였다(도 13B). CC-93269는, 환자가 면역억제제 예를 들어 리톡시마를 치료 받은 경우에도, AAV 환자의 PBMC에서 형질모세포를 빠르게 고갈시킨다.
- [0595] **실시예 9: 표적이 없는 BCMA-TCE는 AAV 환자 PBMC에서 활성화된 T 세포의 빈도를 증가시키지 않는다**
- [0596] PBMC는, 이전에 리톡시마, 미코페놀레이트, 텍사메타손 및 메틸프레드니솔론으로 치료받은, AAV 환자, AAV-2로부터 분리되었다. 도 14a는 AAV-1 대상체와 비교하여 기준선에서 AAV-2 대상체에서 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 형질모세포 및 형질 세포 표적의 결핍을 보여주는 FACS 플롯을 예시한다. 플롯은 CD3(-) CD19(+) 셀에 게이트되었다. 도 14b는 AAV-2 대상체에서 CD4(+) 및 CD8(+) T 세포의 적절한 존재를 나타내는 FACS 플롯을 예시한다. 플롯은 CD3(+) 셀에 게이트된다.
- [0597] AAV-2로부터의 PBMC를 다양한 농도의 BCMA TCE로 처리하고, 24시간 배양 후, T 세포 활성화를 실시예 7에서와 같이 유세포 분석에 의해 평가하였다. 도 14c는 CD4(+) 또는 CD8(+) T 세포 상의 CD69(+) 또는 CD25(+)의 빈도를 예시한다. 이들 데이터는, 표적 형질모세포/형질 세포가 없을 때, BCMA-TCE가 T 세포 활성화로 이어지지 않음을 나타낸다.
- [0598] **실시예 10: BCMA-발현 암 세포가 AAV와 유사한 작동체:표적 비에서 사멸될 때, T-세포 활성화가 더 낮다**
- [0599] 다발성 골수종 또는 AAV에서 각각 관찰되는 T:E 비율(BCMA+ 세포: T 세포)을 모의하기 위해 1:10 또는 1:500의 표적:작동체(T:E) 비율에서 PBMC와 함께 JEKO-1 세포(2500개 세포/웰)를 배양하였다. CC-93269 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체와 함께 24시간 배양한 후, 세포를 세척한 다음 CD8(+) T 세포에 대한 CD69(도 15A) 및 CD25(도 15B) 발현을 평가하였다.
- [0600] 이러한 데이터는 더 큰 T:E 비율(BCMA+ 세포: T 세포)이 더 큰 정도의 T 세포 활성화를 초래한다는 것을 나타낸다. 특히, 활성화된 T 세포의 빈도는, MM 환자를 모의할 때보다, T:E 비율이 건강한 지원자 및 AAV 환자에서 발견되는 BCMA-발현 형질모세포 및 T 세포의 비율과 비슷할 때, 더 낮다.
- [0601] **실시예 11: BCMA-TCE는 적절한 형질모세포/형질 세포 성장 인자 자극에도 불구하고 재생되는 IgG-생성 형질모세포 및 형질 세포의 능력을 저해한다**
- [0602] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 Ficoll 구배를 사용하여 건강한 지원자로부터 수집된 전혈로부터 분리되었고 다양한 농도의 BCMA TCE(CC-93269, Mab101 또는 Mab102) 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 처리되었다. 환자 D214는 형질모세포 고갈에 대해 90% 유효 농도(EC90)에서 BCMA TCE로 치료를 받았다.
- [0603] 24시간 배양 후, PBMC를 성장 인자 IL-2(20U/ml) BAFF(200ng/ml) 및 IL-21(100ng/ml)과 함께 4-7일 동안 배양하여 BCMA 음성 전구체로부터 형질모세포/형질 세포 분화를 유도하였다. 일부 배양은 또한 이 기간 동안 CpG(ODN200610 μ g/mL)로 자극되었다.
- [0604] 배양 후, 형질모세포 및 형질 세포(CD19(+) CD20(-) CD27(+)), 또는 CD20⁺ B 세포를 유세포 분석에 의해 측정하였다(도 16a). BCMA-TCE는 재생을 위한 적절한 성장 인자에도 불구하고, 특히 형질모세포 사멸을 위한 90% 유효 농도(EC90)에서 고갈된 후 형질모세포 및 형질 세포의 회복을 억제한다.
- [0605] 배양 상청액을 수집하여 ELISA에 의해 총 IgG 분비를 측정하였다(도 16b). BCMA-TCE는 특히 형질모세포 사멸을 위한 EC90 농도에서 CpG로의 자극에도 불구하고 IgG 항체의 생성을 억제한다. 이는 생체 내 형질모세포를 90%까지 고갈시킴으로써 IgG 자가항체 생성을 억제할 수 있음을 시사한다.
- [0606] **실시예 12: 최소 T-세포 활성화로 류마티스 관절염으로부터 형질모세포의 용량-의존성 BCMA TCE 매개된 사멸**
- [0607] PBMC를 류마티스 관절염(RA) 환자로부터 분리하고 다양한 농도의 CC-93269로 치료하였다. 24시간 배양 후, 형질

모세포 사멸(도 17a), T 세포 활성화(도 17b) 및 사이토카인 분비(도 17c)를 실시예 4에서와 같이 유세포 분석에 의해 평가하였다.

- [0608] RA에서 형질모세포 사멸에 대한 CC-93269의 50% 유효 농도(EC50)는 0.001nM이다. 따라서, RA 형질모세포 사멸은 T 세포 활성화 또는 사이토카인 분비에 필요한 것보다 낮은 BCMA TCE 농도에서 발생한다.
- [0609] **실시예 13: CC-93269로 배양한 후 RA 환자로부터의 PBMC에서 다른 B 세포 집단에 대한 효과**
- [0610] 실시예 12의 CC-93269-처리된 PBMC 샘플을 B 세포 계통 마커(CD20, CD27, 및 IgD)에 대해 염색하였다. 도 18A-C에 나타낸 데이터는 총 CD19(+)CD20(+) 세포의 백분율로 제공된다. 데이터는, CC-93269가 형질모세포 사멸을 위한 EC90 농도에서 시험관 내에서 RA 환자의 PBMC에서 나이브하거나, 전환되지 않거나 전환된 기억 B 세포 집단을 유의하게 고갈시키지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0611] **실시예 14: 최소 T-세포 활성화로 전신 홍반 루푸스 환자로부터 형질모세포의 용량-의존적 BCMA TCE 매개 사멸이 발생한다**
- [0612] PBMC를 전신 홍반 루푸스(SLE) 환자로부터 분리하고 다양한 농도의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체로 치료하였다. 24시간 배양 후, 형질모세포 사멸(도 20A) 및 T 세포 활성화(도 20B)를 실시예 4에서와 같이 평가하였다.
- [0613] SLE에서 형질모세포 사멸에 대한 CC-93269의 50% 유효 농도(EC50)는 0.01nM(n=5)이다. 따라서, SLE 형질모세포 사멸은 T 세포 활성화에 필요한 것보다 낮은 BCMA TCE 농도에서 발생한다.
- [0614] **실시예 15: 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque)에서 CC-93269에 의한 형질모세포의 선택적 고갈**
- [0615] PBMC는 시노몰구스 마카크의 전혈에서 분리되었다. 형질모세포 및 CD20(+) B 세포를 다양한 농도의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항-HEL 항-CD3 항체로 24시간 동안 처리하였다.
- [0616] 형질모세포 사멸은 FACS에 의해 평가되었고, 여기서 형질모세포는 CD19(+)IRF4(+)로 확인되었고, 총 CD19(+) 세포의 백분율로 주어졌다(도 19A). CD20(+) B 세포 사멸은 또한 FACS에 의해 평가되었고, CD19(+)CD20(+) 세포는 총 CD19(+) 세포의 백분율로 제공된다(도 19B). IRF4+ 형질모세포 사멸은 CD20(+) B 세포를 사멸시키는 데 필요한 것보다 CC-93269의 낮은 농도에서 발생한다. 따라서, CC-93269는 광범위한 CD20(+) B 세포 고갈 없이 IRF4+ 형질모세포를 선택적으로 고갈시킬 수 있다.
- [0617] T 세포 활성화는 FACS에 의해 평가되었고, 이에 의해 CD69(+)CD8(+) T 세포는 총 CD8(+) T 세포의 백분율로서 제공된다(도 19C).
- [0618] 함께, 이러한 데이터는 허용되는 약동학-약력학(PK/PD) 모델에서 CD20(+) B 세포 고갈이 없는 IRF4+ 형질모세포 고갈에 대해 CC-93269 농도에서 CC-93269에 의한 형질모세포의 선택적 사멸 및 활성화된 T 세포의 빈도의 최소 상승을 나타낸다. 그들은 생체 내에서 BCMA-TCE의 약리학적 및 독성학적 효과를 예측하는 데 사용할 수 있다.
- [0619] **실시예 16: 건강한 지원자로부터의 형질모세포의 CC-93269-매개 사멸에 대한 외인성 가용성 BCMA의 효과**
- [0620] PBMC는 정상적인 건강한 지원자로부터 분리되었고 다양한 농도의 외인성 가용성 BCMA(sBCMA)가 추가되었다. 67.6ng/mL sBCMA의 최대 농도는 자가면역 환자에서 sBCMA 수준의 상한선의 두 배를 나타내기 때문에 선택되었다(데이터는 표시되지 않음). 자가면역 장애가 있는 공여체 환자의 혈청 또는 혈장에서 가용성 BCMA 수준은 Ampersand Biosciences(Lake Clear, NY)의 비드-기반 면역분석에 의해 평가되었다. 이어서, 샘플을 24시간 동안 증가하는 농도(0-50nM)의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체로 처리한 후 형질모세포 사멸(도 21A) 및 T 세포 활성화(도 21B)를 평가하였다.
- [0621] 형질모세포 사멸을 FACS에 의해 평가하여 형질모세포를 CD19(+) CD20(-) CD27(+) 세포로 식별하고 미처리 대조군에 대해 정규화된 총 CD19(+) 세포의 백분율로 제공하였다(도 21A). sBCMA 존재하의 형질모세포 사멸은, 자가면역 환자에 존재하는 sBCMA 농도 이상에서도, BCMA-발현 암 세포주(예: JEKO 세포)를 사멸시키는 데 필요한 것보다 낮은 CC-93269 농도에서 발생한다.
- [0622] T 세포 활성화를 위해, 세포를 세척한 다음 T 세포 계통(CD4 및 CD8) 및 활성화 마커(CD69, CD25)에 대해 염색하였다. 도 21b에 나타낸 데이터는 CD4(+) T 세포 또는 CD8(+) T 세포에 대한 CD69(+)의 빈도를 예시한다.
- [0623] 표 13은 CC-93269에 대한 데이터를 요약하고, 건강한 지원자로부터의 PBMC에서 형질모세포의 시험관 내 고갈에 대해 BCMA TCE의 90% 유효 농도(EC90)에서 증가하는 sBCMA 수준에서 활성화된 T 세포 빈도의 최소 상승(즉, 기준선 초과 20% 미만)을 설명한다.

표 13

가용성 BCMA (ng/ml)	형질모세포 교갈		CD69+ CD8+ T cells at:	
	EC ₅₀ (nM)	EC ₉₀ (nM)	EC ₅₀ PB 교갈	EC ₉₀ PB 교갈
0	0.005	0.047	< 20%	< 20%
16.8	0.025	0.225	< 20%	< 20%
33.6	0.130	1.17	< 20%	< 20%
67.6	0.32	2.88	< 20%	< 20%

표 13: CC-93269를 가진 건강한 지원자로부터의 PBMC에서 형질모세포 사멸 및 T 세포 활성화에 대한 외인성 가용성 BCMA의 효과

실시예 17: 건강한 지원자 및 AAV 환자로부터의 전혈 샘플에서 최소 CC-93269 매개 T-세포 활성화 및 사이토카인 분비

정상적인 건강한 지원자(n=4) 및 AAV 환자(n=2)의 전혈 샘플을 다양한 농도의 CC-93269 또는 대조군 2+1 항체로 처리하였다. 24시간 배양 후, T 세포 활성화를 실시예 4에서와 같이 평가하였다. 도 22a에 제시된 데이터는 정상적인 건강한 지원자(NHV) 및 AAV 환자의 전혈 샘플에서 CD8(+) T 세포 상의 CD69 발현이다.

MSD Pro-inflammatory I 분석을 사용하여 사이토카인 생산(IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-10, 및 그랜자임 B)에 대해 배양 상청액을 분석하였다(도 22B).

함께, 이들 데이터는, 정상 건강한 지원자의 전혈 샘플이 CC-93269로 치료될 때, 활성화된 T 세포의 빈도에서 최소 상승(즉, 기준선 초과 20% 미만) 및 최소 사이토카인 생산(즉, 기준선 초과 20pg/mL 미만)을 나타낸다.

실시예 18: 안정성이 개선된 항체

4개의 BCMAxCD3 분자인 Mab101, Mab102, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv의 물리화학적 특성을 평가하였다. Mab101 및 83A10-TCBcv는 항체 83A10의 CDR을 포함하는 BCMA 결합 도메인을 포함하고 Mab102 및 22-TCBcv는 항체 Mab22의 CDR을 포함하는 BCMA 결합 도메인을 포함한다. 4개의 모든 변이체는 동일한 CD3 결합 도메인을 공유한다. 4개의 BCMAxCD3 분자의 서열 정렬이 도 27에 도시되어 있다. 각 분자는 도 2A에 도시된 것처럼 2+1 이중특이적 형식이지만 CL-CH1에서 경쇄 불일치/부산물 줄이기 위한 대체 아미노산 치환이 있다: "RK/EE" 치환 대신 A141W, L145E, K147T, Q175E("WETE") 및 F116A, Q124R, L135V, T178R("ARVR")이 설명되어 있다.

"HD1" 및 "HD1 플랫폼"이라는 용어는 "knob-into-hole" 돌연변이를 포함하는 이중특이적 항체를 지칭하기 위해 이들 실시예에서 사용된다. 구체적으로, 본 명세서에 사용된 용어 "HD1 형식" 및 "HD1 플랫폼"은 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식의 이중특이적 항체를 지칭하고, 여기서:

(i) 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고;

(ii) 항-BCMA Fab는 CL 도메인에 아미노산 치환 123R 및 124K를 포함하고 상응하는 CH1 도메인에 아미노산 치환 147E 및 213E를 포함하고;

(iii) Fc의 제1 CH3 도메인은 변형 T366W를 포함하고, Fc의 제2 CH3 도메인은 변형 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함한다.

용어 "HD2 형식" 및 "HD2 플랫폼"은 본 발명의 이중이량체화 돌연변이를 포함하는 이중특이적 항체를 지칭하기 위해 이들 실시예에서 사용된다. 구체적으로, 본 명세서에 사용된 용어 "HD2 형식" 및 "HD2 플랫폼"은 BCMA Fab - Fc - CD3 Fab - BCMA Fab 형식의 이중특이적 항체를 지칭하고, 여기서:

(i) 항-CD3 Fab 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 경쇄는 가변 도메인 VH 및 불변 도메인 CL을 포함하는 교차 경쇄이고, 여기서 중쇄는 가변 도메인 VL 및 불변 도메인 CH1을 포함하는 교차 중쇄이고;

(ii) 항-BCMA Fab는 CH1 도메인에 아미노산 치환 A141W, L145E, K147T, Q175E 및 상응하는 CL 도메인에 아미노산 치환 F116A, Q124R, L135V, T178R을 포함하고;

(iii) Fc의 제1 CH3 도메인은 변형 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하고 Fc의 제2 CH3 도메인은 변형

T350V, T366L, K392L 및 T394W(EU 넘버링에 따라 넘버링됨)를 포함한다.

[0640] 표 14에 나타난 바와 같이, 이중특이적 항체 Mab101 및 Mab102는 본 발명의 HD2 돌연변이를 함유하는 반면, 이중특이적 항체 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv는 "knob-into-hole"(HD1) 돌연변이를 함유한다. "Knob-into-hole" 변형은 예를 들어 WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621, Merchant, A.M. et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-68, 및 WO 98/050431에 몇 가지 예와 함께 자세히 설명되어 있다. 이러한 변형은 변형 T366W("knob 변형")를 포함하는 첫 번째 CH3 도메인과 변형 T366S, L368A, 및 Y407V("hole 변형")를 포함하는 두 번째 CH3 도메인(Kabat의 EU 넘버링에 따라 넘버링됨)으로 구성된다.

표 14

항체	이형이량체화 플랫폼	BCMA 바인더	CD3 바인더
83A10-TCBcv	HD1	83A10	CH2527
22-TCBcv	HD1	Mab22	CH2527
Mab101	HD2	83A10	CH2527
Mab102	HD2	Mab22	CH2527

[0642] 표 14: 항체

[0643] 본 발명자들은 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 본 발명의 형식에서 이중특이적 항체(즉, Mab101 및 Mab102)의 결합 능력이 HD1 형식의 상응하는 BCMA 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체(즉, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv)의 결합 능력보다 화학적 스트레스(즉, 낮은 pH 노출, 높은 pH 노출 및 tert-부틸 퍼옥사이드 노출)의 영향을 덜 받는다는 것을 보여줌으로써, HD2 형식이 전반적인 안정성 증가에 기여함을 입증하였다.

[0644] 본 발명자들은 HD2 형식의 사용이 Mab22의 CDR로 인한 물리적 안정성의 감소를 보상함을 추가로 보여주었다. 구체적으로, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 단백질 농도의 측정은, 교반 및 낮은 pH 노출 모두 후, HD1 이중특이적 22-TCBcv에 대한 단백질 농도의 명백한 감소를 나타내고, 이는 HD2 플랫폼 등가물인 Mab102에서 관찰되지 않았다. 따라서 동등한 Mab102 분자에서 HD2 플랫폼의 사용은 항체 안정성에 대한 Mab22 CDR의 부정적인 영향을 감소시킨다.

[0645] 또한, 각 분자에 대한 전반적인 안정성 점수는 다중 물리적 및 화학적 안정성 분석에 의해 생성된 데이터의 통합 분석을 기반으로 계산되었다(표 18 참조). 이 분석에서, HD2 플랫폼 분자인 Mab101 및 Mab102는 각각의 HD1 플랫폼 등가물인 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv보다 높은 점수를 받았는데, 이는 두 가지 이중특이적 분자가 HD2 형식에서 더 안정적임을 시사한다.

[0646] 실시예 18.1: 화학적 안정성

[0647] 화학적 안정성 평가는 아스파르트산 이성질체화 및 단편화 반응을 촉진하기 위한 낮은 pH 유지(pH 4)와 아스파라긴 탈아미드화, 산화 반응 및 티오에테르 형성을 가속화하기 위한 높은 pH 유지(pH 8)로 구성되었다. tert-부틸 퍼옥사이드(TBP)도 pH 6 플랫폼 완충액에 첨가하여 용매에 노출된 메티오닌 잔류물의 산화를 촉진하였다.

[0648] 화학적 안정성을 평가하는 데 사용된 주요 방법은 본 명세서에 설명된 센서그램 비교 방법을 사용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)과 화학적 변형이 물리적 안정성에 영향을 미치거나 예를 들어 저분자량(LMW) 클리펩으로 이어질 수 있는 경우의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)이었다. SPR 결합 결과에 따라 선택된 샘플에 대해 펩티드 매핑도 사용되었다.

[0649] 실시예 18.1.1 표면 플라즈몬 공명에 의한 BCMA 및 CD3 결합의 변화 분석

[0650] SPR 실험은 분석 및 샘플 구획 온도가 각각 25° C 및 7° C로 설정된 Biacore T200 시스템(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 사용하여 수행되었다.

[0651] 항인간 IgG(항인간 IgG 캡처 키트로부터의)는 제조업체의 지침에 따라 CM5 칩의 표면에 결합된 아민이었다. 러닝 버퍼에서 1 µg/mL로 희석된 분자 이중특이적 항체는 60초 주입에서 칩 표면에 포획되었다. 단일-주기 동역학 절차에 따라, 항원은 다음으로 30 µL/min의 유속으로 점진적으로 증가하는 농도로 5회(주사당 30초) 주입되었다. 항원 농도는 BCMA의 경우 0.08~50nM, CD3의 경우 12.7~1000nM 범위였다. 마지막 항원 주입 후 300초 해리 시간이 추가되었다. 각 실험 후, 모든 유동 세포는 3M MgCl₂를 30초 주입하여 재생되었다.

[0652] 분석에 앞서, 먼저 참조 플로우 셀에서 데이터를 뺀 다음 항원 대신 완충액이 주입된 빈 주기를 빼서 데이터를

이중 참조하였다. 센서그램 비교 분석은 Biacore T200(소프트웨어 버전 3.0)을 사용하여 구현하였다. 모든 데이터는 100%가 주사 동안 얻은 최대 결합을 반영하고 0%가 기준선을 반영하는 반응과 관련하여 정규화되었다. 평균 및 ± 3 표준 편차(SD) 센서그램은 각 분자의 비응력 물질(표준)의 10개 이상의 독립적인 센서그램에서 계산되었다. 상응하는 비응력 표준에 대한 스트레스 샘플의 결합 유사성을 정량화하기 위해, 샘플 센서그램을 표준 센서그램과 공동 평가하였다. 유사성 정도는, SSQ가 제곱합인, 식 2에 따라 ± 3 표준 편차 한계 내부 또는 외부에 속하는 샘플 데이터 포인트의 수를 기반으로 계산되었다. SPR 분석을 위한 모든 재료는 표 15에 나와있다.

표 15

Material	Detail	Source
Sensor Chip	Series S CM5	GE Healthcare
Running Buffer	HBS-EP + buffer (10 mM Hepes, 0.15 M NaCl, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 0.05 % [v/v] surfactant P20, pH 7.4)	GE Healthcare
Capture Method	Amine Coupling	GE Healthcare
Capture solution	Anti-human IgG (Fc)	GE Healthcare
Antibody sample	TPP-2204, 2205, 2261, and 2253 at 1 ug/mL	Celgene
Antigen 1	Human BCMA, TPP208 (0.08, 0.4, 2, 10, 50 nM)	Celgene
Antigen 2	Human CD3ED, TPP401 (12.3, 37, 111, 333, 1000 nM)	Celgene

표 15: SPR 재료

2 - 8° C(pH 6) 및 40° C(pH 8)에서 2주 동안 저장된 변이체 83A10-TCBcv를 비교하는 대표적인 SPR 센서그램이 각각 도 26A 및 26B에 제시되어 있다.

식 2:

$$\text{유사성 점수} = \text{한계 내부 \% 포인트} + \text{한계 외부 \% 포인트} \times \frac{\text{평균까지의 SSQ 제한 거리}}{\text{평균까지의 SSQ 샘플 거리}}$$

(2)

표 18에 나타낸 바와 같이, 22-TCBcv(HD1 플랫폼 돌연변이 포함)는 tert-부틸 퍼옥사이드 노출을 제외한 모든 스트레스 조건에 걸쳐 가장 큰 전체 감소 CD3 및 BCMA 결합을 보여주었고, 가장 낮은 전체 화학적 안정성 점수를 가졌다. 반대로, Mab101(본 발명의 HD2 플랫폼 돌연변이를 포함함)은 모든 스트레스 조건에서 결합의 변화가 가장 적었다.

HD2 돌연변이를 포함하는 두 이중특이적 항체(즉, Mab101 및 Mab102)는 동일한 CDR 영역을 포함하는 상응하는 HD1 분자보다 전반적인 화학적 안정성 점수가 더 높았고, 이는 HD2 플랫폼이 항체의 화학적 안정성 증가에 기여함을 시사한다.

따라서 SPR 결합 데이터는 HD2 돌연변이를 포함하는 이중특이적 항체(즉, Mab101 및 Mab102)의 결합 능력이 HD1 돌연변이를 갖는 상응하는 BCMA 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체(즉, 83A10-TCBcv 및 22-TCBcv)의 결합 능력보다 화학적 스트레스(즉, 낮은 pH 유지, 높은 pH 유지 및 tert-부틸 퍼옥사이드 노출)에 의해 덜 영향을 받는다는 것을 시사한다. 따라서, 이들 데이터는 본 발명의 HD2 돌연변이가, 83A10 또는 Mab22의 CDR을 포함하는 CD3xBCMA 이중특이적 항체와 관련하여 사용될 때, HD1 돌연변이에 비해 이중특이적 항체의 안정성을 개선함을 나타낸다.

실시예 18.1.2 감소된 펩티드 매핑

이중특이적 항체의 화학적 안정성을 추가로 구별하기 위해, 4개의 이중특이적 항체 모두에 대해 감소된 펩티드 매핑을 수행하였다. 분자는 TBP의 존재하에 pH 8 및 pH 6에서 완충된 40° C에서 2주 동안 저장되었다. 대조군으로, 2-8° C에서 2주 동안 보관한 pH 6 샘플도 분석하였다.

모든 샘플은 10kDa MWCO 필터를 사용하여 50mM 아세트이트, pH 5.0 완충제로 완충제 교환되었다. 다음으로, 샘플은 제조업체가 제안한 AccuMAP 프로토콜(Promega, Madison, WI)에 따라 분해되었다. 간단히 말해서, 샘플은 GdHCl에 의해 변성되고, TCEP에 의해 환원되고, 요오도아세트아미드에 의해 알킬화되었다. LysC에 의해 1시간 사전-소화를 수행한 후, GdHCl을 1M 미만으로 희석하고 메티오닌을 15mM 농도로 첨가하였다. 그런 다음 37 °C에

서 최종 3시간 분해를 위해 트립신/LysC 혼합물을 추가하였다. 모든 단계는 pH 5에서 수행되었다. TFA를 2%의 최종 조성에 첨가하여 소화를 켜치하였다(quenched).

[0665] 약 30 µg의 소화된 샘플을 Orbitrap Velos Pro 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)와 인라인으로 Waters CSH C18 컬럼(2.1 x 150mm, 130A 기공 반경, 1.7 µm 비드 직경)에 주입하였다. LC 용매 A는 물 중 0.1% 포름산(FA)이었고, 용매 B는 ACN 중 0.1% FA였다. 분리 구배는 1% B에서 시작하여, 110분에 걸쳐 27% B로 선형 증가한 다음, 30%에서 40% B로 5분 선형 구배가 이어졌다. 컬럼 온도는 70 °C로 설정되었다. 질량 스펙트럼은 Top-10 데이터-종속 수집에서 수집되었다. MS1은 400m/z에서 분해능이 60,000으로 설정된 오비트랩에서 수행되었다. CID MS/MS는 빠른 스캔 설정하에서 이온 트랩에서 분석되었다. 동적 배제는 15초 및 10ppm 질량 창으로 설정되었다. 원시 데이터는 Protein Metrics Byonic 및 Byologic 소프트웨어 패키지로 분석되었다. 변형 비율은 XIC 강도를 사용하여 다음과 같이 계산되었다: 변형된 pep 강도/(변형된 pep 강도 + 변형되지 않은 pep 강도) x 100%.

[0666] 표 10 및 11은 각각 BCMA 및 CD3 CDR 내부 또는 근처의 잔기에 대한 변형을 나타낸다. SPR 데이터와 일치하게, 22-TCBcv는 특히 메티오닌 및 트립토판 산화에 대해 BCMA 및 CD3 CDR 영역에서 화학적 변형에 대한 가장 큰 경향을 보여주었다. 대조적으로, Mab101 분자에서 더 큰 수준에서 관찰된 유일한 변형은 TBP 처리 후 BCMA HC 및 HHC에서 M34였다(표 16).

표 16

Table 6. Modifications near BCMA CDRs				Modification Ratio (%)											
				TPP-2204			TPP-2205			TPP-2261			TPP-2263		
Chain	Residue(s)	Mod(s)	Distance	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
HC/HHC	M34	Ox	0	0.9	1.0	10.4	1.1	0.9	6.0	0.9	1.1	6.5	1.0	1.0	4.7
HC/HHC	W36	Diox	+1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.2
HC/HHC	M34+W36	Ox+Diox	0,+1	0.4	0.6	1.6	0.3	0.2	0.6	0.1	0.0	0.4	0.2	0.2	0.7
HC/HHC	W47	Diox	-3	0.4	0.5	0.9	1.5	1.1	3.0	0.7	0.6	1.1	1.1	1.4	2.1
HC/HHC (W102,W106)		Ox	0,+1	0.3	0.3	1.0	0.4	0.2	3.5	0.2	0.3	1.8	0.2	0.3	5.3
LC1	W36	Ox	+1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	1.9	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	3.4
LC1	W36	Diox	+1	0.8	0.9	1.4	1.1	0.8	1.9	1.4	1.1	1.2	1.1	1.2	1.7

(i) Only one of the residues is modified

* Both residues exist in modified form together

[0667]

[0668] 표 16: BCMA CDR 근처의 변형

표 17

Modifications Near CDR3 CDRs				Modification Ratio (%)											
				TPP-2204			TPP-2205			TPP-2261			TPP-2263		
Chain	Residue(s)	Mod(s)	Distance	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP	pH6	pH8	TBP
HHC (W323,W327)		Diox	(0,0)	2.7	2.5	10.5	6.9	6.1	25.0	3.0	2.3	24.3	2.1	2.6	26.2
LC2b	M34	Ox	0	0.5	1.2	22.8	0.9	1.0	27.5	1.0	1.9	31.3	0.9	1.1	40.7
LC2b	W36	Diox	+1	-	-	-	0.4	0.6	5.1	-	-	-	0.5	0.0	13.2
LC2b	M34+W36	Ox+Diox	0,+1	0.5	0.6	2.9	1.2	1.1	5.5	0.9	1.2	7.2	1.1	1.3	12.7
LC2b	M34+W36	Ox+Triox	0,+1	0.0	0.0	2.8	0.2	0.2	4.5	0.1	0.0	4.6	0.0	0.0	7.1
LC2b	W47	Ox	-3	0.2	0.3	10.0	0.4	0.2	18.9	0.2	0.4	19.8	0.2	0.2	23.8
LC2b	W47	Diox	-3	3.2	3.5	15.6	7.3	5.5	26.8	5.3	4.5	27.4	5.6	5.3	31.9
LC2b (N56,N57)		Deamid	(0,0)	0.0	1.2	0.0	0.0	1.7	0.6	0.0	1.6	0.5	0.0	1.2	0.8

(i) Only one of the residues is modified

* Both residues exist in modified form together

- Not identified in this sample

[0669]

[0670] 표 17: CD3 CDR 근처의 변형

[0671] 실시예 18.2: 물리적 안정성

[0672] 물리적 안정성 평가는 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의한 열적 안정성과 플랫폼 pH 6 완충제에서 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 침전에 의한 콜로이드 안정성을 측정하는 것으로 구성되었다. pH 6 플랫폼 완충제에서 교반 및 동결 해동(F/T) 스트레스 후 물리적 안정성도 평가되었다. 마지막으로, 실온에서 짧은 낮은 pH 유지를 사용하여 바이러스 비활성화를 모의하였다. 이 처리 단계는 구조적으로 덜 안정적인 단백질 생물학적 제제에 대해 종종 비친연 응집을 초래한다.

[0673] **실시예 18.2.1 시차 주사 열량측정법에 의한 열 안정성 평가**

[0674] NanoAnalyze 소프트웨어를 사용하여 TA Instruments NanoDSC(New Castle, DE)에서 시차 주사 열량측정법을 수행하였다. BCMAxCD3 샘플을 100mM 히스티딘 pH 6.0 완충제에서 1mg/mL로 희석하였다(표 19). 분석 전에 샘플 및 단백질이 없는 해당 완충제를 30분 동안 탈기하였다. 샘플과 완충제는 $1^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 속도로 10에서 100°C 로 가열되었다. 수집 후, 각 샘플에서 해당 완충제를 빼고 데이터를 정규화하여 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot ^{\circ}\text{C}^{-1}$ 로 변환하였다. 결과는 첫 번째 전개 변이가 시작될 때 온도($^{\circ}\text{C}$)로 보고된다.

[0675] 도 24에 도시된 바와 같이, 4개의 분자 모두 유사한 열 전개 개시 온도($\sim 60^{\circ}\text{C}$)를 갖지만, 최대 흡열 도메인의 전개 전이는 Mab101 및 83A10-TCBcv 분자(83A10의 BCMA CDR을 포함)에서 대략 5°C 더 큰 T_m^{app} 값을 갖는다.

[0676] **실시예 18.2.2 PEG 침전에 의한 콜로이드 안정성 평가**

[0677] 4개의 BCMAxCD3 분자의 콜로이드 안정성 평가는 PEG 6000 침전에 의해 수행되었다. PEG 침전 실험은 40%(w/v) 스톡 용액으로부터 점진적으로 증가하는 농도의 PEG-6000에서 pH 6.0의 100mM 히스티딘으로 완충된 1.0g/mL BCMAxCD3 분자로 구성된 160 μL 용액을 준비함으로써 수행되었다(표 19). 용액을 4°C 에 밤새 두고 25,000 RCF에서 60분 동안 원심분리하였다. 그런 다음 Agilent Cary UV-8454(Agilent, Palo Alto, CA)를 사용하여 280nm에서 흡광도에 의해 상청액에 남아있는 단백질의 양을 측정하였다. 데이터는 단백질의 시작 양(C_m)의 절반을 침전시키는 데 필요한 PEG-6000의 백분율(w/v)을 결정하고 보고하기 위해 실험적 4개 매개변수 S자형 방정식(식 1)에 맞춰졌다. 매개변수 b, m 및 r은 각각 곡선 기준, 최대값 및 비율을 나타낸다.

[0678] 식 1

$$y = b + \left[\frac{m}{\left(1 + \exp\left(\frac{Cm - x}{r} \right) \right)} \right] \quad (1)$$

[0680] 도 25에 도시된 바와 같이, Mab102 및 22-TCBcv(Mab22의 BCMA CDR 포함)는 PEG 침전에 의해 평가된 바와 같이 플랫폼 pH 6 히스티딘 완충제에서 가장 낮은 콜로이드 안정성을 가졌다. Mab101 및 83A10-TCBcv(83A10의 BCMA CDR 포함)는 배제된 부피 효과에 의해 천연 상태 침전을 유도하기 위해 거의 2배의 PEG를 필요로 하였다.

[0681] **실시예 18.2.3 교반 및 동결-해동 후 물리적 안정성의 크기 배제 크로마토그래피 평가**

[0682] 물리적 안정성은 또한 pH 6 플랫폼 완충제에서 교반 및 동결 해동(F/T) 스트레스 후 크기 배제 크로마토그래피에 의해 평가되었다.

[0683] **동결-해동**

[0684] 400 μL 의 1mg/mL BCMAxCD3 분자(표 19) 각각을 0.5 mL 독립형 Fisherbrand 스크류 캡 동결 튜브(부품 번호 02-707-357)에 분배하고 튜브 분할기가 있는 단일 층 샘플 상자에 저장하고 -80°C 에서 동결하였다. 총 5회의 동결-해동(F/T) 주기가 수행되었고, 각 주기는 실온에서 해동하기 전에 적어도 1시간 동안 샘플을 동결하고 다음 F/T 주기 전에 부드럽게 혼합하는 것으로 구성되었다. 샘플은 다섯 번째 F/T 주기에 따라 SEC에 의해 분석되었다.

[0685] **교반**

[0686] 400 μL 의 1mg/mL BCMAxCD3 분자(표 19) 각각을 1.5mL 표준 Eppendorf 튜브(부품 번호 022364111)로 옮기고 온도 조절이 가능한 VWR 마이크로플레이트 진탕기에 두었다. 진탕기는 25°C 에서 24시간 동안 1500rpm으로 설정되었다. 교반 후 샘플을 SEC에 의해 분석하였다.

[0687] **크기 배제 크로마토그래피**

[0688] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 단일 TSKgel G3000SWx1 7.8 x 300mm, 5 μm 컬럼이 장착된 Agilent 1260 HPLC 시스템(Agilent, Palo Alto, California)에서 수행되었다. 이동상은 100mM KH_2PO_4 , 250mM NaCl pH 6.8로 구성되었다. 각 샘플 20 마이크로리터를 25°C 에서 컬럼에 주입하고 30분 동안 0.5mL/min의 유속으로 등용매로(isocratically) 용리하였다. 용리는 280nm에서 UV 검출에 의해 모니터링되었고 단백질 농도는 통합 곡선의 총 면적, 유속, 주입 부피, 유동 세포 경로 길이 및 각 BCMAxCD3 분자의 흡광 계수를 사용하여 계산되었다.

- [0689] SEC 분석에 대해 두 가지 값; 즉 % 단량체의 감소 및 2-8° C에서 유지된 pH 6 2주 샘플에 대한 농도가 보고된다. 이 방법론은 동일한 크로마토그래피 시퀀스 내에서 모든 샘플을 분석하여 잠재적인 크로마토그래피 변동성(예: 컬럼 성능)을 최소화할 뿐만 아니라 "시간 0" 샘플을 제거하여 필요한 시간 및 재료 요구 사항을 줄인다.
- [0690] 잠재적인 회색 변동성(통합 및 주입 변동성)을 설명하기 위해 동일한 10mg/mL 표준 mAb 용액에서 10개의 독립적인 1:10 희석액도 준비하고 BCMAxCD3 안정성 샘플과 동일한 SEC 시퀀스에서 분석하였다. 단량체 및 농도의 백분율 감소는 각각 이러한 회색 표준의 평균 백분율 단량체(2σM) 및 농도(2σC)의 표준 편차(2σ)의 2배와 관련하여 보고된다.
- [0691] SEC 평가의 결과는 표 15에 제공되고 pH 6 2k 2-8° C(대조군) 샘플과 각 스트레스 샘플 사이의 퍼센트 주 피크 단량체 및 농도의 차이는 표 18에 제시되어 있다.
- [0692] SPR 데이터와 일치하게, SEC 결과는 다른 분자에서 관찰되지 않은 pH 3 유지 후 교반 후 HD1 플랫폼 분자 22-TCBcv에 대한 단백질 농도의 명확한 감소가 있음을 나타낸다. 따라서, 동등한 Mab101 분자에서 HD2 플랫폼의 사용은 안정성에 대한 Mab22 CDR의 부정적인 영향을 최소화한다. 22-TCBcv 변이체의 대표적인 크로마토그램이 도 26에 도시되어 있다.
- [0693] **점수화(Scoring)**
- [0694] 방법 반응을 나타내는 물리적 및 화학적 안정성 각각에 대한 허용 기준에 따라 분자의 점수를 매겼고(표 18의 밝은 회색 음영 영역) 실험 결과가 이러한 기준에 어떻게 부합하는지에 따라 0, 1 또는 2의 점수를 할당하였다(진한 회색 음영 영역). SEC에 의해 측정된 퍼센트 단량체 및 농도의 감소는 표준 10mg/mL mAb 용액의 10개의 독립적인 1:10 희석액에서 결정된 평균 퍼센트 단량체(2σM) 및 농도(2σC)의 표준 편차의 2배에 대해 점수를 매겼고; 현재 연구의 경우 2σM과 2σC는 각각 0.33과 0.14였다. 물리적 및 화학적 안정성 점수의 합계는, 물리적 및 화학적 안정성 점수가 모두 0 - 2 범위가 되도록, 반응 수(물리적 평가의 경우 8개, 화학적 평가의 경우 16개)로 나뉜다. 각 변형에 대한 총 점수는 물리적 및 화학적 안정성 점수의 합계이므로 범위는 0 - 4이다(표 18). 표 18의 모든 반응에는 동일한 가중치가 적용된다.
- [0695] 표 18은 물리적 안정성 평가에서, 교반 후 및 pH 3 유지 후에 22-TCBcv 분자에 대한 단백질 농도의 명백한 감소가 있었고, 이는 다른 분자에 대해서는 관찰되지 않았음을 보여준다.
- [0696] 22-TCBcv는 또한 화학적 안정성 평가에서 다른 분자보다 성능이 낮았고, TBP에 의한 산화 후 단량체 퍼센트 손실이 더 크고, pH가 낮거나 높은 상태에서 CD3 및 BCMA 결합에서 더 큰 손실을 보였다. 평가의 물리적 안정성 부분에서와 같이, Mab101은 모든 화학적 스트레스 후 농도, 퍼센트 단량체 및 결합에서 가장 작은 변화를 보였다. 두 HD2-플랫폼 분자, 즉 Mab101 및 Mab102는 각각의 HD1 플랫폼 등가물보다 더 높은 점수를 받았다(표 18).
- [0697] 따라서, 이들 데이터는 HD2-플랫폼 형식이 83A10 및 Mab22 이중특이적 항체 둘 다에 대해 HD1 플랫폼 형식보다 더 안정적인 분자를 생성했음을 분명히 입증한다.

표 18

표 18: BCMAxCD3 _{물리적} 안정성 방법의 물리적 및 화학적 안정성 점 수화	점수화			Mab101	score Mab101	Mab102	score Mab102	83A10- TCBcv	score 83A10 - TCBcv	22- TCBcv	score 22- TCBcv
	0	1	2								
pH 6 DSC onset Tm1 (°C)	< 50	50 -55	> 55	59.30	2	59.20	2	60.00	2	60.10	2
pH 6 PEG-6000 Cm (% w/v)	< 10	10 - 20	> 20	12.20	1	8.60	0	14.40	1	4.10	0
pH 6 -80 °C F/T decrease in % main ¹	> 5	> 2σM - 5	≤2σM	0.37	1	-2.40	2	1.42	1	-1.33	2
pH 6 -80 °C F/T decrease in mg/mL	> 2σC	—	≤2σC	-0.07	2	0.02	2	-0.01	2	0.01	2
pH 6 RT agitation decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	0.02	2	-1.53	2	1.20	2	-1.98	2
pH 6 RT agitation decrease in mg/mL	> 2σC	—	≤2σC	0.03	2	-0.09	2	0.00	2	0.29	0

pH 3, 3hr. decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	3.40	2	5.32	1	3.09	2	1.47	2
pH 3, 3hr. decrease in mg/mL	> 2 σC	—	≤ 2 σC	0.04	2	0.07	2	-0.01	2	0.23	0
물리적 안정성 점수					1.75		1.63		1.75		1.25
화학적 안정성 방법 ²	점수화			Mab101	score Mab101	Mab102	score Mab102	83A10-TCBcv	score 83A10-TCBcv	22-TCBcv	score 22-TCBcv
	0	1	2								
pH 6 decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	-0.22	2	-1.57	2	0.11	2	0.96	2
pH 6 decrease in mg/mL	> 2 σC	—	≤ 2 σC	0.02	2	0.05	2	0.03	2	0.04	2
pH 6 SPR % similarity-BCMA	< 90	90 -95	> 95	99.99	2	99.44	2	99.96	2	99.85	2
pH 6 SPR % similarity-CD3	< 90	90 -95	> 95	99.96	2	99.95	2	99.90	2	99.50	2
pH 6-TBP decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	9.12	1	11.62	0	12.40	0	21.03	0
pH 6-TBP decrease in mg/mL	> 2 σC	—	≤ 2 σC	0.02	2	0.08	2	0.06	2	0.06	2
pH 6-TBP SPR % similarity-BCMA	< 80	80 -90	> 90	82.50	1	54.00	0	72.00	0	71.93	0
pH 6-TBP SPR % similarity-CD3	< 80	80 -90	> 90	75.30	0	72.30	0	59.70	0	58.50	0
pH 4 decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	9.12	1	8.73	1	7.97	1	9.38	1
pH 4 decrease in mg/mL	> 2 σC	—	≤ 2 σC	-0.06	2	0.07	2	0.04	2	-0.07	2
pH 4 SPR % similarity-BCMA	< 80	80 -90	> 90	99.99	2	99.98	2	99.42	2	84.76	1
pH 4 SPR % similarity-CD3	< 80	80 -90	> 90	99.93	2	99.98	2	100	2	99.60	2
pH 8 decrease in % main	> 10	5 - 10	< 5	7.83	1	9.08	1	8.88	1	9.00	1
pH 8 decrease in mg/mL	> 2 σC	—	≤ 2 σC	-0.04	2	0.13	2	0.12	2	0.04	2
pH 8 SPR % similarity-BCMA	< 80	80 -90	> 90	99.92	2	95.70	2	90.80	2	95.81	2
pH 8 SPR % similarity-CD3	< 80	80 -90	> 90	71.50	0	70.11	0	57.48	0	59.50	0
화학적 안정성 점수					1.50		1.38		1.38		1.31
총 개발성 점수					3.25		3.00		3.13		2.56
¹ F/T에 대한 SEC % 주요 피크 단량체 손실에 대한 허용 기준은 다른 모든 응력 조건보다 더 엄격하다.											
² 모든 화학적 안정성 방법의 보관 온도는 40° C였다.											

표 19

변이체 #1	샘플 ID:	Mab101			완충제 교환 후 농도(mg/mL)				13
화학적 안정성, F/T, DSC 및 교환 연구를 위한 제형					PEG 침전 스크린				
제형	변이체 #1의 부피 (mL)	TBP 스톡(stock) (vL)	100 mM 완충제의 부피 (mL)	최종 부피 (mL)	% PEG-6000 (w/v)	변이체 #1의 부피 (mL)	부피 40 % (w/v) PEG 스톡 (mL)	부피 100 mM His pH 6 (mL)	최종 부피 (mL)
pH 6	0.177	—	2.123	2.300	0	12	0	148	160
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303	5	12	20	128	160
pH 4	0.023	—	0.277	0.300	10	12	40	108	160

pH 8	0.023	—	0.277	0.300		15	12	60	88	160
pH 3	0.023	—	0.277	0.300		20	12	80	68	160
pH 6.0 제형의 2.3mL는 5 x 0.3mL 분취량과 2 x 0.4mL 분취량으로 나누어야 한다. 0.5M TBP의 3.0vL을 0.3mL 분취량 중 하나 내에 스파이크해야 한다. 0.4mL 분취량은 F/T 및 교반 연구에 사용된다.						25	12	100	48	160
						30	12	120	28	160
						35	12	140	8	160
변이체 #2	샘플 ID:	Mab102				완충제 교환 후 농도 (mg/mL)				11.9
화학적 안정성, F/T, DSC 및 교반 연구를 위한 제형					PEG 침전 스크린					
제형	변이체 #2의 부피 (mL)	TBP 스톱 (vL)	100 mM 완충제의 부피 (mL)	최종 부피 (mL)	% PEG-6000 (w/v)	변이체 #2의 부피 (mL)	부피 40 % (w/v) PEG 스톱 (mL)	부피 100 mM His pH 6 (mL)	최종 부피 (mL)	
pH 6	0.193	—	2.107	2.300	0	13	0	147	160	
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303	5	13	20	127	160	
pH 4	0.025	—	0.275	0.300	10	13	40	107	160	
pH 8	0.025	—	0.275	0.300	15	13	60	87	160	
pH 3	0.025	—	0.275	0.300	20	13	80	67	160	
pH 6.0 제형의 2.3mL는 5 x 0.3mL 분취량과 2 x 0.4mL 분취량으로 나누어야 한다. 0.5M TBP의 3.0vL을 0.3mL 분취량 중 하나 내에 스파이크해야 한다. 0.4mL 분취량은 F/T 및 교반 연구에 사용된다.						25	13	100	47	160
						30	13	120	27	160
						35	13	140	7	160
변이체 #3	샘플 ID:	83A10-TCBCV				완충제 교환 후 농도 (mg/mL)				12.8
화학적 안정성, F/T, DSC 및 교반 연구를 위한 제형					PEG 침전 스크린					
제형	변이체 #3의 부피 (mL)	TBP 스톱 (vL)	100 mM 완충제의 부피 (mL)	최종 부피 (mL)	% PEG-6000 (w/v)	변이체 #3의 부피 (mL)	부피 40 % (w/v) PEG 스톱 (mL)	부피 100 mM His pH 6 (mL)	최종 부피 (mL)	
pH 6	0.180	—	2.120	2.300	0	13	0	148	160	
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303	5	13	20	128	160	
pH 4	0.023	—	0.277	0.300	10	13	40	108	160	
pH 8	0.023	—	0.277	0.300	15	13	60	88	160	
pH 3	0.023	—	0.277	0.300	20	13	80	68	160	
pH 6.0 제형의 2.3mL는 5 x 0.3mL 분취량과 2 x 0.4mL 분취량으로 나누어야 한다. 0.5M TBP의 3.0vL을 0.3mL 분취량 중 하나 내에 스파이크해야 한다. 0.4mL 분취량은 F/T 및 교반 연구에 사용된다.						25	13	100	48	160
						30	13	120	28	160
						35	13	140	8	160
변이체 #4	샘플 ID:	22-TCBCV				완충제 교환 후 농도 (mg/mL)				5.4
화학적 안정성, F/T, DSC 및 교반 연구를 위한 제형					PEG 침전 스크린					
제형	변이체 #4의 부피 (mL)	TBP 스톱 (vL)	100 mM 완충제의 부피 (mL)	최종 부피 (mL)	% PEG-6000 (w/v)	변이체 #4의 부피 (mL)	부피 40 % (w/v) PEG 스톱 (mL)	부피 100 mM His pH 6 (mL)	최종 부피 (mL)	
pH 6	0.426	—	1.874	2.300	0	30	0	130	160	
pH 6 TBP	—	3.000	—	0.303	5	30	20	110	160	
pH 4	0.056	—	0.244	0.300	10	30	40	90	160	
pH 8	0.056	—	0.244	0.300	15	30	60	70	160	
pH 3	0.056	—	0.244	0.300	20	30	80	50	160	
pH 6.0 제형의 2.3mL는 5 x 0.3mL 분취량과 2 x 0.4mL 분취량으로 나누어야 한다. 0.5M TBP의 3.0vL을 0.3mL 분취량 중 하나 내에 스파이크해야 한다. 0.4mL 분취량은 F/T 및 교반 연구에 사용된다.						25	30	100	30	160
						30	30	120	10	160
						35	—	—	—	—

[0700] 표 19: 각 후보가 제형화되는 방법을 설명하는 제형 스프레드시트.

표 20

Sample ID: Mab101

Stress Condition	SEC HMW Area (mAu*min)	SEC main Area (mAu*min)	SEC LMW Area (mAu*min)	SEC total Area (mAu*min)	SEC % HMW	SEC % main	SEC % LMW	SEC (mg/mL)	parameter	value	units
pH 6.2-8 °C	16.5	2056.8	95.7	2169	0.761	94.827	4.412	0.984	extinc. coeff.	1.530	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6.40 °C	12.9	2010.8	91.8	2115.5	0.610	95.051	4.339	0.960	pathlength	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	149	1826.6	155.7	2131.3	6.991	85.704	7.305	0.967	flow rate	0.5	mL/min
pH 4.40 °C	61.2	1967.4	266.8	2295.4	2.666	85.711	11.623	1.042	inject. Vol.	0.020	mL
pH 8.40 °C	107.3	1972.2	187.5	2267	4.733	86.996	8.271	1.029			
pH 3.3hr. 25 °C	74.5	1910.6	104.6	2089.7	3.565	91.429	5.006	0.948			
pH 6.0 -80 F/T 5x	25	2197.7	103.9	2326.6	1.075	94.460	4.466	1.056			
pH 6.0 RT agitation	14.4	1986.3	94.4	2095.1	0.687	94.807	4.506	0.951			

Sample ID: Mab102

Stress Condition	SEC HMW Area (mAu*min)	SEC main Area (mAu*min)	SEC LMW Area (mAu*min)	SEC total Area (mAu*min)	SEC % HMW	SEC % main	SEC % LMW	SEC (mg/mL)	parameter	value	units
pH 6.2-8 °C	133.8	1995.3	101.8	2230.9	5.998	89.439	4.563	1.000	extinc. coeff.	1.550	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6.40 °C	123	1923.2	67	2113.2	5.821	91.009	3.171	0.947	pathlength	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	289.5	1592.1	164.3	2045.9	14.150	77.819	8.031	0.917	flow rate	0.5	mL/min
pH 4.40 °C	142.2	1677.8	258.8	2078.8	6.840	80.710	12.449	0.931	inject. Vol.	0.020	mL
pH 8.40 °C	139.8	1555.6	240.3	1935.7	7.222	80.364	12.414	0.887			
pH 3.3hr. 25 °C	216.7	1739.6	111.8	2068.1	10.478	84.116	5.406	0.927			
pH 6.0 -80 F/T 5x	130.7	2010.3	48	2189	5.971	91.836	2.193	0.981			
pH 6.0 RT agitation	148.6	2204	70.2	2422.8	6.133	90.969	2.897	1.085			

Sample ID: 83A10-TCBcv

Stress Condition	SEC HMW Area (mAu*min)	SEC main Area (mAu*min)	SEC LMW Area (mAu*min)	SEC total Area (mAu*min)	SEC % HMW	SEC % main	SEC % LMW	SEC (mg/mL)	parameter	value	units
pH 6.2-8 °C	0	2126.5	52.7	2179.2	0.000	97.582	2.418	1.029	extinc. coeff.	1.470	mL*mg ⁻¹ *cm ⁻¹
pH 6.40 °C	0	2054.6	53.4	2108	0.000	97.467	2.533	0.996	pathlength	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	177	1756.9	128.6	2062.5	8.582	85.183	6.235	0.974	flow rate	0.5	mL/min
pH 4.40 °C	0	1875.2	217.3	2092.5	0.000	89.615	10.385	0.989	inject. Vol.	0.020	mL
pH 8.40 °C	54.8	1715.4	163.6	1933.8	2.834	88.706	8.460	0.914			
pH 3.3hr. 25 °C	47.35	2069.45	71.3	2190.1	2.162	94.491	3.347	1.015			
pH 6.0 -80 F/T 5x	31.3	2118.9	53.3	2203.5	1.420	96.161	2.419	1.041			

[0701]

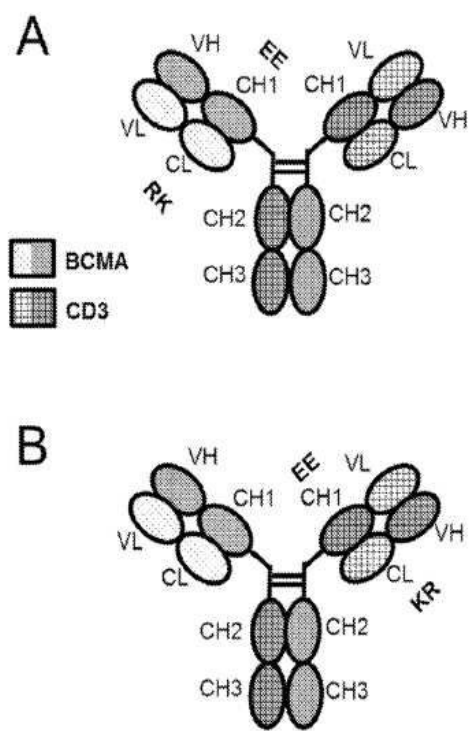
pH 6.0 RT agitation	21.3	2101.3	57.6	2182.2	0.976	96.38 4	2.640	1.011
------------------------	------	--------	------	--------	-------	------------	-------	-------

Sample ID: 22-TCBcv											
Stress Condition	SEC HMW Area (mAu*min)	SEC main Area (mAu*min)	SEC LMW Area (mAu*min)	SEC total Area (mAu* min)	SEC % HM W	SEC % main	SEC % LMW	SEC (mg/ mL)	parameter	value	units
pH 6.2-8 °C	18.1	1907.6	47.2	1972.9	0.917	96.69 0	2.352	0.938	extinc. coeff.	1.460	mL*mg ⁻¹ cm ⁻¹
pH 6.40 °C	14.6	1811	66.2	1891.8	0.772	95.72 9	1.499	0.900	pathlength	0.6	cm
pH 6-TBP 40 °C	297.1	1393	151	1841.1	16.13 7	75.66 1	8.202	0.876	flow rate	0.5	mL/min
pH 4.40 °C	22.7	1844.5	245.3	2112.5	1.075	87.31 4	11.612	1.006	inject. Vol.	0.020	mL
pH 8.40 °C	22.5	1656.8	210	1889.3	1.191	87.69 4	11.115	0.899			
pH 3.3hr. 25 °C	15.2	1425.4	56.3	1496.9	1.015	95.22 3	1.761	0.712			
pH 6.0-80 F/T 5x	21.8	1918.7	16.9	1957.4	1.114	98.02 3	0.863	0.931			
pH 6.0 RT agitation	6.8	1346.3	11.4	1364.5	0.498	98.66 6	0.835	0.649			

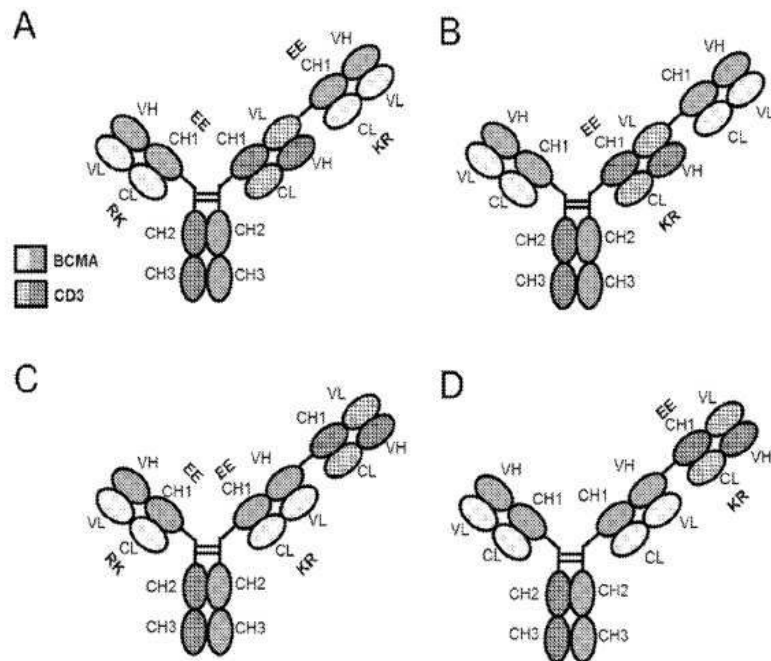
[0702]

도면

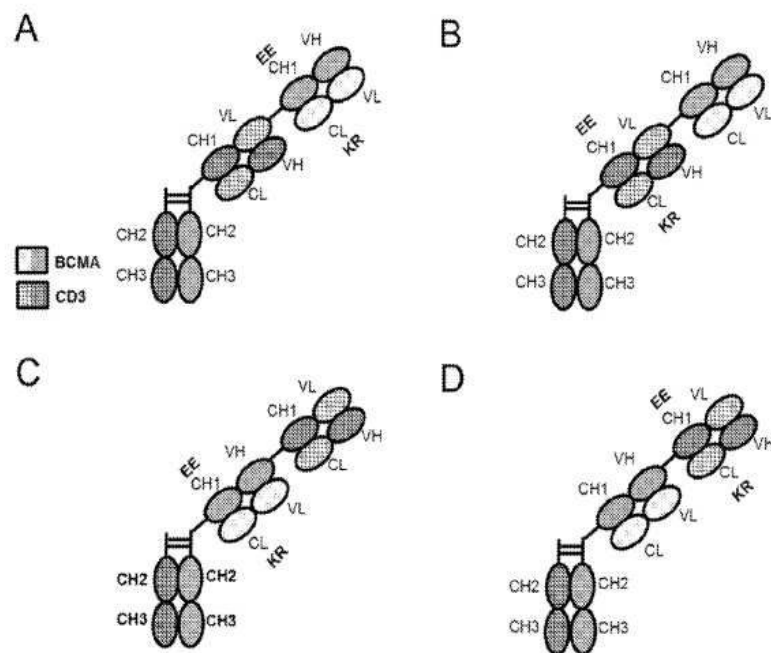
도면1



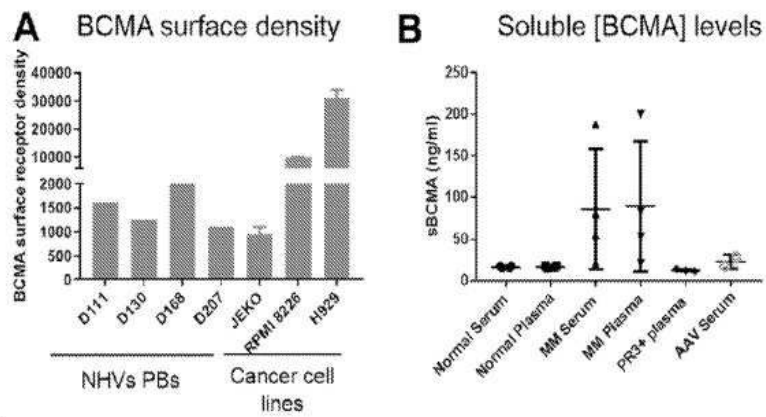
도면2



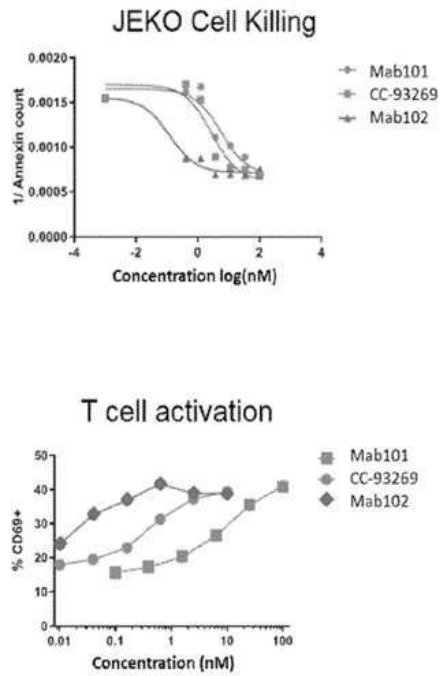
도면3



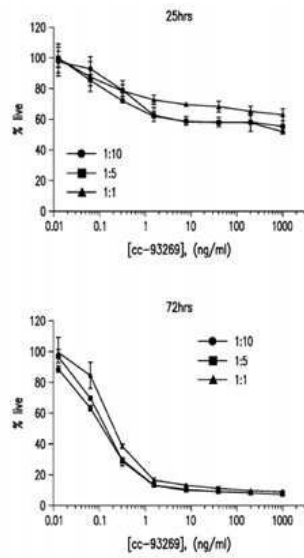
도면4



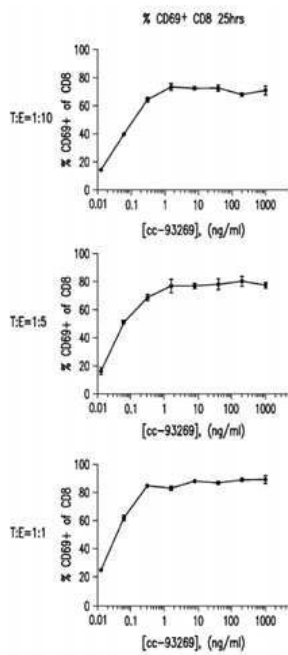
도면5



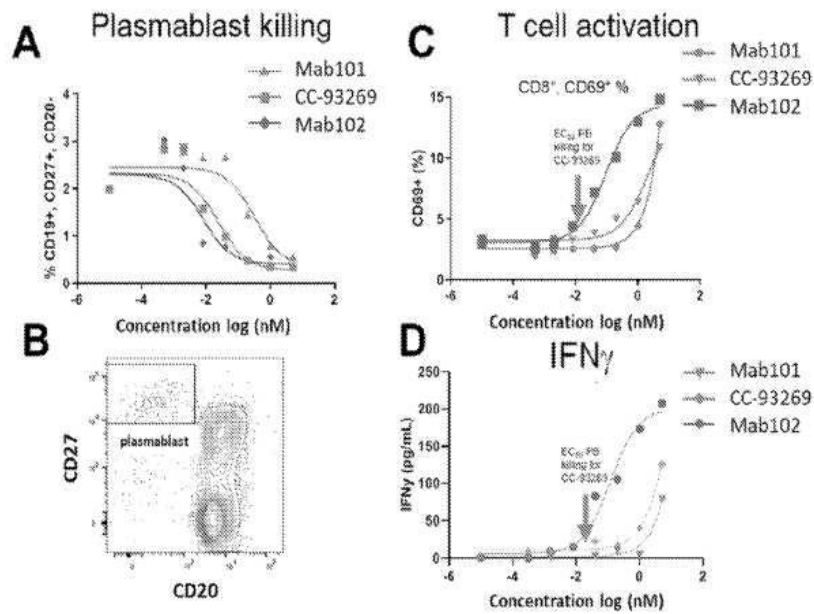
도면6a



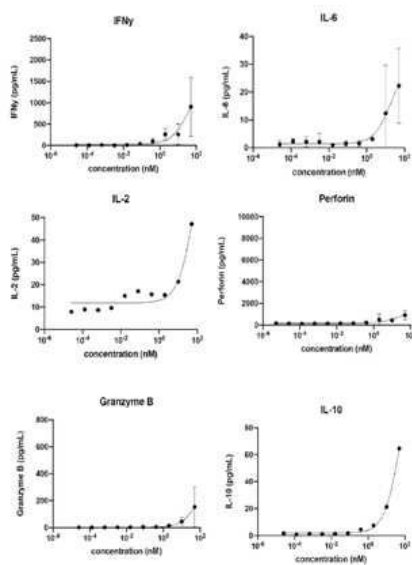
도면6b



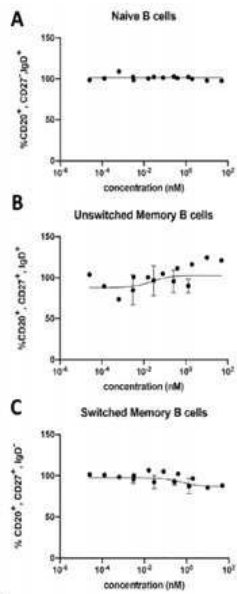
도면7



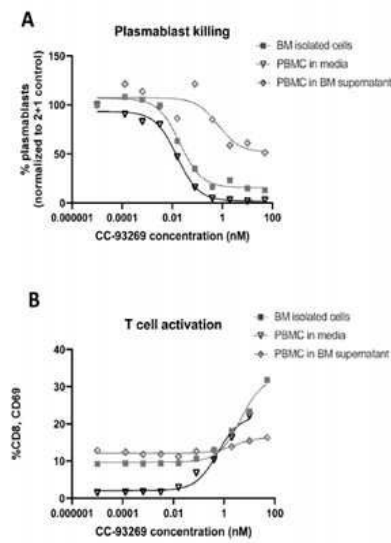
도면8



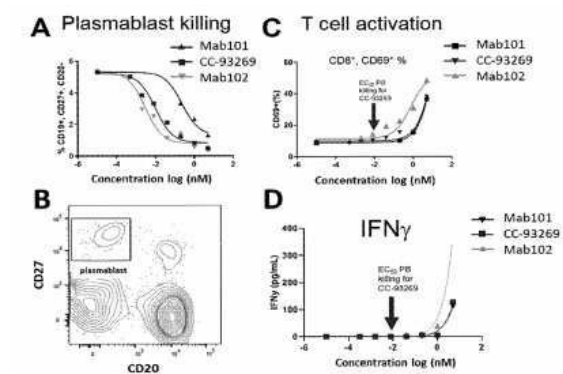
도면9



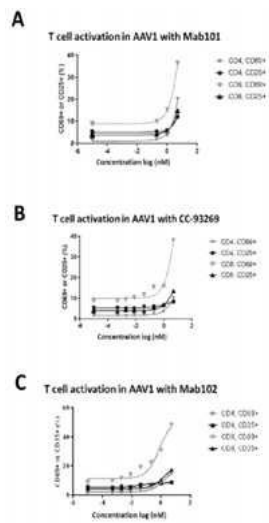
도면10



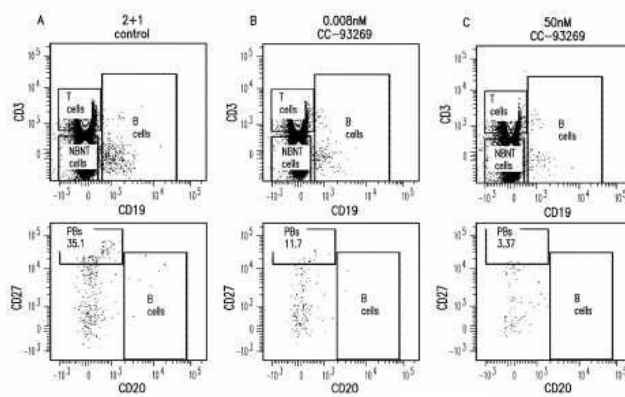
도면11



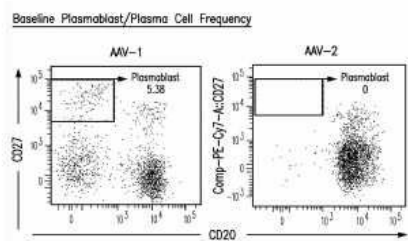
도면12



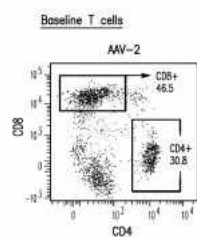
도면13



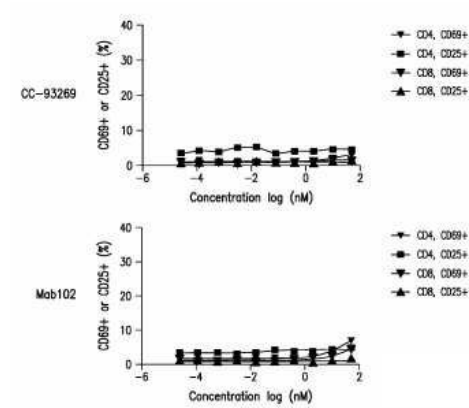
도면14a



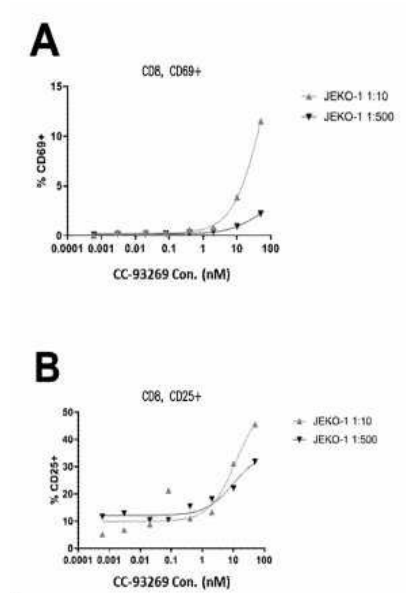
도면14b



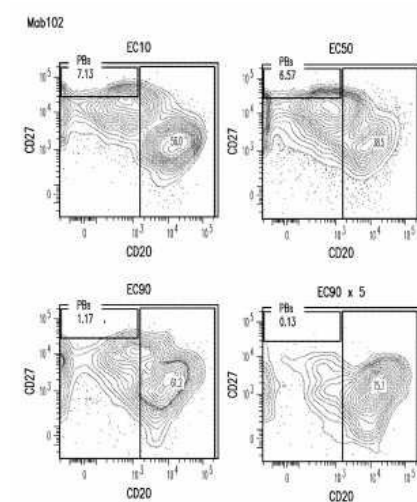
도면14c



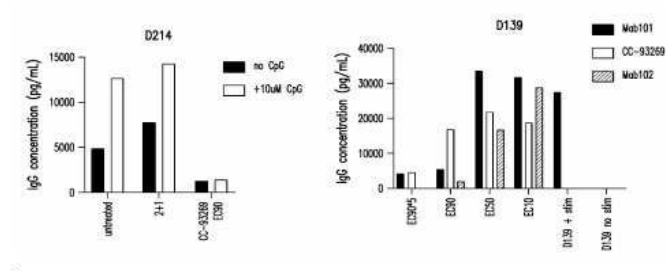
도면15



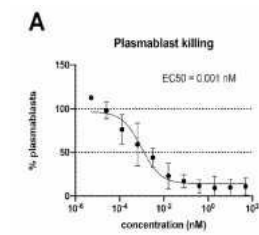
도면16a



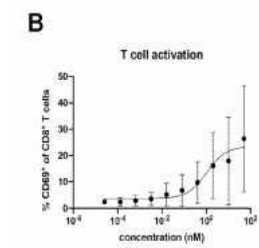
도면16b



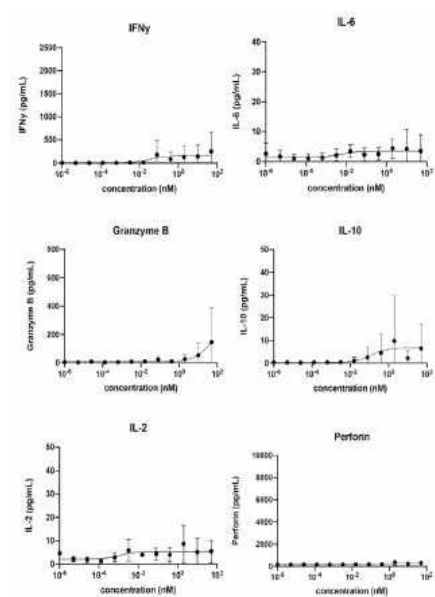
도면17a



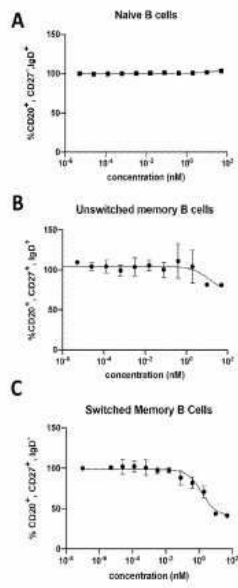
도면17b



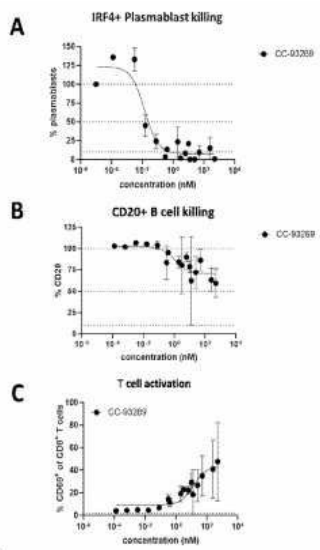
도면17c



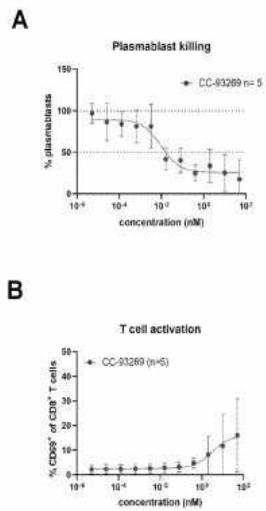
도면18



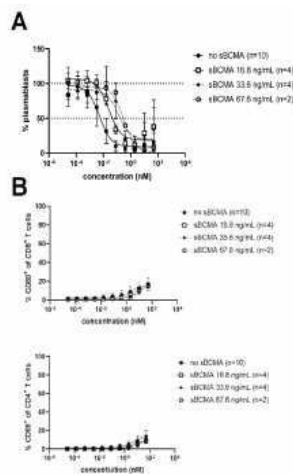
도면19



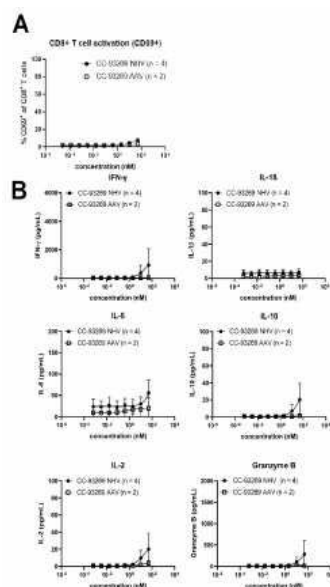
도면20



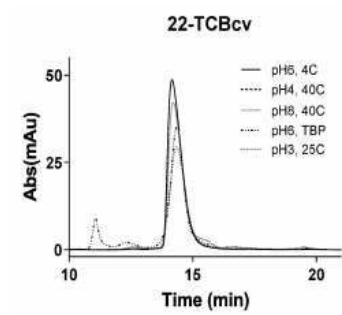
도면21



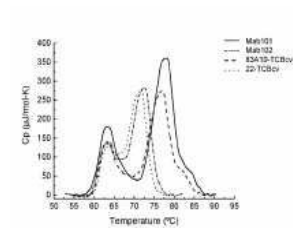
도면22



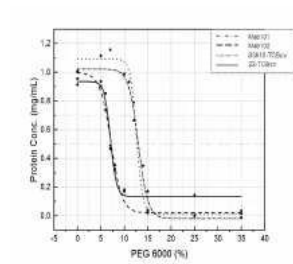
도면23



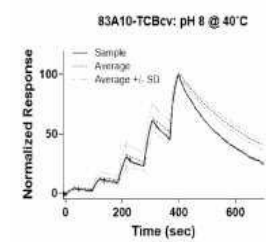
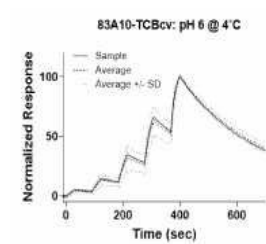
도면24



도면25



도면26



도면27

BCMA Light Chain									
Chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
\$-Identity	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Seq101	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq102	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq103-103a	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
22-103b	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
CD3 Light Chain									
Chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
\$-Identity	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Seq101	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq102	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq103-103a	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
22-103b	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Heavy Chain									
Chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
\$-Identity	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Seq101	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq102	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq103-103a	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
22-103b	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Heavy-Heavy Chain									
Chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
\$-Identity	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Seq101	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq102	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
Seq103-103a	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL
22-103b	EVN	TSQ	DTL	SL	SPQ	QRL	SL	SPQ	QRL

서 열 목록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.