(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0076178
(43) 공개일자 2015년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7010993
(22) 출원일자(국제) 2013년09월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년04월27일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2013/050693
(87) 국제공개번호 WO 2014/051433
국제공개일자 2014년04월03일
(30) 우선권주장
61/706,543 2012년09월27일 미국(US)
61/834,915 2013년06월14일 미국(US)

(71) 출원인
메뤼스 베.페.
네덜란드 엔엘-3584 세하 위트레흐트 파뒤알란 8 (포스트파크 133)
(72) 발명자
바커, 알렉산더 베르쏠드 헨드릭
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크 133)내
반 루, 피에터 포코
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크 133)내
로그텐버그, 톤
네덜란드, 엔엘-3584 세하 위트레흐트, 파뒤알란 8 (포스트파크 133)내
(74) 대리인
특허법인충현

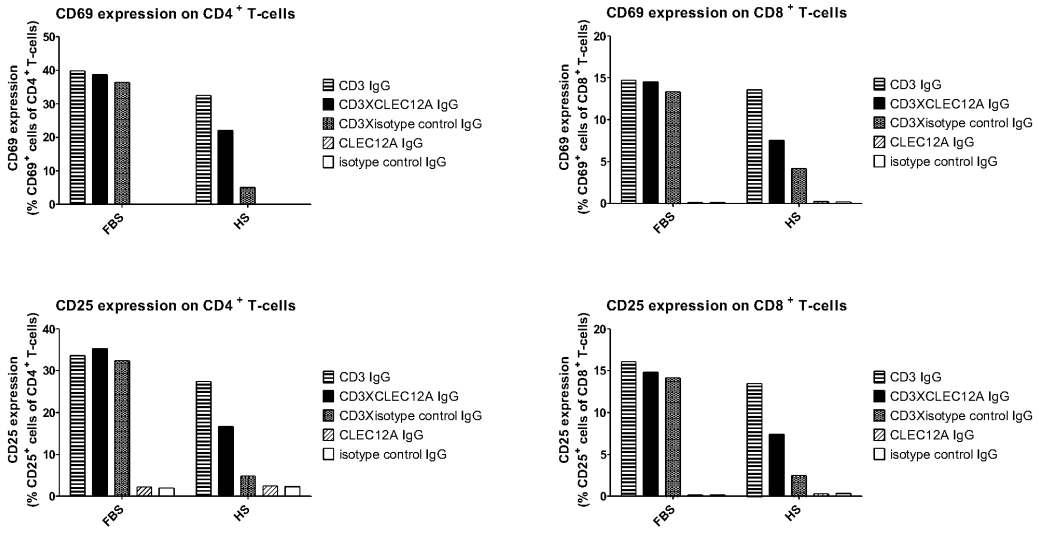
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **T 세포 인게이저로서 이중특이적 IgG 항체**

(57) 요 약

본 발명은 항체의 한쪽 팔이 면역 이펙터 세포 상의 에피토프와 결합하고, 나머지 한쪽 팔은 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 표적으로 하는 사람 IgG 이중특이적 항체를 제공한다. MDS, CML 또는 AML과 같은 악성질환에 대한 이들 항체의 제약학적 용도가 또한 제공된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07K 16/2851 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 한쪽 팔, 및 면역 이펙터 세포를 CLEC12A 또는 상기 기능적 등가물을 발현하는 이상 세포에 동원할 수 있는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 제2 팔을 포함하는, 이중특이적 IgG 항체.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 면역 이펙터 세포는 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 상기 면역 이펙터 세포 상의 상기 항원은 CD3인 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 4

제3 항에 있어서, 상기 항체는 CD3ε를 특이적으로 인식하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 5

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 양 팔은 공통 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 6

제1 항 내지 제5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공통 경쇄는 점라인 경쇄, 바람직하게 재배열된 점라인 사람 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IGJκ1*01인 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 7

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 사람 IgG1인 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 SGYTFTSY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 IINPSGGS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 GTTGDWFDY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 9

제8 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKGTTG DWFDYWGQGTLVTVSS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 가변 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 10

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 SGYTFTSY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 IINPSGGS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 GNYGDEFDY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 11

제10 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYG DEFDYWGQGTLVTVSS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 가변 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 12

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 SGYTFTGY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 WINPNSGG와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 DGYFADAFDY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 13

제12 항에 있어서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDGYF ADAFDYWGQGTLVTVSS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 가변 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 14

제3 항 내지 제13 항 중 어느 한 항에 있어서, CD3를 특이적으로 인식하는 제2 팔은 서열 SYGMH로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 서열 IIWYSGSKKNYADSVKG로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 서열 GTGYNWFDP로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 15

제14 항에 있어서, CD3를 특이적으로 인식하는 제2 팔은 서열 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGY NWFDPWGQGTLVTVSS로 구성된 가변 중쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 16

제1 항 내지 제15 항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 팔은 RASQSISSYLN과 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR1 서열과 AASSLQS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR2 서열과 QQSYSTPPT와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR3 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 17

제16 항에 있어서, 제1 및 제2 팔은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 가변 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 18

제1 항 내지 제17 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 IgG 항체는 상기 이중특이적 IgG 항체와 Fcγ 수용체의 상호작용이 유의하게 감소되도록 돌연변이된 CH2 및/또는 하부 힌지 도메인을 갖는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 19

제18 항에 있어서, 상기 돌연변이된 CH2 및/또는 하부 힌지 도메인은 아미노산 위치 235 및/또는 236(Kabat에 따라서 넘버링)에 적어도 하나의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 20

제18 항 또는 제19 항에 있어서, 상기 돌연변이된 CH2 및/또는 하부 힌지 도메인은 치환 L235G 및/또는 G236R, 바람직하게 L235G 및 G236R을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 IgG 항체.

청구항 21

단일 세포로부터 제1 항 내지 제20 항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 IgG 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 이중특이적 IgG 항체는 계면을 형성할 수 있는 2개의 CH3 도메인을 포함하며, 상기 방법은

- a) CLEC12A를 특이적으로 인식하고 제1 CH3 도메인을 함유하는 IgG 중쇄를 암호화하는 제1 핵산 서열, 및 b) 면역 이펙터 세포 상의 항원, 바람직하게 CD3를 특이적으로 인식하고 제2 CH3 도메인을 함유하는 IgG 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 서열을 갖는 세포를 제공하는 단계를 포함하고,

상기 핵산 서열들은 상기 제1 및 제2 CH3 도메인의 우선적 짝지음을 위한 수단과 함께 제공되며,

상기 방법은 상기 세포를 배양하고 상기 두 핵산 서열의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 IgG 항체를 수거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 22

제21 항에 있어서, 상기 세포는 공통 경쇄, 바람직하게 재배열된 점라인 사람 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IGJκ1*01를 암호화하는 제3 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제21 항 또는 제22 항에 있어서, 이중특이적 IgG1 항체를 생산하기 위한 방법으로서, 상기 제1 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351K 및 T366K(Kabat에 따라서 넘버링)를 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 포함하며, 상기 방법은 상기 세포를 배양하고 상기 핵산 서열의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 수거하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제21 항 내지 제23 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해서 얻어질 수 있는 항체.

청구항 25

제1 항 내지 제20 항 또는 제24 항 중 어느 한 항의 이중특이적 IgG 항체와 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 26

골수이형성 증후군(MDS), 만성 골수성 백혈병(CML) 또는 바람직하게 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료에서 제약으로 사용하기 위한 제1 항 내지 제20 항 또는 제24 항 중 어느 한 항의 이중특이적 IgG 항체.

청구항 27

골수이형성 증후군(MDS), 만성 골수성 백혈병(CML) 또는 바람직하게 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서 제1 항 내지 제20 항 또는 제24 항 중 어느 한 항의 이중특이적 IgG 항체의 사용.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항체 조작 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이상 세포를 수반하는 질환의 치료를 위한 치료적(사람) 항체의 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 종양의 치료를 위한 이중특이적 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 실험실 연구에서 이중특이적 항체는 면역 이펙터 세포가 종양 세포를 다시 표적으로 하도록 하기 위해서 널리 사용되었다. 이 경우, 하나의 결합 부위는 종양 관련 항원(TAA)에 대해 지정되고, 제2 항원은 이펙터 세포 상의 촉발제 분자, 예를 들어 T 세포 상의 CD3에 대해 지정된다(Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551). CD3와 종양 세포 관련 항원을 표적으로 하는 최초의 이중특이적 항체는 설치류의 속성을 가졌으며, 하이브리드 하이브리도마를 사용하여 제조되었다(Liu et al. 1985 PNAS 82: 8648, Staerz et al. 1986 PNAS 83:1453, Lanzavecchia et al. 1987, Eur. J. Imm. 17:105). 이들 하이브리드 하이브리도마에서, Ig 중쇄 및 경쇄의 재배열은 중쇄와 경쇄 오짝지음의 결과로서 단일특이적이며 비-기능적 이중특이적 항체의 훨씬 더 넓은 풀 안에서 이중특이적 기능적 항체 분자의 생성을 가져왔다. 이들의 이중 특이성 때문에 이들 기능적 이중특이적 항체는 뮤린 및 사람 세포독성 T 림프구(CTL)와 표적 세포를 연결해서 세포독성 기능을 촉발할 수 있었고, 그 결과 관련된 항원을 나타내는 종양 세포의 세포용해가 가능했다. 그러나, 다중클론 휴지기 사람 T 세포에 의한 종양 세포용해의 CD3xTAA 이중특이적 IgG 매개된 유도는 첨가된 외인성 IL-2 또는 항-CD28 mAb에 의한 공-자극이 제공되지 않는다면 달성될 수 없었다. 이것은 IL-2의 공-투여시에만 휴지기 사람 T 림프구에 의해서 CD19 양성 REH B-ALL 종양 셀라인의 세포용

해를 유도할 수 있었던 하이브리드 래트 IgG2b/마우스 IgG1 CD3xCD19 이중특이적 분자에 의해 예시된다(Haagen et al. 1995 Blood 85:3208). Zeidler et al.은 유사한 래트 IgG2b/마우스 IgG2a CD3xEpcam 분자를 사용하여 Epcam 양성 종양 세포의 이중특이적 IgG 유도된 세포용해가 외인성 IL-2의 첨가 없이 말초혈액 단핵 세포(PBMC)와 종양 세포를 모두 포함하는 혼합된 세포 배양물에서 달성될 수 있었다는 것을 증명했다(Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163: 1246). 상기 저자는 Fc 영역인 항체의 '제3' 팔이 PBMC 분획 내에 존재하는 Fcγ 수용체 양성 부속 세포와의 상호작용을 통해 이 효과를 야기한다고 주장했다. 특히, 강한 활성화 전위는 다른 보고된 조합들(예를 들어, 마우스 IgG2a/마우스 IgG1 또는 래트 IgG2b/마우스 IgG1)과는 달리 Fcγ 수용체 양성 부속 세포와 결합할 뿐만 아니라 이들을 활성화하는 하이브리드 하위부류 조합 마우스 IgG2a/래트 IgG2b와 상관되었다. 이것은 소위 말하는 triomAb CD3xEpcam 이중특이적 항체로서, 카투막소맙으로도 알려져 있으며, 상피 기원의 복부 종양의 임시 치료를 위해 유럽에서 임상적으로 개발되었고 등록되었다. 이 이중특이적 항체는 임상적 효능을 분명히 나타냈지만, 그것의 설치류 속성은 반복 투약시 항-제품 면역 반응을 유도하고, 따라서 이 형식의 폭넓은 적용을 막는다.

[0003] 하이브리드 설치류 triomAb 형식과 관련된 제조 문제와 면역원성 문제를 모두 해결하기 위한 대안의 CD3xTAA 형식이 조사되었다. 이러한 형식은 주로 전장 사람 IgG 분자와 차이가 있는 면역글로불린 유사 분자이며, Macrogenics(웹사이트 www.macrogenics.com/Platforms DART.html)에서 개발된 이중 친화성 재표적화(DART™) 분자, Micromet(현재는 Amgen)(Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012 (30):300-1)에 의해서 개발된 이중특이적 T 세포 인게이저(BiTE®) 분자, Abbott에 의해서 개발된 이중 가변 도메인-면역글로불린(DVD Ig™) 분자, 및 Affimed(웹사이트 www. affimed.com/tandab recruit)에 의해서 개발된 TandAb® RECRUIT 분자와 같은 분자들을 포함한다. 이들 형식 중 하나에 대해서 CD3xCD19 디아바디를 사용하여 CD19 양성 종양 세포를 세포용해하도록 말초혈액 림프구를 성공적으로 재표적화하는 데는 말초혈액 T 림프구의 전-활성화가 필요했으며, 이것은 현재 항-CD3 항체에 더해서 사람 IL-2를 사용하고 있다(Kipriyanov et al. 1998 Int.J.Can. 77:763). 2가 단쇄 Fv CD3xTAA BiTE® 형식(Loffler et al. 2000 Blood 95:2098)과 같은 다른 형식들은 휴지기 T 세포의 전-활성화를 필요로 하지 않고, 지극히 효과적인 방식으로 시험관내에서 항원 양성 세포용해를 유도할 수 있다(Dreier et al. 2002 Int.J.Canc. 100:690). 상이한 TAAs를 표적으로 하는 BiTE®를 사용한 추가의 연구는 BiTE® 형식의 강력한 효능이 항원 크기, 특히 TAA 상의 에피토프와 종양 세포막의 거리와 상관된다는 것을 드러냈다(Bluemel et al. 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197). 세포용해성 T 세포 시냅스의 효과적인 형성이 이들의 효능을 위한 구조 기반을 형성하기 위해 설명된 BiTE® 분자에 대해 증명되었고(Offner et al. Molecular Immunology 2006 (43) 763-771), 이것 역시 BiTE® 형식의 작은 크기와 관계된다고 생각된다. 크기 문제와 관련하여, 이것은 무손상 IgG와 같은 큰 분자는 너무 커서 효과적인 세포용해성 시냅스를 형성할 수 없을 거란 점을 시사한다. 블리나투모맙 CD3xCD19 BiTE®은 난치성 비-호지킨 림프종과 급성 림프구성 백혈병 환자에서 현저한 임상 효능을 나타냈다(Bargou et al. 2008 Science 321:974). 시험관내에서 낮은 수준에서도 CD3xCD19 BiTE®은 매우 효과적인 종양 세포용해를 나타내지만 환자에 이 이중특이적 형식을 투여하는 것은 상당한 도전이다. 작은 크기로 인하여 BiTE®은 순환계로부터 빠르게 흡수되고, 따라서 환자의 투약에는 연속 주입이 필요하다. 투약 섭생의 전체 기간이 2개월을 넘기 때문에 이 치료는 환자의 삶의 질에 상당한 영향을 미친다.

[0004] 따라서, 연속 주입이 필요하지 않고 면역원성이 없으며 제한적인 부작용만을 가지며, 정맥내 투여시 긴 순환 반감기와 조합되어 이상 세포의 근절에 있어서 IgG 분자와 맞물리는 효과적인 전장 이중특이적 T 세포에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) WO2004/009618

(특허문헌 0002) WO2005/118635

(특허문헌 0003) WO2005/000894

(특허문헌 0004) WO2005/000894

(특허문헌 0005) WO 2008/027236

(특허문헌 0006) WO2009/089004

(특허문헌 0007) WO2009/157771

(특허문헌 0008) WO 2010/108127

비특허문헌

[0006]

(비특허문헌 0001) Armour et al. Mol. Immunol. 2003(40) 585-593

(비특허문헌 0002) Bakker A.B. et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50

(비특허문헌 0003) Bargou et al. 2008 Science 321:974

(비특허문헌 0004) Bluemel et al. 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197

(비특허문헌 0005) Chames and Baty, MABS 2009(1) 539-547

(비특허문헌 0006) Chatenoud et al. 1990, Transplantation 49(4), pages 697-702

(비특허문헌 0007) Chen C.H. et al. Blood 2006, 107, p1459-67

(비특허문헌 0008) Cui et al. JBC 2012(287) 28206-28214

(비특허문헌 0009) De Kruif et al. 1995, J Mol Biol 248(1), pages 97-105

(비특허문헌 0010) De Kruif et al. J. Mol. Biol. 2009(387) 548-58

(비특허문헌 0011) De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010(106)741-50

(비특허문헌 0012) De Wildt RM et al. J. Mol. Biol. 1999(285) 895-901;

(비특허문헌 0013) Dreier et al. 2002 Int.J.Canc. 100:690

(비특허문헌 0014) Geginat, J. et al. Blood, 2003. 101(11), p. 4260-6

(비특허문헌 0015) Gunasekaran et al. JBC 2010(285) 19637-19646

(비특허문헌 0016) Haagen et al. 1995 Blood 85:3208

(비특허문헌 0017) Han Y. et al. Blood 2004, 104, p2858-66

(비특허문헌 0018) Kipriyanov et al. 1998 Int.J.Can. 77:763

(비특허문헌 0019) Kontermann, MABS 2012(4) 182-197

(비특허문헌 0020) Lanzavecchia et al. 1987, Eur.J.Imm. 17:105

(비특허문헌 0021) Liu et al. 1985 PNAS 82:8648

(비특허문헌 0022) Liesveld et al. 1988, J. Immunol. 140(5), pages 1527-1533

(비특허문헌 0023) Loffler et al. 2000 Blood 95:2098

(비특허문헌 0024) Marshall A.S. et al. J Biol Chem 2004, 279, p14792-802

(비특허문헌 0025) Merchant et al. Nature Biotechnology 1998 Volume 16, pp 677-681

(비특허문헌 0026) Moore et al. Blood 2011(117) 4542-4551

(비특허문헌 0027) Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059

(비특허문헌 0028) Nissim et al. The EMBO Journal vol.13 no.3 pp.692 - 698. 1994

(비특허문헌 0029) Norde W.J. et al. Blood 2009(113)(10): p. 2312-23

(비특허문헌 0030) Offner et al. Molecular Immunology 2006(43) 763-771

(비특허문헌 0031) Oganesyan et al. Biol. Crystall. 2008(D64)700

(비특허문헌 0032) Schaefer et al(Cancer Cell 20, 472-486, October 2011

(비특허문헌 0033) Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012(30):300-1

(비특허문헌 0034) Staerz et al. 1986 PNAS 83:1453

(비특허문헌 0035) Shields RL et al. JBC 2001(276) 6591-6604

(비특허문헌 0036) Sluijter, B.J., et al. Clin Immunol, 2010. 137(2), p. 221-33

(비특허문헌 0037) Suntharalingam et al. 2006, New England J Med 355(10), pages 1018-1028

(비특허문헌 0038) Van Rhenen et al. 2007 Blood 110:2659

(비특허문헌 0039) Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163:1246

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 항체의 한쪽 팔이 면역 이펙터 세포 상의 에피토프와 결합하고, 나머지 한쪽 팔은 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 표적으로 하는 사람 IgG 이중특이적 항체를 제공하기 위한 것이다. 또한 MDS, CML 또는 AML과 같은 악성질환에 대한 이들 항체의 제약학적 용도를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 AML의 치료를 위한 완전한 사람 IgG 이중특이적 전장 항체에 관한 것이다. 항체의 한쪽 팔은 면역 이펙터 세포 상의 에피토프, 바람직하게 CD3와 결합하고, 나머지 한쪽 팔은 새로운 AML 환자와 재발된 AML 환자의 90-95%에서 발현되는 골수성 세포 특이적 표면 표적인 CLEC12A를 표적으로 한다. CLEC12A는 AML 백혈병 줄기세포에서 발현되며, 정상 조혈 세포에서는 발현되지 않는다. CD33과는 달리, CLEC12A는 적혈구 전구체나 거핵세포에서 발현되지 않고, 따라서 본 발명의 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG1 항체는 혈소판 또는 적혈구 고갈을 유도하지 않을 것이다. 골수 세포 콜로니를 사용한 실험은 정상 골수에서 CLEC12A+ 세포의 고갈이 혈소판과 적혈구를 생성하는 골수성 계통에 영향을 미치지 않는다는 것을 보였다. 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG 항체는 PBMC 내의 FcγR 발현 세포와 T 세포의 맞물림의 결과인 비-특이적 면역 활성화를 감소시키기기 위해서 변형된 Fc 영역을 함유한다.

발명의 효과

[0009] 선행기술에서 triomAb 이중특이적 항체에 대해 설명된 데이터에 기초하면, 완전한 인간 IgG1 형식의 CD3xTAA 이중특이적 IgG가 T 세포의 전-활성화의 필요 없이 휴지기 말초혈액 림프구에서 세포용해 항-종양 활성을 유도할 수 있다는 것이 확실치 않았다. 이에 더하여, BiTE® 형식에 대한 입수가능한 데이터는 전장 IgG 분자가 종양 세포와 이펙터 세포 사이에 효과적인 세포용해성 시냅스를 생성하기에 너무 크다는 것을 시사했다. 놀랍게도 우리는 완전한 사람 CD3xCLEC12A 이중특이적 전장 IgG1이 시험관내에서 CLEC12A 양성 HL60 AML 종양 세포의 매우 효과적인 T 세포 매개 세포용해를 유도할 수 있었음을 증명했다. 실제로 효과적인 세포용해가 T 세포의 사전 활성화의 필요 없이 PBMC로부터 정제된 휴지기 T 림프구에 의해서 매개되었다. 더욱이, 우리는 이 세포용해 활성이 반드시 HL60 세포에 존재하는 FcγR과의 상호작용에 의존하지는 않는다는 것을 증명했는데, 사람 혈청 함유 배지에서 분석이 수행되었을 때 이 세포용해 활성이 과잉의 사람 IgG의 존재에 의해서 영향받지 않았기 때문이다. 이것은 전장 사람 IgG1 이중특이적 T 세포 인게이저 항체가 T 세포의 전-활성화의 필요나 활성 FcγR 상호작용의 필요 없이 효과적인 종양 세포용해를 발휘한다는 것을 최초로 밝힌 것이다. BiTE® 분자와 비교했을 때 IgG1의 비교적 큰 크기에도 불구하고 효과적인 세포용해가 달성된다. 특히, Fc 수용체 상호작용을 더 감소시키기 위하여 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG1 분자에 CH2/하부 힌지 돌연변이가 도입되었을 때도 이것이 여전히 면역 이펙터 세포에 의한 효과적인 종양 세포용해를 가져왔다. 이중특이적 사람 IgG1 T 세포 인게이저 항체

는 현재의 IgG에 비해서 이점을 갖는데, 사람 IgG1이 덜 면역원성일 것이므로 하이브리드 하위부류 조합 마우스 IgG2a/래트 IgG2b의 사용이 가능하고, 따라서 반복 치료에 적용될 수 있다. 이에 더하여, 전장 이중특이적 사람 IgG1 T 세포 인게이저 항체는 DART™, TandAb® 또는 BiTE®과 같은 면역글로불린/유사 분자에 비해 이점을 갖는데, 전장 사람 IgG1이 순환계로부터 빠르게 흡수되지 않아서 환자의 투약에 연속 주입이 필요하지 않을 것이므로, 환자에게 더욱 유리하다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1: CLEC12A 및 관련 서열

도 2: 다양한 항체들인 단일클론 2가 CDD3 IgG, 이중특이적 CD3XCLEC12 IgG, 이중특이적 CD3x이소타입 대조군 IgG, 단일클론 2가 CLEC12A IgG, 단일클론 2가 이소타입 대조군 IgG에 의한 T 세포 활성화

도 3: CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG 및 대조군 항체에 의한 HL60 세포의 특이적 세포용해

도 4: CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG 및 대조군 항체에 의한 HL60 세포의 특이적 세포용해(E:T 비).

도 5: 다양한 CLEC12A 팔 및 고정된 CD3 팔로 구성된 몇 개의 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG 분자들, 및 대조군 항체에 의한 HL60 세포의 특이적 세포용해

도 6: Fc 침묵화와 조합된 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG에 의한 HL60 세포의 특이적 세포용해(DM = 이중 돌연변이체; TM = 삼중 돌연변이체; WT = 야생형, Fc 침묵화 없음).

도 7: Fc 침묵화는 FcRn 결합에 영향을 미치지 않는다

도 8: T 세포 증식의 CD3xCLEC12A bsAb 표적 특이적 유도

도 9: 건강한 도너와 비교한 AML 환자의 CD8+ T 세포 구획

도 10: 특이적 CD3xCLEC12A DM-Fc 유도된 T 세포 활성화 및 AML 환자 T 세포에 의한 HL60 종양 세포용해

도 11: 자기조직 AML 환자 T 세포에 의한 AML 아세포의 특이적 세포용해

도 12: 환자 T 세포에 의한 특이적 단핵구 세포용해

도 13: Fc 침묵화는 방관자 세포 사이토카인 방출을 유의하게 제거한다

도 14A: HPB-ALL 세포 상의 항-CD3 항체를 염색한 FACS

도 14B: 평판 결합된 IgG, CFSE로 표지된 T 세포, FACS에 의해서 제5일째에 판독

도 15: HL60 세포독성 분석

도 16: HL60 세포 상에서 항-CLEC12A 항체를 염색한 FACS

도 17: HL60 세포독성 분석

도 18: FACS 분석

도 19: HL60 세포독성 분석

도 20a 내지 도 20c: CD3-특이적 및 CLEC12A-특이적 Fab 팔의 VH 서열. 012 공통 경쇄의 VL 서열. CDR 서열은 굵은 글씨이며 밑줄이 쳐져 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 구체예들

[0012] 본 발명은 이중특이적 IgG 항체를 제공하는데, 상기 이중특이적 IgG 항체는 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 한쪽 팔, 및 면역 이펙터 세포를 CLEC12A 또는 상기 기능적 등가물을 발현하는 이상 세포에 동원할 수 있는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 제2 팔을 포함한다.

[0013] 본원에서 사용된 용어 "CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는"은 상기 팔이, CLEC12A 또는 상기 기능적 등가물이 상기 항체 부근에 존재하는 상황에서 CLEC12A 또는 상기 기능적 등가물을 특이적으로 인

식하는 능력을 가진다는 것을 의미한다. 마찬가지로, 용어 "면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는"은 상기 팔이, 상기 항원이 상기 항체 부근에 존재할 때 상기 항원을 특이적으로 인식하는 능력을 가진다는 것을 의미한다. 항체에 의한 이러한 항원 인식은 전형적으로 항체의 상보성 영역과 항원과 항체 팔 모두의 특이적 3-차원 구조를 통해서 매개되며, 이들 두 구조는 항체들의 무작위 비-특이적 부착과는 반대로 정확하게 함께 결합된다(자물쇠/열쇠와 유사한 상호작용). 항체는 전형적으로 항원의 에피토프를 인식하고, 이러한 에피토프는 다른 화합물에도 역시 존재할 수 있으므로 "CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는" 그리고 "면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는" 본 발명에 따른 항체는 이러한 다른 화합물이 동일한 종류의 에피토프를 함유하는 경우 다른 화합물도 또한 인식할 수 있다. 이로써 용어 "CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는", "면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는" 및 "CD3를 특이적으로 인식하는"은 동일한 (종류의) 에피토프를 함유하는 다른 화합물에 대한 항체의 결합을 배제하지 않는다. 대신 가교-반응성이 허용된다. 본 발명에 따른 항체는 전형적으로 CLEC12A(또는 그것의 기능적 등가물) 및 면역 이펙터 세포 상의 항원, 바람직하게 CD3와 아래 더 상세히 개략된 대로 적어도 $1x10^{-5}$ M의 결합 친화성으로 결합할 수 있다.

[0014] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 항원 상의 에피토프와 결합하는 하나 이상의 도메인을 함유하는, 단백질의 면역글로불린 부류에 속하는 단백질성 분자를 의미하며, 여기서 이러한 도메인은 항체의 가변 영역으로부터 유래되거나 서열 상동성을 공유한다. 치료적 용도의 항체는 치료되는 대상의 천연 항체에 가능한 가까운 것이 바람직하다(예를 들어, 사람 대상에 대해서는 사람 항체). 항체 결합은 특이성 및 친화성의 항목으로 표시될 수 있다. 특이성은 항원 또는 그것의 에피토프가 결합 도메인에 의해서 특이적으로 결합되는지를 결정한다. 친화성은 특정 항원 또는 에피토프에 대한 결합 강도의 척도이다. 특이적 결합 또는 "특이적으로 인식하는"은 적어도 $1x10^{-5}$ M, 더 바람직하게 $1x10^{-7}$ M, 더 바람직하게 $1x10^{-9}$ M를 초과하는 친화성(KD)을 가진 결합으로 정의된다. 전형적으로, 치료적 용도를 위한 항체는 최대 $1x10^{-10}$ M 또는 심지어 그 이상의 친화성을 가진다. 본 발명의 항체는 전형적으로 사람 IgG 하위부류의 이중특이적 전장 항체이다. 바람직하게, 본 발명의 항체는 사람 IgG1 하위부류에 속한다.

[0015] 본 발명에 따라서 용어 '전장 IgG'는 본질적으로 완전한 IgG를 포함하는 것으로 정의되지만, 이것은 반드시 무손상 IgG의 모든 기능을 갖는 것은 아니다. 전장 IgG는 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 함유한다. 각 사슬은 불변(C) 및 가변(V) 영역을 함유하며, 이들은 CH1, CH2, CH3, VH, 및 CL, VL로 지정된 도메인으로 파괴될 수 있다. IgG 항체는 Fab 부분에 함유된 가변 영역 도메인을 통해서 항원과 결합하며, 결합 후 불변 도메인을 통해서, 주로 Fc 부분을 통해서 면역 시스템의 분자 및 세포와 상호작용할 수 있다. 용어 '가변 영역 도메인', '가변 영역', '가변 도메인', 'VH/VL 쌍', 'VH/VL', 'Fab 부분', 'Fab 팔', 'Fab' 또는 '팔'은 본원에서 상호 교환하여 사용된다. 본 발명에 따른 전장 항체는 원하는 특징을 제공하는 돌연변이가 존재할 수 있는 IgG 분자를 포괄한다. 이러한 돌연변이는 어떤 영역의 실질적인 부분의 결실은 아니어야 한다. 그러나, 하나 또는 몇몇 아미노산 잔기가 결실된 IgG 분자는 최종 IgG 분자의 결합 특징을 본질적으로 변경하지 않는 상태로 용어 "전장 IgG" 안에 포함된다. 예를 들어, 이러한 IgG 분자는 바람직하게 비-CDR 영역 내에 1 내지 10개 아미노산 잔기의 하나 이상의 결실을 가질 수 있으며, 여기서 결실된 아미노산은 IgG의 결합 특이성에 본질적이지 않다.

[0016] 전장 IgG 항체는 이들의 유리한 반감기와 면역원성의 이유로서 완전한 자가조직(사람) 분자에 근접한 상태로 머물러야 할 필요성 때문에 바람직하다. 본 발명에 따라서, 이중특이적 IgG 항체가 사용된다. 바람직한 구체예에서, 이중특이적 전장 IgG1 항체가 사용된다. IgG1 항체는 사람에서 그것의 긴 순환 반감기에 기초하여 선호한다. 사람에서 어떤 면역원성을 방지하기 위하여 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 사람 IgG1인 것이 바람직하다. 용어 '이중특이적'(bs)은 항체의 한쪽 팔이 제1 항원과 결합하고, 제2 팔은 제2 항원과 결합하며, 상기 제1 항원과 제2 항원이 동일하지 않은 것을 의미한다. 본 발명에 따라서, 상기 제1 및 제2 항원은 실제로 두 상이한 세포 타입에 위치된 2개의 상이한 분자이다. 용어 '[항체의] 한쪽 팔'은 바람직하게 전장 IgG 항체의 한쪽 Fab 부분을 의미한다. 내인성 면역 세포를 동원하고 활성화함으로써 세포독성을 매개하는 이중특이적 항체는 차세대 항체 치료제로서 대두되고 있다. 이것은 하나의 분자에 표적 세포(즉, 종양 세포)와 이펙터 세포(즉, T 세포, NK 세포 및 대식세포)에 대한 항원 결합 특이성을 조합함으로써 달성될 수 있다(Cui et al. JBC 2012(287) 28206-28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551; Loffler et al. 2000 Blood 95:2098; Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163:1246). 본 발명에 따라서, 한쪽 팔은 이상(종양) 세포 상의 CLEC12A 항원과 결합하고, 제2 팔은 면역 이펙터 세포 상의 항원과 결합하는 이중특이적 항체가 제공된다.

[0017] 또한, VH가 제1 항원을 특이적으로 인식할 수 있고, 면역글로불린 가변 영역에서 VH와 짝을 이루는 VL은 제2 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 항체가 고려된다. 최종 VH/VL 쌍은 항원 1이나 항원 2와 결합할 것이다. 이러한 소위 말하는 "투-인-원 항체"는, 예를 들어 WO 2008/027236, WO 2010/108127 및 Schaefer et al.(Cancer Cell 20, 472-486, October 2011)에 설명되며, 이들도 또한 두 상이한 항체와 결합하는 능력을 가지므로 용어 "이중특이적 항체"에 의해서 포괄된다. 한 구체예에서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 VH가 사용되고, 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 VL이 사용된다. 또는, 본 발명에 따른 항체는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 VH, 및 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 VL을 포함한다. 어느 방식이든 최종 항체는 전형적으로 두 VH/VL 쌍을 함유하며, 각 VH/VL 쌍은 CLEC12A(또는 그것의 기능적 등가물), 또는 면역 이펙터 세포 상의 항원과 결합할 것이다. 투-인-원 항체는 전형적으로 2개의 유사한 항원(AA 또는 BB; 단일특이적 2가)과 결합하거나, 또는 2개의 상이한 항원(AB; 이중특이적)과 결합할 것이다. 이로써 투-인-원 항체가 본 발명에 따른 치료적 용도에 사용된다면 이들 항체의 일부는 2개의 CLEC12A 분자(또는 그것의 기능적 등가물)나 면역 이펙터 세포 상의 2개의 항원, 예컨대 CD3과의 결합으로 인해서 원하는 효과를 발휘하지 않을 것이다. 그렇지만, 투여된 항체의 일부에 의해서 치료적 목표가 여전히 달성될 수 있으므로 투-인-원 항체도 적합하다.

[0018] 본원에서 사용된 용어 'CLEC12A'는 C 타입 렉틴 도메인 패밀리 12 멤버 A를 말하며, 이것은 또한 C 타입 렉틴 유사 분자 1(CLL 1)로도 알려져 있는데, CD34 음성 또는 CD34 저 발현 백혈병 줄기세포(측면 모집단)를 포함하여, 급성 골수성 백혈병(AML)에서 백혈병 아세포 세포 및 백혈병 줄기세포 상에서 발현되는 항원이다(A.B. Bakker et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50; Van Rhenen et al. 2007 Blood 110:2659; Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059). 다르게는, CLEC12A의 발현은 조혈 계통에, 특히 말초혈액과 골수에 있는 골수 세포에, 즉 과립구, 단핵구 및 수지상 세포 전구체에 제한된다. CLEC12A가 조혈 줄기세포에 부재한다는 점은 더욱 중요하다. 이런 발현 프로파일은 CLEC12A를 AML에서의 특히 유리한 표적으로 만든다. CLEC12A의 다른 명칭은 수지상 세포 관련된 C 타입 렉틴 2(DCAL 2), 골수 억제성 C 타입 렉틴 유사 수용체(MICL) 및 사멸 세포 렉틴 유사 수용체 서브패밀리 L, 멤버 1(KLRL1)을 포함한다(Zhang W. et al. GenBankTM access. no: AF247788; A.S. Marshall, et al. J Biol Chem 2004, 279, p14792-802; GenBankTM access.no: AY498550; Y.Han et al. Blood 2004, 104, p2858-66; H.Floyd, et al. GenBankTM access.no: AY426759; C.H.Chen, et al. Blood 2006, 107, p1459-67). 이들 서열의 정렬이 도 1에 제시된다. CLEC12A의 전장 형태는 대부분의 다른 이소폼에는 부재하는 10개 아미노산의 추가적인 세포내 스트레치를 포함하여 275개 아미노산 잔기를 포함하고, 엄격한 골수 발현 프로파일(표면 발현 및 mRNA 수준)을 나타낸다. 용어 'CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물'은 상기 언급된 모든 변이체와 Bakker et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50에 설명된 대로 엄격한 골수 발현 프로파일(표면 발현 수준과 mRNA 수준에서 모두)을 보유한 그것의 이소폼을 의미한다. 이로써 본 발명은 10개 아미노산의 상기 언급된 추가적인 세포내 스트레치를 결여한 기능적 등가물을 포함해서, 한쪽 팔이 CLEC12A의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 이중특이적 IgG 항체를 포함한다. 그러나, 한쪽 팔이 CLEC12A의 전장 형태를 특이적으로 인식하는 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 바람직하다.

[0019] 본원에서 사용된 용어 '이상 세포'는 종양 세포, 더 구체적으로 골수이형성 증후군(MDS)을 일으키는 세포와 같은 전백혈병성 세포 및 급성 골수성 백혈병(AML) 종양 세포 또는 만성 골수성 백혈병(CML) 세포와 같은 백혈병 세포를 포함하는 조혈 기원의 종양 세포를 포함한다.

[0020] 본원에서 사용된 용어 '면역 이펙터 세포' 또는 '이펙터 세포'는 표적 세포의 생육성에 영향을 미치기 위하여 활성화될 수 있는 포유류 면역 시스템의 세포들의 천연 레퍼토리 내의 세포를 말한다. 면역 이펙터 세포는 자연 사멸(NK) 세포, 세포독성 T 세포를 포함하는 T 세포, 또는 B 세포와 같은 림프 계통의 세포를 포함하며, 뿐만 아니라 단핵구 또는 대식세포, 수지상 세포 및 호중성 과립구와 같은 골수 계통의 세포도 면역 이펙터 세포로 간주될 수 있다. 이로써 상기 이펙터 세포는 바람직하게 NK 세포, T 세포, B 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 또는 호중성 과립구이다. 본 발명에 따라서, 이상 세포에 이펙터 세포의 동원은 면역 이펙터 세포가 이상 표적 세포에 가까운 부근으로 와서 이 이펙터 세포가 이들이 동원된 이상 세포를 직접 죽이거나, 또는 간접적으로 사멸을 개시할 수 있는 것을 의미한다. 비-특이적 상호작용을 피하기 위해서 본 발명의 이중특이적 항체는 체내에서 다른 세포와 비교하여 이들 면역 이펙터 세포에 의해서 적어도 과발현되는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 것이 바람직하다. 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 표적 항원은 CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D 및 NKp46을 포함할 수 있다. 바람직하게, 면역 이펙터 세포 상의 항원은 T 세포 상에서 발현된 CD3, 또는 그것의 기능적 등가물이다(기능적 등가물은 T 세포 상에 유사하게 분포되며 유사한 기능을 가진 CD3 유사 분자일 것이다(종류에서는 그렇지만 양에서는 반드시 그렇지는 않다)). 본원에서 사

용된 용어 "CD3"는 또한 CD3의 기능적 등가물을 포괄한다. 면역 이펙터 세포 상의 가장 바람직한 항원은 CD3ε 사슬이다. 이 항원은 이상 세포에 T 세포를 동원하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다. 이로써 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 바람직하게 CD3ε을 특이적으로 인식하는 한쪽 팔을 함유한다.

[0021] 따라서, 본 발명은 이중특이적 전장 IgG 항체를 제공하며, 여기서 상기 이중특이적 항체는 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 한쪽 팔, 및 이상 세포 발현 CLEC12A 또는 상기 기능적 등가물에 면역 이펙터 세포를 동원할 수 있는 면역 이펙터 세포 상의 항원을 특이적으로 인식하는 제2 팔을 포함하고, 상기 면역 이펙터 세포는 T 세포를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체를 제공하며, 여기서 면역 이펙터 세포 상의 상기 항원은 CD3 또는 그것의 기능적 등가물, 바람직하게 사람 CD3ε이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 이러한 이중특이적 IgG CLEC12AxCD3 항체의 F(ab)'2 단편을 제공한다.

[0022] 본 발명의 한 양태는 양 팔이 공통 경쇄를 포함하는 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체를 제공하는 것이다. 본 발명에 따라서 용어 '공통 경쇄'는 동일할 수 있거나, 또는 항체의 결합 특이성을 보유하면서 일부 아미노산 서열 차이를 가질 수 있는 경쇄를 말한다. 예를 들어, 본원에서 사용된 공통 경쇄의 범위 안에서, 예를 들어 중쇄와 짝을 이뤘을 때 결합 특이성에 기여하지 않거나 단지 부분적으로만 기여하는 영역에 있는 아미노산의 변화인 보존적 아미노산 변화 등을 도입하고 시험함으로써 동일하진 않지만 여전히 기능적으로는 등가인 경쇄를 제조하거나 찾는 것이 가능하다. 용어 '공통 경쇄', '공통 VL', '단일 경쇄', '단일 VL'은 모두 용어 '재배열'이 추가되거나 추가 없이 본원에서 상호 교환하여 사용된다. 본 발명의 한 양태는 기능적 항원 결합 도메인을 가진 항체를 형성하기 위하여 상이한 중쇄와 조합할 수 있는 사람 경쇄를 공통 경쇄로 사용하는 것이다(WO 2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998, Nissim et al. 1994). 바람직하게, 공통 경쇄는 점라인 서열을 가진다. 바람직한 점라인 서열은 사람의 레퍼토리에서 자주 사용되며, 많은 상이한 VH 영역들과 쌍을 이루는 뛰어난 능력을 가진 경쇄 가변 영역으로서, 우수한 열역학적 안정성, 수율 및 용해성을 가진다. 가장 바람직한 점라인 경쇄는 O12, 바람직하게 재배열된 점라인 사람 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IGJκ1*01(웹사이트 www.imgt.org의 IMGT 데이터베이스에 따라 명명) 또는 그것의 단편 또는 기능적 유도체이다. 용어 재배열된 점라인 사람 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IGJκ1*01, IGKV1-39/IGKJ1, huVκ1-39 경쇄 또는 줄여서 huVκ1-39는 본 출원 전체에서 상호 교환하여 사용된다. 명백하게, 당업자는 "공통"이란 또한 그것의 아미노산 서열이 동일하지 않은 경쇄의 기능적 등가물을 말한다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 기능적 결합 영역의 형성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 돌연변이(결실, 치환, 부가)가 존재하는, 상기 경쇄의 많은 변이체가 존재한다.

[0023] 특히 바람직한 구체예에서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 SGYTFTSY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 IINPSGGS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 GTTGDWFD와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 바람직하게, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 동일한 서열로 구성된다. 전형적으로, 인용된 CDR 서열로부터 1, 2 또는 3개 아미노산 잔기의 변형이 동일한 종류의 결합 활성(종류에서는 동일하나 양에서는 반드시 그렇지는 않다)을 보유한 상태에서 허용된다. 이로써 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 바람직하게 인용된 CDR 서열로부터 3개 이하, 바람직하게 2개 이하, 더 바람직하게 1개 이하의 아미노산에 차이가 있는 서열을 함유한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 동일하다. 인용된 CDR 서열은 Fab 팔 4327의 CDR 서열이며, 이것은 실시예에 나타낸 대로 우수한 CLEC12A 결합 특성을 가진다. Fab 팔 4327의 중쇄 서열과 그에 따른 CLEC12A-특이적 항체 4327의 VH가 도 20에 도시된다. 한 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 항체 4327의 VH와 적어도 90% 동일한 가변 중쇄(VH) 서열을 포함한다. 더 나아가, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 서열 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKGTTG DWFDYWGQGTLVTVS과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 또는 심지어 100% 동일한 서열로 구성된 VH 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 실시예에 나타낸 대로, 상기 언급된 VH 서열을 함유하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CD3를 인식하는 Fab 팔의 VH 서열과 함께(그리고 공통 경쇄와 함께) CLEC12A-양성 AML 종양 세포의 T 세포 매개 세포용해를 유도하는 우수한 능력을 가진다.

[0024] 추가의 바람직한 구체예에서, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 SGYTFTSY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 IINPSGGS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 GNYGDEFDY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 바람직하게, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 적어도 95%, 더 바람직하게

적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 동일한 서열로 구성된다. 상기 언급된 대로, 전형적으로 인용된 CDR 서열로부터 1, 2 또는 3개 아미노산 잔기의 변형이 동일한 종류의 결합 활성(종류에서는 동일하나 양에서도 반드시 그렇지는 않다)을 보유한 상태에서 허용된다. 이로써 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 바람직하게 인용된 CDR 서열로부터 3개 이하, 바람직하게 2개 이하, 더 바람직하게 1개 이하의 아미노산에 차이가 있는 서열을 함유한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 동일하다. 인용된 CDR 서열은 항체 4331의 VH 영역의 CDR 서열이며, 이것은 실시예에 나타낸 대로 우수한 CLEC12A 결합 특성을 가진다. Fab 팔 4331의 VH 서열이 또한 도 20에 도시된다. 한 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 Fab 팔 4331의 VH와 적어도 90% 동일한 VH 서열을 포함한다. 더 나아가, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 서열 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYG DEFDYWGQGTLVTVSS과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 또는 심지어 100% 동일한 서열로 구성된 VH 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 실시예에 나타낸 대로, Fab 팔 4331의 VH 서열을 함유하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CD3를 인식하는 Fab 팔의 VH 서열과 함께(공통 경쇄와 함께) CLEC12A-양성 AML 종양 세포의 T 세포 매개 세포용해를 유도하는 우수한 능력을 가진다.

[0025] 또 다른 바람직한 구체예는 CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 SGYTFTGY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 WINPNSGG와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 DGYFADAFDY와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체를 제공한다. 바람직하게, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 동일한 서열로 구성된다. 다시, 전형적으로 인용된 CDR 서열로부터 1, 2 또는 3개 아미노산 잔기의 변형이 동일한 종류의 결합 활성(종류에서는 동일하나 양에서도 반드시 그렇지는 않다)을 보유한 상태에서 허용된다. 이로써 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 바람직하게 인용된 CDR 서열로부터 3개 이하, 바람직하게 2개 이하, 더 바람직하게 1개 이하의 아미노산에 차이가 있는 서열을 함유한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 중쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 동일하다. 인용된 CDR 서열은 항체 3918의 VH의 CDR 서열이며, 이것은 실시예에 나타낸 대로 또한 우수한 CLEC12A 결합 특성을 가진다. 항체 3918의 VH 서열이 또한 도 20에 도시된다. 한 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 항체 3918의 VH와 적어도 90% 동일한 VH 서열을 포함한다. 더 나아가, CLEC12A 또는 그것의 기능적 등가물을 특이적으로 인식하는 팔이 서열 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDGYF ADAFDYWGQGTLVTVSS과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 또는 심지어 100% 동일한 서열로 구성된 VH 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 실시예에 나타낸 대로, Fab 팔 3918의 VH 서열을 함유하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CD3를 인식하는 Fab 팔의 VH 서열과 함께(그리고 공통 경쇄와 함께) CLEC12A-양성 AML 종양 세포의 T 세포 매개 세포용해를 유도하는 우수한 능력을 또한 가진다.

[0026] 더 바람직한 구체예에서, 제2 팔이 CD3를 특이적으로 인식하며, 서열 SYGMH으로 구성된 중쇄 CDR1 서열과 서열 IIWYSGSKKNYADSVKG로 구성된 중쇄 CDR2 서열과 서열 GTGYNWFDP로 구성된 중쇄 CDR3 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다. 바람직하게, 상기 CD3-특이적 팔은 서열 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGY NWFDPWGQGTLVTVSS로 구성된 VH 서열을 포함한다. 인용된 CDR 서열 및 VH 서열은 항체 3896의 서열들이다. 이들 서열은 또한 도 20에 도시된다. 이들 CD3-특이적 CDR 서열의 중쇄 및/또는 Fab 팔 3896의 인용된 VH 서열은 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체에 바람직한데, 이들 서열은 CLEC12A-양성 AML 종양 세포와의 충분한 결합을 동시에 허용하면서 CD3-발현 면역 세포에 대한 최적의 친화성을 가진 이중특이적 항체를 제공하기 때문이다. 이중특이적 항체의 전체적 효과는 항원 1의 한쪽 팔의 친화성과 항원 2의 나머지 한쪽 팔의 친화성의 조합 효과에 의해서 결정된다고 생각된다. CLEC12A(또는 그것의 기능적 등가물)와 면역 이펙터 세포 상의 항원(바람직하게 CD3)에 대해 특이성을 갖는 본 발명의 항체의 경우, CLEC12A-양성 종양 세포의 T 세포 매개 세포용해를 효과적으로 유도하기 위하여 CD3-양성 면역 세포 및 CLEC12A-발현 종양 세포와의 결합의 최적화된 타이밍이 바람직하다. CLEC12A/CD3 이중특이적 항체의 친화성들 사이의 균형이 가장 중요하다고 가정된다. CLEC12A에 대한 훨씬 낮은 친화성에 비해 CD3에 대한 유의하게 높은 친화성(즉, CD3에 대해 너무 높은 친화성)은 항체가 주로 CD3 발현 T 세포와 결합하는 상황을 가져올 것이라고 생각된다. 이러한 '이중특이적 항체-로드' T-세포는 CD3를 내재화할 수 있거나, 또는 조직으로 침입함으로써 이들이 CLEC12A-양성 종양 세포와 만나기 전에도 순환계에 남을

수 있다. 이것은 이중특이적 항체의 치료적 효과를 감퇴시킬 것이다.

[0027] CLEC12A-양성 종양 세포는 본 발명에 따른 하나 이상의 이중특이적 항체와 먼저 결합되는데, 이후 T 세포가 이중특이적 항체의 자유로운 CD3 팔에 의해서 유인되고 T 세포 활성화가 일어난다. 또는, CD3 양성 T 세포 및 CLEC12A-양성 종양 세포가 이중특이적 항체에 의해서 본질적으로 동시에 결합된다. 이로써 CLEC12A(또는 그것의 기능적 등가물)와 면역 이펙터 세포 상의 항원(바람직하게 CD3)에 대한 친화성은 모두 바람직하게 올바른 균형이 달성되도록, 즉 최종 이중특이적 항체가 CLEC12A 및 CD3과 본질적으로 동시에 결합하거나, 또는 이중특이적 항체가 충분한 규모로 CLEC12A-양성 종양 세포와 결합하는 경향을 가지며, 이후 T 세포 활성화가 일어나고 종양 세포가 세포용해되도록 선택되거나 조정된다. 본 발명에 따라서, CD3 및 CLEC12A에 대한 결합 친화성들 사이의 이러한 균형은 바람직하게 Fab 팔 3896(이것은 CD3에 대해 특이적이다)의 CDR 서열(또는 전체 VH 서열)을 가진 VH와 Fab 팔 4327 또는 4331 또는 3918 또는 3116(이것은 CLEC12A에 대해 특이적이다)의 CDR 서열(또는 전체 VH 서열)을 가진 VH를 조합함으로써 달성된다. 이러한 최종 이중특이적 항체는 CD3와 CLEC12A에 대한 결합 친화성들 사이의 유리한 균형을 나타내며, 이로써 T 세포와 CLEC12A-양성 AML 종양 세포가 효과적으로 함께 모이고 CLEC12A-양성 AML 종양 세포의 T 세포 매개 세포용해가 최적으로 유도된다.

[0028] 앞서 본원에 설명된 대로, 양 팔이 공통 경쇄 가변 도메인을 포함하는 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 바람직하게 제공된다. 특히 바람직한 공통 경쇄는 사람 재배열 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IgJκ1*01이며, 이것은 012라고 명명된다. 012 VL의 뉴클레오티드와 아미노산 서열도 도 20에 도시된다. CDR 서열은 굵은 글씨로 밑줄이 쳐있다. 012의 CDR 서열을 적어도 포함하는 공통 경쇄를 함유하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체가 바람직하다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 제1 및 제2 팔이 RASQSISSYLN와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR1 서열 및 AASSLQS와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR2 서열 및 QQSYSTPPT와 적어도 90% 동일한 서열로 구성된 경쇄 CDR3 서열을 더 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체를 제공한다. 바람직하게, 상기 경쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 동일한 서열로 구성된다. 다시, 전형적으로 인용된 CDR 서열로부터 1, 2 또는 3개 아미노산 잔기의 변형이 허용된다. 이로써 상기 경쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열로부터 바람직하게 인용된 CDR 서열과 3개 이하, 바람직하게 2개 이하, 더 바람직하게 1개 이하의 아미노산에 차이가 있는 서열을 함유한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 경쇄 CDR 1, 2 및 3 서열은 인용된 CDR 서열과 동일하다. 한 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체는 012 VL 사슬과 적어도 90% 동일한 VL 서열을 포함한다. 더 나아가, 제1 및 제2 팔이 서열 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95%, 더 바람직하게 적어도 97%, 더 바람직하게 적어도 98%, 더 바람직하게 적어도 99% 또는 심지어 100% 동일한 서열로 구성된 VL 서열을 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 제공된다.

[0029] 용어 "와 % 동일한"은 두 서열의 정렬 및 필요하다면 최대 동일성 퍼센트를 달성하기 위한 갭의 도입 후 기준 서열의 잔기와 동일한 후보 아미노산 서열의 잔기의 퍼센트로 본원에서 정의된다. 정렬 방법과 컴퓨터 프로그램은 본 분야에 잘 알려져 있다. 후보 서열이 이 정의 내에 들어가는지 결정하려는 목적에 사용되거나 적합한 한 가지 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.이 저작권을 가진 "Align 2"이며, 이것은 1991년 12월 10일에 United States Copyright Office(워싱턴디씨)에 사용자 참고문서와 함께 제출되었다.

[0030] 본 발명에 따른 이중특이적 전장 IgG 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 가지며, IgG의 Fc 영역이 또한 Fc 수용체에 대한 제3 결합 부위를 포함한다. 세포가 Fc 수용체와 이중특이적 항체의 표적 중 하나를 모두 지닌다면, 상기 세포의 표면에서 Fc 수용체와 상기 표적의 가교 결합이 일어날 수 있고, 이것은 바람직하지 않은 효과를 초래할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 이중특이적 IgG 항체와 Fc 감마(Fcγ) 수용체의 상호작용이 유의하게 감소되도록 상기 이중특이적 IgG 항체가 돌연변이된 하부 힌지 및/또는 CH2 도메인을 가진, 본 발명에 따른 이중특이적 전장 IgG 항체를 제공한다. 본원에서 사용된 용어 "상기 이중특이적 IgG 항체와 Fc 감마(Fcγ) 수용체의 상호작용이 유의하게 감소되도록"은 이러한 Fc 감마 수용체가 상기 항체 부근에 존재할 경우 Fc 감마 수용체와 상호작용하는 상기 이중특이적 IgG 항체의 능력이 감소된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따라서, 항체의 영역, 바람직하게 항체의 하부 힌지 및/또는 CH2 도메인이 돌연변이되고(전형적으로 그것을 암호화하는 돌연변이된 핵산 서열을 발현함으로써), 이로써 Fc 수용체와 상호작용하는 능력이 감퇴된다. Fc 수용체와의 상호작용은 본질적으로 없애는 것이 바람직하다. Fcγ 수용체와의 결합에 연루되는 사람 IgG1의 아미노산 잔기는 이미 맵핑되어 있다. 변경되었을 때 특이적 수용체와의 결합만을 개선하거나 또는 한 가지 종류의 수용체와의 결합은 개선하고 동시에 다른 종류와의 결합은 감소시킨 잔기에 더하여, 수용체 중 하나 이상

과의 결합을 파기하는 몇몇 잔기가 발견되었다(Shields RL et al. JBC 2001 (276) 6591-6604; Armour et al. Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593). 추가의 바람직한 구체예에서, 상기 돌연변이된 하부 힌지 및/또는 CH2 도메인은 아미노산 위치 235 및/또는 236(Kabat에 따른 넘버링)에 적어도 하나의 치환을 포함한다. 바람직하게, 아미노산 위치 235와 236이 모두 치환된다. 이들 부위에서의 치환이 이중 특이적 항체와 종양 세포에 존재하는 Fc 수용체 사이의 상호작용을 본질적으로 방지할 수 있다는 것이 실시예에서 나타난다. 특히, 치환 L235G 및/또는 G236R이 그 목적에 매우 적합한 것으로 나타난다. 따라서, 또한 상기 돌연변이된 CH2 및/또는 하부 힌지 도메인이 치환 L235G 및/또는 G236R을 포함하는 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체가 본원에 제공된다. 바람직하게, L235G와 G236R가 모두 치환된다. 또는, 당업자는 치환 234F, 235E 및/또는 331S를 포함하는 하부 힌지 및/또는 CH2 돌연변이를 도입할 수 있다(Oganesyan et al. Biol. Crystall. 2008(D64)700). 바람직하게, 모든 3개 치환이 이 대안에서 도입된다.

[0031] 미국 정규 출원 No. 13/866,747와 PCT 출원 No. PCT/NL2013/050294으로 이어진 우리의 미국 가 출원 61/635,935(본원에 참고자료로 포함된다)에서 우리는 단일 세포로부터 이중특이적 항체를 생성하는 방법 및 수단을 개시하며, 이로써 단일특이적 항체의 형성에 비해서 이중특이적 항체의 형성을 선호하는 수단이 제공된다. 이들 방법은 또한 본 발명에서 유리하게 채용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 단일 세포로부터 본 발명에 따른 이중특이적 전장 IgG 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 이중특이적 전장 IgG 항체는 계면을 형성할 수 있는 2개의 CH3 도메인을 포함하고, 상기 방법은 상기 세포에 a) 폴리펩티드 사슬을 포함하는 제1 CH3 도메인을 암호화하는 제1 핵산 분자, b) 폴리펩티드 사슬을 포함하는 제2 CH3 도메인을 암호화하는 제2 핵산 분자를 제공하는 단계를 포함하며, 상기 핵산 분자들은 폴리펩티드를 포함하는 상기 제1 및 제2 CH3 도메인의 우선적 짝지음을 위한 수단과 함께 제공되고, 상기 방법은 상기 숙주 세포를 배양하고 상기 두 핵산 분자의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 전장 IgG 항체를 수거하는 단계를 더 포함한다. 상기 제1 및 제2 핵산 분자는 동일한 벡터 또는 유전자 송달 비히클의 일부일 수 있으며, 숙주 세포의 게놈의 동일한 부위에 통합될 수 있다. 또는, 상기 제1 및 제2 핵산 분자는 상기 세포에 개별적으로 제공된다.

[0032] 바람직한 구체예는 단일 세포로부터 본 발명에 따른 전장 이중특이적 IgG 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 이중특이적 IgG 항체는 계면을 형성할 수 있는 2개의 CH3 도메인을 포함하고, 상기 방법은 a) CLEC12A를 특이적으로 인식하고 제1 CH3 도메인을 함유하는 IgG 중쇄를 암호화하는 제1 핵산 서열, 및 b) 면역이펙터 세포 상의 항원, 바람직하게 CD3을 특이적으로 인식하고 제2 CH3 도메인을 함유하는 IgG 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 서열을 갖는 세포를 제공하는 단계를 포함하며, 상기 핵산 서열들은 상기 제1 및 제2 CH3 도메인의 우선적 짝지음을 위한 수단과 함께 제공되고, 상기 방법은 상기 세포를 배양하고 상기 두 핵산 서열의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 IgG 항체를 수거하는 단계를 더 포함한다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 세포는 또한 공통 경쇄를 암호화하는 제3 핵산 서열을 가진다. 바람직한 공통 경쇄는 012, 바람직하게 상기 설명된 재배열된 점라인 사람 카파 경쇄 IgVκ1-39*01/IGJκ1*01이다. 본질적으로 이중특이적 전장 IgG 분자만을 생성하기 위한 바람직한 돌연변이는 제1 CH3 도메인에서 아미노산 치환 L351K 및 T366K(Kabat에 따른 넘버링)와 제2 CH3 도메인에서 아미노산 치환 L351D 및 L368E이거나, 또는 그 반대의 것이다. 더 나아가, 이중특이적 IgG1 항체를 생성하기 위한 본 발명에 따른 방법이 제공되며, 여기서 상기 제1 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351K 및 T366K(Kabat에 따른 넘버링)를 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351D 및 L368E를 포함하며, 상기 방법은 상기 세포를 배양하고 상기 핵산 서열들의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 수거하는 단계를 더 포함한다. 또한, 이중특이적 IgG1 항체를 생성하기 위한 본 발명에 따른 방법이 제공되며, 여기서 상기 제1 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351D 및 L368E(Kabat에 따른 넘버링)를 포함하고, 상기 제2 CH3 도메인은 아미노산 치환 L351K 및 T366K를 포함하며, 상기 방법은 상기 세포를 배양하고 상기 핵산 서열들의 발현을 허용하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 수거하는 단계를 더 포함한다. 이들 방법들에 의해서 생성될 수 있는 항체는 본 발명의 일부이다.

[0033] 더 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체와 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본원에서 사용된 이러한 '제약학적으로 허용되는 담체'는 생리학적으로 양립성인 어떤 그리고 모든 용매, 염, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수지연제 등을 포함한다. 투여 경로(예를 들어, 정맥내, 피하, 관절내 등)에 따라서, 활성 화합물은 산의 작용이나 화합물을 불활성화할 수 있는 다른 천연 조건으로부터 화합물을 보호하기 위해서 어떤 재료로 코팅될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 항체 및 제약 조성물은 골수 기원의 다양한 백혈병 및 전백혈병성 질환뿐만 아니라 B 세포 림프종의 치료에서 용도를 찾는다. 본 발명에 따라서 치료될 수 있는 질환은 골수성 백혈병이나 전백혈병성 질환, 예컨대 AML, MDS 및 CML 및 호지킨 림프종 및 대부분의 비-호지킨 림프종을 포함한다. 따라서, 본 발명은 골수

이형성 증후군(MDS), 만성 골수성 백혈병(CML) 또는 바람직하게 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료에서 제약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 전장 IgG 항체를 제공한다. 또한, 골수이형성 증후군(MDS), 만성 골수성 백혈병(CML) 또는 바람직하게 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서 본 발명에 따른 이중특이적 IgG 항체의 사용이 제공된다.

[0035] 환자에게 투여되는 본 발명에 따른 항체의 양은 전형적으로 치료적 창 내이며, 이것은 치료적 효과를 얻기 위한 충분한 양이 사용되지만 그 양은 허용되지 않는 규모의 부작용을 초래하는 문턱값을 초과하지 않는다는 것을 의미한다. 원하는 치료적 효과를 얻기 위해 필요한 항체의 양이 적을수록 전형적으로 치료적 창은 더 넓을 것이다. 따라서, 저 용량에서 충분한 치료적 효과를 발휘하는 본 발명에 따른 항체가 바람직하다.

[0036] 유럽과 미국에서는 대략 30,000명의 환자가 매년 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진단된다. 이들 환자의 대부분은 60세 이상이다. 고령은 AML에서 부정적 성과를 결정짓는 주된 요인이며, 집중 치료된 고령 AML 환자의 장기 생존율(5년)은 대략 10%이다. 유도 화학요법시 완화가 달성된 거의 모든 환자에서 3년 이내에 질환 진행이 관찰된다. 현재 완화 후 치료는 고령 AML 환자에서는 제한된 효과를 나타냈다. 따라서, 잔존 내성 백혈병이 유의한 로드로 잔류하며, 약물 내성 백혈병 세포의 생존한 하위집단이 빠르게 재발을 일으킨다. 완전한 완화를 유도하고 지속하기 위한 노력으로서 이런 화학요법 비-반응성 AML 종양 세포를 표적으로 하는 전체적으로 상이한 작용 방식을 가진 새로운 타입의 약물이 필요하다. 다수의 집중 화학요법을 조합하여 치료한 결과, 고령 AML 환자의 경우 50%를 초과하는 비유로 젊은 환자의 경우 약 80%의 비율로 완전 완화(CR)가 가능하지만, 여전히 반응이나 생존률의 발전을 위한 주요 연구 과제가 남아있다. AML을 가진 고령 환자를 대상으로 한 65건의 무작위 임상 시험(15,110명의 환자)의 최근 공개된 네트워크 메타 분석에서 수정된 연구 유도 섭생의 대부분은 다우노루비신과 시타라빈을 사용한 종래의 3+7 유도 섭생과 비교하여 유사하거나 심지어 악화된 효능 프로파일을 가진다. AML의 이 표준 치료는 높은 이환률 및 심지어 사망률과도 연관된다. CR시 대부분의 환자는 화학요법 후 잔존 백혈병 줄기세포로 인해 재발한다. 추가의 용량 강화는 허용되지 않는 독성으로 인하여 제한된다. 따라서, 특히 고령의 AML 환자에서 바람직하게 독성이 적은 새로운 치료 양식에 대한 긴급한 필요성이 대두되고 있다.

[0037] 화학요법 미반응 AML의 치료는 이중특이적 항체를 사용하여 환자 자신의 면역 시스템으로부터의 T 세포와 AML 종양 세포를 인게이징함으로써 달성될 수 있었다. 이 방식으로 환자의 면역 시스템이 강화되고 AML 종양 세포를 공격하는 것으로 목표가 바껴서 AML 종양 세포를 근절시킨다. 본 발명은 AML 종양 세포용해를 효과적으로 유도하는 CD3 x CLEC12A 이중특이적 IgG 항체를 제공한다. 따라서, CD3 x CLEC12A 이중특이적 항체는 AML 환자의 예후를 개선하기 위하여 백혈병 줄기세포를 특이적으로 근절하며 더 적은 부작용을 가진 표적 치료법이다. 백혈병 줄기세포(LSC)에서 CLEC12A가 발현되고 정상 조혈 줄기세포에서는 발현되지 않으므로 이 항원에 대해 지정된 치료법(시험관내 나타난 대로)은 정상 줄기세포를 남기면서 LSC를 근절시킬 것이다. 그것은 아마도 최소 잔존 질환(MRD)의 상황에서 최대한의 영향을 미칠 수 있을 것이다. 즉, MRD의 근절로 인해 재발 퍼센트가 떨어질 것으로 기대된다. 따라서, 이 새로운 치료 양식의 AML 환자에 대한 영향은 재발 퍼센트는 더 낮으면서 독성도 적은 치료로서, 더 나은 삶의 질과 관련된 개선된 성과를 가져올 것이다. 이들 전장 IgG 이중특이적 항체는 재발된 AML 환자에서 임상적으로 평가된다. 객관적 반응 기준으로 골수에서 AML 아세포 감소를 사용하여 임상 효과가 분석된다. AML에 대한 유효한 이중특이적 IgG는 현재 이용가능한 치료가 없는 대규모의 환자들에 신규의 치료적 선택사항을 제공한다. 지속적 완화를 달성하기 위한 수단을 제공하는 것에 더하여, 이 치료 선택사항은 또한 완화 동안 적용되었을 때는 AML에 대한 치유 잠재성을 가진다.

[0038] 실시예

[0039] 실시예 1

[0040] 후보 CD3xCLEC12 이중특이적 IgG1의 생성 및 기능적 특성화

[0041] 이중특이적 전장 IgG에 의해 면역 이펙터 세포를 이상 세포에 표적화하는 개념을 검증하기 위해 후보 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG1을 생성했는데, 이것의 CD3 및 CLEC12A Fab 팔은 이미 설명된 항체로부터 유래되었다. WO2005/118635에 개시된 CD3 Fab 팔에서 CD3-특이적 항체 중 하나인 항-CD3 항체 15C3로부터의 VH 영역이 사용되었고, 이 VH는 '3056'으로 언급된다. CLEC12A Fab 팔에서 WO2005/000894에 개시된 CLEC12A-특이적 항체 중 하나인 scFv SC02-357로부터의 VH 영역이 사용되었다(이후 'CLEC12A 벤치마크[Fab 팔 또는 항체]'로 명명한다; 또는 이 VH는 '3116'으로 언급된다). 후보 3056x3116으로 언급되는 이 후보 분자의 CD3 팔 (3056)의 VH의

뉴클레오티드 및 아미노산 서열과 CLEC12A 팔(3116)의 VH의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 도 20에 제공된다. 공통 VL(huVκ1-39; 012)의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열도 또한 도 20에 제공된다.

[0042] 재배열된 사람 IGKV1-39/IGKJ1(huVκ1-39) 경쇄와 함께, 각 VH 영역을 이중특이적 IgG1의 생성을 위한 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 발현 벡터에 클로닝했다(Gunasekaran et al. JBC 2010(285) 19637-19646; WO2009/089004). huVκ1-39는 하나보다 많은 중쇄와 쌍을 이룰 수 있는 것으로 이미 나타났으며, 이로써 다양한 규격의 항체를 생성하며, 이들은 이중특이적 분자의 생성을 촉진한다(De Wildt RM et al. J. Mol. Biol. 1999(285) 895-901; De Kruif et al. J. Mol. Biol. 2009(387) 548-58; WO2009/157771).

[0043] 먼저, 유세포계수법에 의해서 후보 3056x3116 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG1과 HPB-ALL 세포 상의 CD3ε의 결합을 증명했는데, 이것은 본 분야에 공지된 표준 과정에 따라서 수행되었다(표 1). 세포-발현된 CD3ε와의 결합은 CD3δ/ε 또는 CD3γ/ε로 트랜스펙션된 CHO 세포를 사용하여 확인된다. 후보 3056x3116 이중특이적 IgG1과 CLEC12A의 결합은 CLEC12A 발현 구성물로 트랜스펙션된 CHO 세포를 사용하여 결정했고, 대조군으로는 CD3 단일특이적 항체(3056x3056) 및 CLEC12A 단일특이적 항체(3116x3116), 뿐만 아니라 무관한 IgG1 이소타입 대조군 mAb을 선택했다.

표 1

[0044] 유세포분석법에 의한 세포-발현된 CD3 및 CLEC12A와의 결합

IgG	HPB-ALL 세포*	CLEC12A-트랜스펙션 CHO 세포*
후보 3056x3116 CD3XCLEC12A	6216	5299
CD3	6899	282
CLEC12A	199	4147
이소타입 대조군	34	289

[0045] * 결과는 평균 형광 강도로 주어진다.

[0046] CD3δ/ε 및 CLEC12A의 세포외 도메인에 대한 후보 3056x3116 이중특이적 IgG1의 친화성 측정을 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)에 의해서 결정한다. 간단히 말해, 정제된 재조합 항원을 자유 아민 화학을 사용하여 CM5 센서 칩의 표면에 공유 결합시킨다: 항원을 10μg/ml까지 kAc 버퍼로 희석하고, NHS/EDC로 활성화된 표면에 결합시킨다(제조자의 권고에 따른다). 이중특이적 항체에 존재하는 Fab 팔의 친화성을 결정하기 위해서, 이들을 Hepes 완충 식염수(HBS)로 100, 50, 20, 10, 1 및 0.1nM까지 연속 희석하고, 높은(30μl/분) 유속으로(재결합을 방지하기 위해) CM5 센서 칩의 항원-결합된 표면 위로 흘려보낸다. 플로우 셀 1(FC1)을 대조군(블랭크) 표면으로 사용하고, 이 표면에서 나온 반응(센서그램)을 다른 플로우 셀(FC)에서 측정된 반응으로부터 차감한다. FC2 및 FC3가 이중특이적 항체에 의해서 인식되는 두 상이한 항원에 대해 사용되며, 모든 세 표면에서 전개된 단일 반응역학에서 양쪽 Fab 팔의 친화성을 측정할 수 있다. 항원-결합된 표면 위를 흐를 때 항체의 농도는 유의하게 변하지 않으므로 이중특이적 항체의 온-레이트(이것은 농도 의존적이다)가 이들이 인식하는 두 상이한 항원에 대해 동시에 측정된다. 따라서, 상이한 이중특이적 단백질의 결합 및 해리 단계의 센서그램이 얻어진다. BIA 평가 소프트웨어와 1:1 상호작용 모델(1가 상호작용에 대해서)을 채용한 커브-피팅을 사용하여 Fab 팔의 친화성이 결정된다. 이중특이적 단백질과 센서 칩의 항원-코팅된 표면의 결합이 손상된 경우(즉, 낮은 반응 및/또는 매우 빠른 오프-레이트를 가져오는 매우 약한 단백질 결합일 때), 실험 셋업을 바꾼다: 이중특이적 항체를 자유 아민 화학을 사용하여 센서 칩의 표면에 공유 결합시키고, 재조합 정제된 항원을 높은(30μl/분) 유속으로 표면 위로 흘려보내서 이 항원에 지정된 Fab 팔의 친화성을 측정한다.

[0047] 다음에, 후보 3056x3116 CD3xCLEC12A 이중특이적 Ig의 기능성을 시험했다. 먼저, 건강한 도너의 휴지기 T-세포를 사용하여 T-세포 자극 능력을 조사했다. 간단히 말해, 서면동의를 받은 후 건강한 도너로부터 말초혈액을 얻었다. 표준 밀도 구배 분리에 의해서 T-세포를 분리하여 말초혈액 단핵 세포(PBMC)로 부화시키고, 이어서 자기 비드를 사용하여 음성 선택했다(범용 T-세포 키트, Miltenyi Biotec, cat. no. 130-091-155). 이 정제 전략을 사용할 때 T-세포는 소위 말하는 '비접촉'(즉, 항체에 의해서 염색되지 않은, 소위 말하는 '휴기지 T 세포')으로서 전-활성화의 가능성이 제한되었다. 이어서 정제된 휴지기 T-세포를 2일 동안 10:1의 이펙터:표적 세포 비에서 10% 태아 소 혈청(FBS) 또는 10% 정상 사람 혈청(HS) 중에서 백혈병-유래 HL60 셀라인으로부터의 세포와 함께 인큐베이션했다. 결과는 CD4-양성 또는 CD8-양성 T-세포 모집단 내에서 CD69-양성 또는 CD25-양성 세포의 퍼센트로 표시되었다.

[0048] 2가 CD3 IgG 및 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG는 모두 CD4-양성 또는 CD8-양성 T-세포 상에서 T-세포 활성화 마커인 CD69와 CD25를 효과적으로 유도했다(도 2). HL60 세포 상에 존재하는 Fc 수용체를 차단하지 않았은 FBS의 존재하에서(Liesveld et al. 1988, J. Immunol. 140(5), pages 1527-1533), 또한 대조군 이중특이적 분자 CD3X 이소타입 대조군 IgG가 T-세포 활성화를 유도하는 것으로 나타났다. 이런 효과는 HS의 존재시 감퇴되었으며, 이는 CD3X이소타입 대조군 IgG의 1가 CD3 결합에 의한 관찰된 T-세포 활성화가 Fc 가교결합에 의존했음을 시사한다. 그러나, 후보 3056x3116 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG에 의해서 유도된 T-세포 활성화는 단지 부분적으로만 Fc-상호작용에 의존했는데, CD69와 CD25를 상향조절하는 능력이 HS의 존재하에서도 상당히 유지되었기 때문이다(도 2). 이것은 1가 CD3 결합의 고유한 효능이, 나머지 Fab 팔과의 결합 후 결합 분자가 HL60 표적 세포 상의 CLEC12A 항원과 연결되었을 때 T-세포를 활성화하기에 충분했음을 시사했다.

[0049] 후보 3056x3116 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG에 의한 T-세포 활성화의 규모가 표적 세포용해를 유도하기에 충분한지의 여부를 조사하기 위해서, 이 분석에서 HL60 세포를 카복시플루오레세인 디아세테이트 석시미딜 에스테르(CFSE)로 표지하고, 다양한 이펙터:표적 세포 비에서 T-세포와 함께 공-배양했다. 1, 2 또는 3일 후, 생존한 CFSE-양성 HL60 세포를 유세포계수법에 의해서 정량했다. 결과는 PBS와 관련된 특이적 세포용해의 퍼센트로 표시되었다.

[0050] 예상된 대로, CD3 단일특이적 2가 IgG는 HL60 세포의 휴지기 T-세포 매개 사멸을 유도했다(도 3). 놀랍게도 CD3XCLEC12A 이중특이적 1가 IgG 및 대조군 CD3X이소타입 대조군도 또한 HL60 세포의 휴지기 T-세포 매개 사멸을 유도했다. 이들 효과는 과량의 사람 IgG의 부재하에 분석이 수행되었을 때, 즉 HL60 표적 세포 상의 Fc 수용체가 차단되지 않았을 때(FBS 상태; 도 3) 가장 우세했다. 놀랍게도 과량의 사람 IgG가 존재할 때도(10% HS 상태) CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG는 HL60 세포의 사멸에 있어서 매우 효과적이었으며, 이는 HL60 세포용해의 유도가 Fcγ 수용체 상호작용에 의존하지 않음을 시사한다. 제3일째에도 CD3X이소타입 대조군에 의해서 유도된 HL60 세포용해가 관찰되었는데, 아마도 연장된 인큐베이션 기간 동안 불완전한 Fc-감마 수용체 차단으로 인한 것같다. HL60 표적 세포 사멸은 상이한 이펙터:표적 세포 비에 따라 변했다(도 4).

[0051] 결론적으로, 이 실시예는 CD3xCLEC12A 이중특이적 분자가 T-세포 매개된 종양 세포용해의 효능있는 유도제인 것을 증명하며, 이상 세포의 효과적인 사멸을 위한 T 세포 맞물림이 CD3xCLEC12A 전장 IgG1 이중특이적 항체에 의해서 매개될 수 있다는 우리의 가설을 확인한다. 놀랍게도 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG에 의해서 유도된 활성은 Fcγ 수용체 상호작용에 의존하지 않는다. 최종 임상 후보에 도달하기 위하여 CD3XCLEC12A 이중특이적 전장 IgG의 패널을 확장시키고자 CD3 Fab 팔과 CLEC12A Fab 팔의 패널이 생성된다. CD3 및 CLEC12A Fab 팔의 특이성 및 기능성의 검증은 이 실시예에서 제시된 후보 3056x3116 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG로부터의 각 Fab를 사용하여 나머지 팔을 고정함으로써 행한다.

[0052] 실시예 2

[0053] CD3xCLEC12 bsAb에 대한 CD3 Fab 팔의 생성 및 특성

[0054] 실시예 1은 CD3xCLEC12A 이중특이적 분자가 T-세포 매개된 종양 세포용해의 효능있는 유도제일 수 있음을 나타냈다. 따라서, 이러한 이중특이적 분자들의 더욱 확장된 패널을 생성하기 위해서, CD3 결합제와 CLEC12A 결합제의 분리된 패널을 생성했다.

[0055] CD3 결합제의 패널을 생성하기 위하여, CD3ε을 가진 사람 중쇄(HC) 소유전자좌와 huVκ1-39 경쇄(WO2009/157771)에 대한 마우스 트랜스제닉의 면역화에 의해서 CD3ε-특이적 VH 영역을 다음의 다양한 형식으로 생성한다: (1) 애쥬번트를 사용하거나 사용하지 않고 본 분야에 공지된 담체 분자(사람 IgG-Fc 또는 His-tag와 같은)와 융합되거나 결합될 수 있는 분리된 CD3δ/ε 또는 CD3γ/ε, (2) CD3δ/ε 또는 CD3γ/ε를 발현하는 세포, 또는 (3) CD3δ/ε 또는 CD3γ/ε를 암호화하는 DNA 구성물, 또는 이들 전략의 조합. ELISA 및/또는 유세포분석법에 의해서 결정된바 충분한 항원-특이적 역가를 나타내는 면역화된 마우스의 경우, 비장 및/또는 림프절을 수거하여 그로부터 Fab 파지 라이브러리를 생성한다. 또는, VH 영역 서열이 비장 및 림프절 재료로부터 심층 서열화에 의해서 직접 유래된다(공-계류 US 가출원 61/539,116).

[0056] 항원-특이적 Fab 팔을 면역화된 마우스의 파지 라이브러리로부터 또는 huVκ1-39 경쇄의 VL 영역과 사람 VH 영역 집단을 함유하는 합성 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택한다. 합성 라이브러리의 생성을 위해서, 무작위화된 CDR3 프라이머를 De Kruif et al. 1995, J Mol Biol 248(1), pages 97-105에 설명된 대로 사용했다. 담체 분자(상기 참조) 또는 HPB-ALL와 같은 CD3ε 발현 세포나 D3δ/ε 또는 CD3γ/ε를 발현하도록 트랜스펙션

된 세포에 결합될 수 있는 분리된 CD3δ/ε 단백질과의 결합을 위하여 이들 라이브러리로부터 박테리오파지를 여러 번 선택하며, 이들 전략의 조합도 가능한다. 비-결합 파지를 제거하고, 결합 파지는 산성 버퍼로 용출시키거나, 또는 선택된 Fab 레퍼토리를 원하는 특이성으로 만들기 위해서 특이적 에피토프에 대한 항체, 예를 들어 사이노몰거스 CD3ε과 교차반응성인 항체로 용출시킨다. 다음에, 이들 파지를 파지-함유 박테리아에 대한 선택 압력하에 성장된 컴패턴트 박테리아로 트랜스펙션한다. 다수의 생존한 박테리아 콜로니를 선별한 후, 파지를 구제해서 다음번 선택 라운드로 보낸다.

[0057] 선택 완료 후, 나머지 파지를 유세포분석법에 의해서 세포-발현된 항원과의 결합에 대해, 그리고 ELISA에 의해서 분리된 항원과의 결합에 대해 스크리닝한다. 결합에 대한 양성 대조군으로 벤치마크 CD3 항체를 사용하며, 본 분야에 공지된 것으로 예를 들어 OKT-3가 있다. 항원-발현 세포와 특이적 결합을 나타낸 본질적으로 모든 파지로부터의 뉴클레오티드 재료를 콜로니 PCR로 보내서 VH 영역을 증폭시키고, 서열 PCR로 보내서 VH 영역 서열을 결정한다. 최종 서열을 이들의 HCDR3의 독창성에 기초하여 클러스터로 나눈다. 면역화된 마우스로부터 유래된 서열의 경우, (제한된) 체세포 초돌연변이가 일어날 수 있으며, VH 서열을 독창적 VDJ 확률에 기초하여 더 그룹화한다(즉, 상이한 클러스터에서 HCDR3가 <2 아미노산 차이를 나타낸다면 이들은 동일한 클러스터의 일부로 간주되어 함께 그룹화된다). 각 클러스터로부터 클러스터당 하나 또는 몇몇 VH 영역을 선택하여 huVκ1-39 경쇄와 함께 IgG 단일특이적 2가 형식으로의 발현을 위해 벡터로 클로닝한다. 분리된 항원 및 세포-발현된 항원과의 특이적 결합이 확인된 VH 영역은 이어서 CD3XCLEC12A 이중특이적 형식으로의 발현을 위해 벡터로 클로닝한다. 다음에, 치료적 잠재성을 가진 후보를 선택하기 위하여 이들을 특성화한다(이후 실시예 참조).

[0058] 실시예 3

[0059] CD3xCLEC12 bsAb에 대한 CLEC12 Fab 팔의 생성 및 특성

[0060] 실시예 1에서 CD3xCLEC12A 이중특이적 분자가 T-세포 매개된 종양 세포용해를 유도하는 효능을 가진다는 것이 증명되었으므로, 우리는 다음에 이러한 이중특이적 분자의 더욱 확장된 패널을 확립하고자 했다. 실시예 2에 설명된 CD3 결합제의 패널에 더하여, 우리는 또한 CLEC12A 결합제의 패널을 생성했다.

[0061] 간단히 말해, CLEC12A-특이적 Fab 팔을 재배열된 사람 IGKV1-39/IGKJ1 VL 영역과 사람 VH 영역 집단을 함유한 Fab 합성 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택했다(De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010(106)741-50). 이들 은행으로부터 박테리오파지를 CLEC12A와의 결합에 대해 두 번 선택했다. 이것은 표면에 코팅된 His-tag(Sino Biological, cat.no. 11896-H07H)과 결합된 CLEC12A의 세포외 도메인(아미노산 75 내지 275)과 함께 인큐베이션함으로써 행해졌다. 비-결합 파지를 제거하고, 결합 파지는 화학적으로 용출시켜, 파지-함유 박테리아에 대한 선택 압력하에 성장된 박테리아를 감염시키는데 사용했다. 다수의 생존한 박테리아 콜로니를 선별한 후, 파지를 구제해서 다음번 선택 및 증식 라운드로 보낸다.

[0062] 선택 완료 후, 나머지 파지를 유세포분석법에 의해서 종양 셀라인 HL60 상에서 발현된 CLEC12A와의 결합에 대해 스크리닝했다. 결합에 대한 양성 대조군으로 CLEC12A 벤치마크 항체를 사용했다. CLEC12A-발현 세포와 특이적 결합을 나타낸 본질적으로 모든 파지로부터의 뉴클레오티드 재료를 콜로니 PCR로 보내서 VH 영역을 증폭시키고, 서열 PCR로 보내서 VH 영역 서열을 결정한다. 최종 서열을 이들의 HCDR3의 독창성에 기초하여 클러스터로 나눈다. 각 독창적 HCDR3 클러스터로부터의 VH 영역을 IgG 단일특이적 또는 이중특이적 형식으로의 발현을 위해 재배열된 사람 IGKV1-39/IGKJ1 LC와 함께 벡터에 클로닝했다.

[0063] 독창적 HCDR3 서열을 가진 3개의 선택된 CLEC12A 결합 분자는 IgG 형식에서 원하는 프로파일을 나타냈는데, 이것은 다음의 특징들을 포함했다(표 2 및 데이터 나타내지 않음):

[0064] CLEC12A의 분리된 세포외 도메인과의 특이적 결합.

[0065] 종양 셀라인 상에서 발현된 CLEC12A와의 특이적 결합.

[0066] 사람 PBMC 상의 골수 계통-특이적 발현 패턴의 확인.

표 2

[0067] CLEC12A Fab 팔의 특성

Fab	CDR3 길이	코팅된 CLEC12A와의 결합*	CLEC12A-발현 세포와의 결합**	CLEC12A 벤치마크와 에피토프에 대한 경쟁***
CLEC12A 벤치마크	9	1.422	1467	-
3918	10	1.253	899	예
4327	9	1.307	1559	아니오
4331	9	1.328	1106	예

[0068] * ELISA에서 시험됨, 2㎍/ml로 코팅된 CLEC12A(Sino Biological)의 세포외 도메인, 결과는 광학 밀도로 주어진다(바탕 신호 이소타입 대조군: 0.127).

[0069] ** IgG 농도가 최적화된 HL60 세포 상에서 유세포분석법에 의해 시험됨, 결과는 평균 형광 강도로 주어진다(바탕 신호 이소타입 대조군: 116).

[0070] *** 20㎍/ml 벤치마크 IgG에 대해, Fab 형식을 사용하여 ELISA에서 시험됨.

[0071] 실시예 4

[0072] CD3xCLEC12 bsAb를 위한 기능적 CLEC12 Fab의 선택

[0073] 실시예 3에 설명된 대로 선택된 CLEC12A Fab 팔을 이어서 고정된 팔로서 새로운 CD3 Fab 팔을 가진 이중특이적 IgG 형식으로 발현시켰다. 이 새로운 CD3 Fab 팔은 '3896 CD3 IgG' 또는 간단히 '3896'라고 언급되며, huVκ1-39 경쇄를 또한 사용한다. 이 CD3-특이적 VH 후보 3896의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 도 20에 도시된다. 이로써 다양한 이중특이적 CD3XCLEC12A 분자들이 발현되었고, 모두 동일한 3896 항-CD3 팔을 가지며, CLEC12A 팔에 차이가 있었다(CLEC12A 벤치마크 팔, 또는 후보 CLEC12A Fab 팔 4327, 4331 또는 3918 중 어느 하나). 다음에, 이들 CD3XCLEC12A 이중특이적 분자들을 실시예 1에 설명된 대로 표적 세포용해 분석에서 기능적으로 시험했다. 결과는 이소타입 대조군과 관련된 특이적 세포용해의 퍼센트로 표시되었다. 후보 CLEC12A Fab 팔은 모두 이중특이적 형식에서 HL60 표적 세포의 용량-의존적 특이적 세포용해를 나타냈으며, CLEC12A 벤치마크 Fab 팔이 사용되었을 때보다 반응역학은 유사하거나 더 나았다(도 5).

[0074] 또한, CD3x이소타입 대조군 bsAb이 용량-의존적 표적 세포용해를 나타냈는데, 동일한 규모의 특이적 세포용해를 위해서는 1 로그 더 높은 농도가 필요했다. HS의 첨가를 통한 과잉의 사람 IgG의 존재에도 불구하고 이 1가 CD3 IgG의 사멸 활성은 여전히 분명했는데, 아마도 Fc-매개 가교결합에 의한 것같다. 실시예 7로부터 명백한바, 이 표적 비-특이적 세포용해는 실제로 CH2 조작에 의한 Fc 수용체 상호작용 침묵화를 통해서 완전히 없어질 수 있다.

[0075] 실시예 5

[0076] AML T 세포 및/또는 AML 종양 세포를 사용한 CD3xCLEC12 생성물 후보의 효능

[0077] 실시예 1 및 4는 건강한 도너의 휴지기 T 세포에 의해 매개된 HL60 표적 세포용해를 유도하는데 있어서 CD3 Fab 팔 3056 또는 3896을 사용하고, CLEC12A Fab 팔 후보 4327, 4331 또는 3918 또는 CLEC12A 벤치마크 Fab 팔 3116을 사용하여 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG의 효능을 증명했다. 이 실시예에서는 CD3XCLEC12A 이중특이적 약물의 치료적 적용이 주로 처방되는 사례 중 하나인 AML을 가진 환자로부터 유래된 T-세포가 CD3XCLEC12A 이중특이적 전장 IgG에 의한 자극시 종양 표적을 사멸시키도록 자극될 수 있는지의 여부를 조사한다. 다음에, 환자-유래 T-세포가 CD3XCLEC12A 이중특이적 전장 IgG에 의한 자극시 자기조직 AML 종양 세포 아세포를 사멸시킬 수 있는지의 여부를 결정한다.

[0078] 실시예 1에 설명된 과정에 따라서 AML 환자의 말초혈액으로부터 T-세포를 분리한다. 다음에, 정제된 환자-유래 T-세포를 CFSE-표지된 HL60 세포와 함께 인큐베이션하고, 실시예 1에 설명된 대로 세포용해에 대해 모니터한다.

[0079] 이에 더하여, T-세포 매개된 표적 세포용해 분석을 동일한 환자로부터 분리된 AML 종양 아세포를 사용하여 수행한다(Norde et al. Blood 2009(113)2312). 다음에, 분리된 아세포를 CFSE로 표지하고, Norde et al.에 설명된

사이토카인 혼합물의 존재하에, 그리고 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG 또는 대조군의 존재하에 자기조직 환자-유래 T-세포와 함께 공-배양한다. 표적 세포용해를 실시예 1에 설명된 대로 모니터한다.

[0080] 실시예 6

[0081] CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG와 접촉 후 T 세포에 의한 사이토카인 방출

[0082] T-세포 자극 생물학을 사용할 때 T-세포의 과잉자극은 심각한 위험인데, 이것은 사이토카인 방출 증후군을 초래할 수 있기 때문이다(Suntharalingam et al. 2006, New England J. Med. 355(10), pages 1018-1028; Chatenoud et al. 1990, Transplantation 49(4), pages 697-702). CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG에 의해 유도된 T-세포 자극의 규모를 조사하기 위해서, T-세포와 Fc 수용체-발현 표적 세포의 공-배양물에서 T-세포 사이토카인의 유도를 연구했다.

[0083] 간단히 말해, 건강한 도너의 휴지기 T-세포를 실시예 1에 설명된 대로 후보 3056x3116 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG(1μg/ml) 또는 대조군 IgG의 존재하에 HL60 표적 세포와 함께 공-배양했다. 2일 후 상청액을 샘플링하고, 사이토카인 생성 수준을 사람 사이토카인 휴먼 10-플렉스 패널(Invitrogen, cat.no.LHC0001)을 사용하여 본 분야에 공지된 대로 Luminex 분석에서 결정했다. 이 패널은 10개 주요 Th1 및 Th2 사이토카인을 아우른다.

[0084] 예상된 대로, CD3 단일특이적 2가 IgG는 사이토카인 방출 증후군을 주로 추진한다고 생각되는 IFNγ, TNFα 및 IL-2의 강한 생성을 유도했다(표 3). 이에 더하여, IL-4, IL-6, IL-8 및 IL-10의 생성도 CD3 IgG와 함께 인큐베이션함으로써 증가했다. 반면, CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG만이 CD3 IgG와 유사한 수준으로 IL-8 생성을 유도했고, 나머지 사이토카인들은 이중특이적 IgG에 의해서 유의하게 유도되지 않았다. GM-CSF는 어떤 조건에서도 검출 한계 이하였다.

표 3

[0085] T 세포에 의한 항체 유도된 사이토카인 방출

사이토카인	CD3 IgG	CD3XCLEC12A IgG	CD3X이소타입 대조군
IFNγ	484.3±155.0	13.5±19.1	0.0±0.0
TNFα	85.8±23.1	14.5±1.4	4.6±1.1
IL-2	285.6±325.5	3.4±0.8	1.7±0.6
IL-4	23.6±3.7	10.2±0.2	7.3±1.3
IL-6	9.0±1.8	3.7±0.3	2.3±0.0
IL-8	1567.8±5.2	1280.1±118.4	359.6±183.6
IL-10	531.5±224.0	21.1±3.0	3.7±4.0
IL-1β	4.4±0.4	3.3±0.1	2.5±0.1
IL-5	2.1±0.2	0.7±0.0	0.6±0.1

[0086] 결과는 2명 도너±표준편차(pg/ml 단위)로 사이토카인의 평균 농도로 주어진다.

[0087] 여기 나타낸 데이터는 상이한 CD3XCLEC12A 이중특이적 IgG 분자들의 유리한 치료적 프로파일을 시사하며, 이들은 CD3 IgG에서 관찰된 대로 잠재적으로 해로운 양의 전-염증성 사이토카인을 분비할 수 있는 T-세포의 촉발 없이 표적 세포용해(실시예 1 및 4)를 효능있게 유도한다.

[0088] 실시예 7

[0089] CD3XCLEC12A bsAb의 시험관내 효능에 대한 Fc 침묵화의 효과

[0090] 실시예 4에 나타낸 CD3X이소타입 대조군 bsAb에 의한 용량-의존적 표적 세포용해는 bsAb Fc 부분과 HL60 표적 세포 상의 Fc 수용체의 상호작용으로 인한 것이라고 제안되었다. 이러한 표적 비-특이적 세포용해는 또한 생체내에서도 표적 세포 또는 NK 세포와 같은 방관자 세포 상의 Fc 수용체와의 상호작용에 의해서 일어날 수 있으므로 bsAb의 Fc-매개 활성의 침묵화를 유도하기 위해서 CH2/하부 힌지 영역의 조작이 채용되었다.

[0091] 이를 위해서, 235G 236R 이중 돌연변이(DM; DM-Fc) 또는 234F 235E 331S 삼중 돌연변이(TM; TM-Fc)를 사용하여 두 가지 Fc 돌연변이 전략이 시험되었다. DM-Fc 또는 TM-Fc를 가진 CD3XCLEC12A bsAbs(3056x3116)를

생성하고, 야생형 Fc를 가진 bsAb와 동일한 강도로 유세포계수법에 의해서 CLEC12A-발현 세포와 결합하는지 확인했다(데이터 나타내지 않음). 다음에, 이들 bsAbs와 야생형의 CD3X이소타입 DM-Fc 및 TM-Fc 버전을 HL60 표적 세포용해 분석에서 시험했다(실시예 1 및 4 참조). 결과는 이소타입 대조군과 관련된 특이적 세포용해의 퍼센트로 표시했다.

[0092] DM 또는 TM에 의한 Fc 침묵화는 CD3XCLEC12A bsAb에 의해서 유도된 HL60 세포 특이적 세포용해의 규모에 영향을 미치지 않거나 아주 적은 영향을 미쳤다(도 6). 그러나, CD3X이소타입 대조군 bsAb의 경우, HL60 세포의 세포용해를 유도하는 효능이 TM에서 유의하게 감소되었고, DM에서는 심지어 더 감소되었다.

[0093] 이것은 CH2/하부 힌지 조작에 의한 Fc 침묵화가, 이펙터 세포를 효과적이며 특이적으로 동원하고, 정상 Fcɣ 수용체 발현 부속 세포에 의해 매개된 잠재적 비-특이적 면역 활성화를 감퇴시키는 이중특이적 CD3xCLEC12A IgG1 형식을 생성함으로써 이상 세포의 표적-특이적 사멸에 더욱 기여한다는 것을 증명한다.

[0094] 실시예 8

[0095] FcRn, CD16, CD32, CD64 및 C1q와의 결합에 대한 Fc-침묵화의 효과

[0096] WT Fc 또는 침묵화된 DM-Fc 또는 TM-Fc를 가진 후보 3056x3116 CD3XCLEC12A bsAb와 사람 FcRn의 결합이 Bio-Layer Interferometry(BLI, Octet QK, ForteBio)에 의해서 결정되었다. 간단히 말해, 정제된 CD3XCLEC12A WT Fc IgG1, DM-Fc IgG1 또는 TM-Fc IgG1을 실온에서 1.0mg/ml BSA pH 6.0(FcRn-결합 버퍼)을 함유하는 0.1M 포스페이트 버퍼/0.002% Tween 20 중에서 50μg/ml의 농도로 단백질 L 바이오센서(ForteBio, Cat no 18-5085)에 포착시켰다. 이어서 실온에서 FcRn-결합 버퍼 중에서 가용성 사람 FcRn(Sino Biological Inc, CT009-H08H)을 1μg/ml의 농도로 첨가했다. Octet QK 분석 소프트웨어를 사용한 데이터 분석은 ProtL 센서와 IgG 결합에 대한 정규화시 Fc가 DM 또는 TM 침묵화된 CD3XCLEC12A bsAb와 사람 FcRn의 후속 결합이 야생형 Fc-꼬리를 가진 CD3XCLEC12A bsAb와 비슷한 것을 나타냈으며(도 7), 따라서 Fc 침묵화는 FcRn 결합에 영향을 미치지 않았다.

[0097] Fc가 침묵화된 CD3XCLEC12A bsAb와 CD16, CD32 및 CD64의 결합이 Bio-Layer Interferometry(BLI, Octet QK, ForteBio)에 의해서 결정되었다. 간단 프로토콜: 정제된 CD3XCLEC12A WT Fc IgG1, DM-Fc IgG1 또는 TM-Fc IgG1을 실온에서 1x 키네틱 버퍼(ForteBio 18-5032) 중에서 50μg/ml의 농도로 Protein L 바이오센서(Forte Bio, Cat no 18-5085)에 포착시킨다. 이어서 실온에서 키네틱 버퍼(ForteBio 18-5032) 중에서 재조합 CD16(Sino Biological Inc, 10389-H08H1), CD32(Sino Biolog-ical Inc, 10374-H08H) 및 CD64(Sino Biological Inc, 10256-H08H) 단백질을 1.0μg/ml의 농도로 첨가한다. FcR 수용체와 bsAb의 결합을 Octet QK 분석 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[0098] Fc가 침묵화된 CD3XCLEC12A bsAb와 사람 C1q의 결합을 포착 ELISA에 의해서 결정한다. 이를 위해서, 정제된 CD3XCLEC12A WT Fc IgG1, DM-Fc IgG1 또는 TM-Fc IgG1을 4℃에서 Nunc-Immuno maxisorp F96 플레이트(Nunc, 439454) O/N 상에서 PBS 중에서 25-0.012μg/ml의 농도 범위로 코팅한다. 이어서 사람 C1q(Quidel, A400)를 ELISA 버퍼(2% MILK/PBST) 중에서 2.0μg/ml로 첨가한다. 다음에, 이 복합체를 양-항-사람 C1q 다중클론 IgG(Meridian, K90020C) 및 토끼-항-양 HRP 콘쥬게이트된 다중클론 IgG(Southern Biotech, 6150-05)를 사용하여 시각화한다. 마지막으로, TMB 기질(BD 51-2606KC/51-2607KC)을 사용하여 결합을 전개시키고, 마이크로플레이트 리더(Multiskan EX, Thermo Electron Corporation)를 사용하여 DO450을 정량한다.

[0099] 실시예 9

[0100] CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG의 생체내 효능의 평가

[0101] CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG1을 사용한 시험관내 발견을 확인하고 확장하기 위해서 루시페라제 발현 HL60 세포(HL60(-Luc) 세포)를 사용한 동물 이종이식편 연구가 수행된다. 더 구체적으로, 이들 연구는 유효 용량에서 정류 상태 혈장 농도를 결정하기 위해 수행되며, 이것은 제1기 임상 평가를 위한 출발 용량을 설정하는데 있어서 고려될 것이다. 이를 위해서, NOD/SCID 마우스(또는 비슷한 면역-손상 마우스)에 생육성 HL60(-Luc)의 일정량을 피하 주사하며, 그 결과 주사 후 2주 이내에 대부분의 동물에서 피하 HL60 종양이 확립된다. HL60(Luc) 접종과 병행해서, 또는 초기 종양이 생기면 5x10E6 또는 1x10E7 사람 PBMC를 투여한다. CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG 또는 대조군 단일특이적 또는 대조군 이중특이적 IgG를 PBMC 투여 제1일, 및 3, 6 및 9일 후에 몇몇 용량 수준으로 피하 투여한다. 초기 HL60(Luc) 접종 후 1주째에 종양 치수를 기록한다. 각 그룹으로부터 종양 치수

(종양 부피로서 또는 총 생체발광으로서 표시된다)의 산술 평균을 시간에 대해 그래프로 작성한다.

[0102] 실시예 10

[0103] Ia/Ib 기 연구에서 이중특이적 전장 IgG1 항체 CD3xCLEC12A의 사용

[0104] 마지막 선두의 CD3xCLEC12A 이중특이적 전장 IgG1 후보를 사용하여 GMP 등급 물질을 제조하고 AML 환자에서 임상 평가한다. 먼저, 제품 후보의 공식 비-임상 안전성 분석을 수행하여 사람 연구에서 먼저 안전한 출발 용량을 확립한다. 이후, 오픈-라벨, 다중-센터 용량 확대 Ia//b 기 시험을 재발된 및/또는 난치성 AML과 집중 치료에 부적합한 환자에서 수행하여 정맥내 투여시 CD3xCLEC12A 이중특이적 IgG의 안전성 및 관용성을 조사한다. 2차 종점은 약동학적 및 약역학적 특성화와 예비 효능 분석을 포함한다. 골수에서 AML 아세포 감소를 평가하여 전체 반응 비율을 평가한다. Ia 기에서 단일/다중 용량 확대시 최대 관용 용량(MTD)를 평가한다. 중간 PK 분석 후, 연구의 1b 기 부분에 MTD에서 용량 확장 코호트를 포함시키거나, 또는 투약 빈도의 추가 조사를 포함시킨다.

[0105] 실시예 11

[0106] T 세포 증식을 유도하는 CD3xCLEC12A bsAb의 능력

[0107] AML을 가진 환자에서 진단시 T 세포의 수는 AML 아세포의 양과 비교하여 적다. T 세포는 활성화되면 증식하고, 그 결과 T 세포의 수가 증가된다는 것이 잘 알려져 있다. 또한, 실시예 1에서 우리는 CD3xCLEC12A bsAb가 T 세포를 활성화할 수 있고, T-세포 매개 종양 세포용해를 유도하는 효능을 가진다는 것을 증명했다. 우리는 CD3xCLEC12A bsAb로 치료된 AML 환자는, T 세포 증식이 이펙터 T 세포의 수를 증가시킬 것이기 때문에 CD3xCLEC12A 이중특이적 분자 매개 T 세포 활성화시 T 세포 하위군의 확장으로부터 이익이 있을 것이라고 가정했다. CD3xCLEC12A bsAb가 시험관내 T 세포 증식을 유도한다는 것을 증명하기 위해서, 휴지기 T 세포를 정제하고, 카복시플루오레세인 디아세테이트 석시미딜 에스테르(CFSE)로 표지해서 CD3xCLEC12A bsAb 또는 대조군 Abs의 존재하에 자기조직 CLEC12A+ 단핵구와 함께 공-배양했다. 비-특이적 Fc 감마 활성화가 없는 CD3xCLEC12A 유도된 T 세포 증식을 구체적으로 조사하기 위해서, 실시예 7 및 8에 설명된 대로 DM-Fc 테일을 가진 CD3xCLEC12A bsAbs를 사용했다. 대조군으로 CD3x이소타입 대조군 WT-Fc bsAb, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb, WT-Fc를 가진 단일클론 CD3 및 무관한 이소타입 대조군(WT-FC를 가진 IgG)이 포함되었다. 건강한 도너의 말초혈액으로부터 단핵구와 T 세포를 표준 밀도 구배 분리에 의해서 분리하여 말초혈액 단핵 세포(PBMC)로 부화시키고, 이어서 CD14 마이크로비드(사람 CD14 마이크로비드, Miltenyi Biotec, cat.no. 130-050-201)를 사용하여 단핵구에 대해 CD14 양성 선택을 행하고, 다른 백혈구에 대한 자기 비드를 사용하여 비접촉 T 세포의 음성 선택을 행했다(범용 T 세포 분리 키트, Miltenyi Biotec, cat.no. 130-096-535). 범용 T-세포 분리 키트는 T 세포의 전-활성화의 가능성을 피하면서 휴지기(비접촉) T 세포(즉, 항체로 염색되지 않은)의 분리를 허용한다.

[0108] 이어서 CFSE-표지된 정제된 휴지기 T 세포를 7일 동안 5:1의 이펙터:표적 세포 비율에서 10% 정상 사람 혈청(HS)을 가진 배지 중에서 정제된 단핵구 및 BsAbs와 함께 인큐베이션했다. 제7일째에 T 세포 증식에 대한 판독으로서 CFSE 신호의 감소를 유세포분석법에 의해서 측정했다. 결과는 히스토그램에서 CD3+, CD3+CD4+ 또는 CD3+CD8+ T 세포당 CFSE 신호로 표시되었다.

[0109] 양성 대조군 CD3 WT-Fc Ab는 T 세포 증식을 유도했지만, WT-Fc를 가진 이소타입 대조군 IgG은 T 세포 증식을 유도하지 않았다(도 8). 예상된 대로, CD3x이소타입 대조군 WT-Fc bsAb는 T 세포 증식을 유도했지만, 2가 단일특이적 항-CD3 IgG 대조군과 비교했을 때 더 적은 규모였다. 반면, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb는 침묵화된 Fc-테일로 인하여 T 세포 증식을 유도하지 않았다. CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb도 원하는 T 세포 증식을 유도했으며, 이것은 CD3와 CLEC12A 항원을 특이적으로 가교함으로써 매개된다.

[0110] 이것은 CD3xCLEC12A bsAb가 이미 증명된 대로 T 세포 매개 종양 세포용해의 표적 특이적 유도가 가능할 뿐만 아니라, 표적 특이적 T 세포 증식을 효능있게 유도함으로써 T 세포의 수를 증가시킬 수 있다는 나타낸다. 또한, 이것은 더 나아가 CH2/하부 힌지 조작에 의한 Fc 침묵화는 이상 세포의 표적-특이적 사멸에 기여할뿐만 아니라 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb IgG에 의한 T 세포 증식의 표적-특이적 유도에도 기여한다는 것을 증명한다.

[0111] 실시예 12

[0112] AML 환자로부터 TEMRA 하위군의 CD3xCLEC12A 유도된 확장의 평가

[0113] T 세포 증식의 활성화가 CD3xCLEC12 DM-Fc bsAb에서 증명되었으므로 우리는 다음에 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb가 AML 환자에서 CD8+ 세포독성 T 세포 구획의 증식을 유도할 수 있는지의 여부를 조사하고자 했다. CD8+ 세포독성 T 세포는 종양 퇴행을 매개하는 주요 이펙터로서 인식되었다(Sluijter et al., 2010). CD8+ T 세포는 4개 하위군으로 나눠질 수 있다: 나이브(CCR7+CD45RA+), 중심 기억(TCM, CCR7+ CD45RA-), 이펙터 기억(TEM, CCR7-CD45RA-), 및 CD45RA+ 이펙터 기억(TEMRA, CCR7-CD45RA+) 세포. 연구들은 나이브 및 기억 CD8+ T 세포 하위군이 TCR 자극에 반응하여 증식하고 분화하는 상이한 능력을 가진다는 것을 나타냈다(Geginat et al., 2003).

[0114] 먼저, 임상적 완화 단계에 있는 AML 환자의 말초혈액 중의 CD8+ 구획을 건강한 도너와 비교하여 분석했다. 이를 위해서, PBMC를 표준 밀도 구배 분리에 의해서 AML 환자와 건강한 도너로부터의 냉동된 말초혈액 샘플로부터 분리했다. 다음에, PBMCs를 CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA 및 CD45RO 항체로 염색해서 유세포분석법에 의해서 CD8+ T 세포 하위군에 대해 분석했다. 결과는 총 CD8+ T 세포 구획 중 하위군의 퍼센트로 표시되었다.

[0115] 이미 설명된 것과 유사하게, 나이브 CD8+ T 세포 하위군은 건강한 개체의 나이브 CD8+ T 세포 하위군과 비교하여 AML 환자의 혈액에서 감소되고, 반면 TEMRA 구획(CCR7-CD45RA+)은 건강한 도너와 비교하여 AML 환자에서 증가한 것이 관찰되었다(도 9).

[0116] 다음에, AML 환자 T 세포 구획의 종양 표적 특이적 T 세포 증식을 연구하기 위한 실험을 수행했다. 더 구체적으로, 이들 실험은 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb가 AML 환자의 나이브 CD8+ T 세포에 비해서 AML 환자의 이펙터 T 세포 하위군(TEM 및 TEMRA)의 성장과 T 세포 증식을 증진시킬 수 있는지를 결정하기 위해 수행된다.

[0117] 이를 위해서, 임상적 완화 단계에 있는 AML 환자로부터 휴지기 T 세포를 실시예 11에 따라서 정제한다. 제0일째에 CD8+ T 세포 하위군의 조성을 CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA 및 CD45RO 항체를 사용한 PBMC 염색과 이후 유세포분석법 분석에 의해서 분석한다. 이에 더하여, 휴지기 T 세포를 CFSE로 표지하거나 표지하지 않고(CFSE 표지화는 실시예 11에 설명된 대로이다), 7일 동안 대조군 또는 시험 항체와 함께 E:T 비 5:1에서 HL60 백혈병 세포와 함께 공-배양했다. CFSE 표지된 T 세포는 T 세포 증식의 정량에 사용되고, 표지되지 않은 T 세포는 증식된 T 세포 하위군의 퍼센트 결정에 사용된다. CFSE-표지 및 미표지 T 세포를 PBS, 이소타입 대조군 WT-Fc Ab, CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb 및 WT-Fc를 가진 CD3 단일클론 Ab 1㎍/ml와 함께 인큐베이션했다. 7일 후, CFSE 표지된 T 세포를 CD3, CD4 및 CD8 항체로 염색하고 FACS 분석하여 절대 T 세포 수와 세포분할 수를 결정했고, 미표지 CFSE T 세포는 CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA 및 CD45RO 항체로 염색해서 유세포분석법에 의해서 증식된 CD8+ T 세포 하위군의 조성을 결정했다. T 세포 증식은 히스토그램에서 T 세포 하위군당 CFSE 신호로 표시되며, 4개의 CD8+ T 세포 하위군의 크기는 총 CD8+ T 세포 구획 내의 퍼센트로 표시된다.

[0118] 실시예 13

[0119] AML 환자 T 세포 매개된 종양 세포용해를 유도하는 CD3xCLEC12A bsAb의 효능

[0120] 실시예 1에서 CD3xCLEC12A bsAb가 건강한 도너로부터의 휴지기 T 세포에 의한 CLEC12A-양성 HL60 세포의 사멸을 유도할 수 있다는 것이 증명되었다. 다음에, 우리는 AML 환자 T 세포의 표적-특이적 활성화를 유도하는 CD3xCLEC12A bsAb의 능력과 HL60 세포의 AML 환자 T 세포 매개된 사멸을 유도하는 그것의 능력을 조사했다.

[0121] 실시예 11에서 설명된 대로 범용 T-세포 분리 키트를 사용하여 임상적 완화 단계에 있는 AML 환자(AML FAB 분류 AML-M1/M2, M4 또는 M5)의 냉동된 말초혈액으로부터 T 세포를 분리했다. 이어서 정제된 AML 환자 유래된 휴지기 T 세포를 5:1의 이펙터:표적 세포 비로 10% 정상 HS로 보충된 배지 중에서 CSFE-표지된 HL60 세포와 함께 2일 동안 PBS, 이소타입 대조군 WT-Fc Ab, CD3xCLEC12A DM-Fc, CD3x이소타입 DM-Fc, 및 양성 대조군 CD3 WT-Fc Ab의 존재하에 인큐베이션했다(모든 항체는 1㎍/ml의 농도로). 공-배양 2일 후, T 세포 활성화를 CD3, CD4, 및 CD25에 대한 유세포계수 분석에 의해서 결정했다. 이들 결과는 CD4+ T 세포당 CD25+ 세포 퍼센트로 표시되었다. 또한, 생존한 CFSE-양성 HL60 세포를 유세포계수법에 의해서 정량했다. 결과는 IgG에 대한 특이적 세포용해의 퍼센트로 표시되었다.

[0122] 이들 데이터는 건강한 도너와 AML 환자 T 세포의 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb에 의해서 매개된 항원-특이적 활성화가 비슷했음을 나타낸다(도 10A). 예상된 대로, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb는 건강한 도너나 AML 환자 유

래된 T 세포에서 T 세포 활성화를 유도하지 않았다. AML 환자 유래된 T-세포에 의한 HL60 세포의 CD3 xCLEC12A DM-Fc bsAb 매개된 세포용해(68% HL60 세포용해)는 건강한 도너의 T 세포에 의한 것(69% HL60 세포용해, 도 10B)과 비슷한 것이 증명되었다. 예상된 대로, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb는 AML 환자 T 세포나 건강한 도너의 T 세포에 의해서 HL60 세포의 사멸을 유도하지 않았다. 따라서, CD3xCLEC12A 이중특이적 분자는 이들 T 세포가 AML 환자 유래이든 건강한 도너 유래이든 무관하게 T 세포 매개된 종양 세포용해의 효능있는 유도제이다.

[0123] CD3xCLEC12A bsAb는 AML 환자 T 세포에 의한 HL60 종양 세포의 효능있는 세포용해를 유도하는 능력을 갖는 것으로 나타났으므로 이어서 AML T 세포의 특이적 활성화를 표적으로 하는 CD3xCLEC12A bsAb의 능력을 평가했다. 이에 더해서, AML 환자 유래된 자기조직 T 세포에 의한 1차 CLEC12A-양성 AML 아세포의 세포용해를 유도하는 CD3xCLEC12A bsAb의 능력을 결정했다. 먼저, 유세포분석법 분석에 의해서 결정된 1차 AML 아세포의 >70%를 함유하는 진단 샘플에서 AML 환자로부터의 냉동 보관된 골수 샘플을 해동하고, 이미 설명된 대로(Norde et al., 2009) 10% FCS, 100ng/ml GM-CSF, 100ng/ml G-CSF, 50ng/ml IL-3, 25ng/ml SCF 및 20ng/ml Flt3L로 보충된 IMDM 배지 중에서 하룻밤(O/N) 배양했다. O/N 배양 후, 1차 AML 아세포를 유세포분석법에 의해서 CLEC12A, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD33, CD34, CD38, CD45 및 CD117의 표면 발현에 대해 표현형을 정하고 CFSE로 표지했다. 환자의 임상적 완화가 달성되었을 때 수집된 휴지기 자기조직 환자 유래 T 세포를 실시예 11에 설명된 대로 범용 T-세포 분리 키트를 사용하여 말초혈액으로부터 분리했다. 이어서 AML 아세포를 2일 동안 10% HS를 가진 배지 중에서 5:1의 E:T 비율로 휴지기 자기조직 T 세포와 함께 공-배양했다. 시험된 조건은 PBS, 이소타입 대조군 Ab WT-Fc, CD3xCLEC12A DM-Fc, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc 및 양성 대조군 CD3 WT-Fc Ab(모든 항체 1㎍/ml)를 포함했다. 공-배양 2일 후, T 세포 활성화를 CD3, CD4, CD8 및 CD25에 대한 유세포분석법 분석에 의해서 결정했다. 이들 결과는 CD4+ 또는 CD8+ AML T 세포당 CD25+ 세포의 퍼센트로 표시되었다. AML 아세포의 세포용해를 유세포분석법에 의해서 생존한 CFSE+/CD45low 이중 양성 AML 아세포를 정량하여 결정했다. 결과는 IgG에 대한 특이적 아세포의 세포용해의 퍼센트로 표시되었다.

[0124] 이들 데이터는 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb가 단일클론 CD3 WT-Fc 양성 대조군 Ab와 비슷한 AML T 세포의 AML 아세포 표적 특이적 활성화를 유도하는 능력을 가진다는 것을 증명한다(도 11A/B). 또한, 이들 데이터는 AML 환자-유래 T 세포에 의한 자기조직 AML 아세포의 CD3xCLEC12A bsAb 유도된 효능있는 사멸이 단일클론 CD3 WT-Fc 양성 대조군 Ab에 의해 유도된 사멸만큼 효능있음을 증명한다(도 11C). 예상된 대로, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc Ab는 AML 아세포 사멸을 유도하지 않거나 약간 유도했는데, 이것은 CD3xCLEC12A bsAb에 의해서 매개된 관찰된 AML 아세포 사멸이 주로 T 세포의 항원-특이적 활성화와 CLEC12A+ AML 종양 세포의 특이적 세포용해의 결과임을 시사한다. 종합하면, 이 연구는 CD3xCLEC12A bsAb가 AML 환자 T 세포에 의한 CLEC12A 양성 종양 세포의 사멸을 효과적으로 유도할 수 있다는 것을 증명한다.

[0125] 실시예 14: 비-특이적 사이토카인 방출에 대한 Fc-침묵화의 효과

[0126] 실시예 7 및 8에서 CH2/하부 힌지 조작에 의해서 침묵화된 Fc(DM-Fc)를 가진 CD3xCLEC12A bsAb IgG1 형식이 Fc 감마 수용체에 대한 감소된 친화성을 가져왔으며, 백혈병-유래 HL60 셀라인의 비-특이적 Fc 수용체 매개 세포독성을 없앴다는 것이 증명되었다. 다음에, DM-Fc 침묵화를 가진 bsAb IgG1 형식이 NK 세포와 같은 Fc 수용체-양성 방관자 세포의 존재하에 비-특이적 Fc 수용체 매개 세포독성을 없애는지의 여부를 조사했다. 이 연구에서, 자기조직인 건강한 도너 유래된 휴지기 T 세포가 NK 세포와 같은 다른 Fc 수용체 양성 방관자 선천성 이펙터 세포의 존재하에 CLEC12A-양성 단핵구에 대해 재지정되었다. 이를 위해서, 건강한 도너로부터의 헤파린화된 말초혈액으로부터 밀도 구배 원심분리에 의해서 PBMC를 분리하고, $1x10^{-6}$ 세포/ml의 밀도로 평판했다. PBMC를 PBS, 이소타입 대조군 Ab, CD3xCLEC12A WT-Fc bsAb, CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, CD3x이소타입 대조군 WT-Fc bsAb, CD3x이소타입 대조군 DM-Fc bsAb 또는 WT-Fc를 가진 CD3 단일클론 Ab의 존재하에 10% FBS를 가진 배지에서 2일 동안 배양했다. 2일 배양 후, 생존한 단핵구를 CD14-발현에 기초하여 유세포분석법에 의해서 정량했다. 결과는 IgG와 관련된 특이적 세포용해의 퍼센트로 표시되었다.

[0127] CD3xCLEC12A 이중특이적 항체의 경우, DM-Fc 영역의 존재를 통한 Fc 침묵화만이 단핵구 세포용해에 약간의 효과를 가졌다는 것이 증명되었다(도 12). 반면, CD3x이소타입 대조군 bsAb의 경우, DM-Fc 영역의 존재를 통한 Fc 침묵화는 단핵구의 비-특이적 세포용해를 유의하게 감소시켰다. 따라서, CD3xCLEC12A bsAb에서 Fc 침묵화는 표적-특이적 사멸에 더욱 기여한다는 결론이 내려진다: CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb는 T 세포를 특이적으로 동원하고, 정상 Fcγ 수용체 발현 부속 세포에 의해서 매개된 비-특이적 면역 활성화를 감퇴시킨다.

[0128] 다음에, 부속 세포에 의해 야기된 항체 요법에 의한 흔한 임상 사례인 사이토카인 방출 증후군(CRS)와 관련된다고 알려진, CD3xCLEC12A bsAb에서 DM 돌연변이에 의한 Fc 침묵화가 사이토카인의 Fc 수용체-매개 방출을 없애는지의 여부가 조사되었다. 이를 위해서, 도 13에 설명된 단핵구 사멸 분석의 상청액에서 사이토카인 프로파일을 제조자의 지시에 따라서 Luminex 플랫폼(Invitrogen, LHC0001)에서 사이토카인 사람 10-플렉스 패널을 사용하여 분석했다. 다음의 사람 사이토카인들의 프로파일이 제2일 상청액에서 측정되었다: GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 및 TNF-α. 나타낸 결과는 pg/ml로 측정된 사이토카인 농도를 가진다. GM-CSF, IL-4 및 IL-5 사이토카인의 수준은 이 분석의 검출 한계 이하였다(데이터 나타내지 않음).

[0129] 이 데이터는 WT-Fc 테일을 가진 CD3xCLEC12A 및 CD3x이소타입 대조군 bsAb가 모두 IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-2 및 IFN-γ의 방출을 유도했음을 나타낸다(도 13). 그러나, IL-8을 제외하고 DM-Fc 테일을 지녔을 때는 CD3xCLEC12A 및 CD3x이소타입 대조군 bsAb에서 이들 사이토카인이 발견되지 않거나 매우 낮은 수준으로만 발견되었다. 단핵구가 IL-8의 주 공급원이므로 높은 IL-8 수준은 세포용해된 단핵구로부터 방출된 것이지 a-특이적 FcR 매개 방출의 결과는 아닌 것으로 가정된다. bsAb IgG 형식에서 DM 돌연변이를 통한 Fc 침묵화는 CRS와 관련된 IL-1b, IL-6, TNF-α, IL-2 및 IFN-γ 사이토카인의 Fc 수용체 매개 방출을 유의하게 제거한다는 결론이 내려진다. 종합하면, 이들 데이터는 CH2/하부 힌지 영역에서 DM 돌연변이에 의한 Fc 침묵화가 정상 Fcγ 수용체 발현 부속 세포에 의해서 매개된 잠재적 비-특이적 면역 활성화와 전염증성 사이토카인의 관련된 방출을 감퇴시킴으로써 CD3xCLEC12A DM-bsAb에 의한 이펙터 세포의 효능 및 특이적 동원의 증진에 기여한다는 것을 증명한다.

[0130] 실시예 15

[0131] 멤브레인 결합된 CD3에 대한 전장 2가 단일클론 항-CD3 IgG인 후보 3896의 결합이 CD3 발현 HPB-ALL 세포를 사용한 FACS 분석에 의해서 전장 2가 단일클론 항-CD3 IgG인 후보 3056과 비교되었다. 무관한 사람 IgG1을 이소타입 대조군 IgG로 사용했다. 본 분야에 공지된 표준 과정에 따라서 유세포계수법을 수행했다. 도 14A에 나타낸 대로, 3896 CD3 IgG는 HPB-ALL 세포 상의 CD3와 용량 의존적으로 결합했으며, 3056 CD3 IgG도 마찬가지였다.

[0132] 다음에, T-세포 증식을 유도하는 3896 CD3 IgG의 능력이 뮤린 OKT3 CD3 항체, 3056 CD3 IgG, 및 이소타입 대조군 IgG와의 직접 비교에서 시험되었다. 간단히 말해, 항체를 연속 희석하고 96-웰 플레이트 위에 고정시켰다. 미결합 IgG를 제거한 후, CFSE-표지된 T 세포를 첨가하고 37℃에서 인큐베이션했다. 제5일째에 유도된 T 세포 증식 수준을 유세포계수법에 의해서 분석했다. 결과는 생육성 T 세포의 퍼센트로 표시되는데, CFSE 발현 수준에 적어도 2배 감소를 나타내고, 이것은 도 14B에 도시된다. 2가 단일특이적 항체인 3896 CD3 IgG는 후보 3056 CD3 IgG 및 뮤린 OKT3과 비교하여 T 세포 증식 유도에 있어서 효능이 적은 것으로 증명되었다. 이들 데이터는 3056 CD3 IgG와 비교했을 때 3896에 의해 유도된 T 세포 증식의 감소된 수준이 유세포계수법에 의해서 분석된 감소된 CD3 결합 능력을 반영한다는 것을 시사한다. 결합에 있어서 이런 차이는 원하는 친화성을 가진 팔을 선택하는 것을 허용하며, 그 결과 CD3와 CLEC12A에 대한 결합 친화성 사이에 유리한 균형을 나타내는 이중특이적 항체가 얻어지고, 이로써 T 세포와 CLEC12A-양성 AML 종양 세포가 함께 효과적으로 모이며, CLEC12A-양성 AML 종양 세포의 T 세포 매개된 세포용해가 최적으로 유도된다.

[0133] CD3xCLEC12A 이중특이적 항체 형식에서 3056 항-CD3 팔에 대한 새로운 3896 항-CD3 팔의 효능을 시험하기 위해서, 실시예 4의 3896xCLEC12A 벤치마크 이중특이적 항체(후보 3896x3116)와 실시예 1의 3056xCLEC12A 벤치마크 bs 항체(후보 3056x 3116)를 이미 설명된 대로 HL60 세포독성 분석에서 직접 비교했다. 결과는 도 15에 나타낸다. 3896xCLEC12A 벤치마크 bsAb는 3056xCLEC12A 벤치마크 bsAb와 유사한 효능을 갖는 것이 관찰되었다. 이로써 두 이중특이적 항체는 CD3 Fab 팔에만 차이가 있고 CLEC12A Fab 팔은 동일하므로 CD3xCLEC12A 이중특이적 Ab에서 3896 CD3 Fab 팔의 기능성은 3056 CD3 Fab 팔의 기능성과 유사하다는 결론이 내려진다. 더 낮은 농도에서는 후보 3896x3116이 후보 3056x3116보다 훨씬 더 낫다는 것이 주지된다. 이것은 앞서 본원에 설명된 대로 더 넓은 치료적 창을 제공하므로 유리하다.

[0134] 실시예 16

[0135] 실시예 3에서 CLEC12A-특이적 Fab 팔의 패널을 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택했다. 모든 CLEC12A 결합 분자들은 huVk1-39 경쇄를 함유했다. 3개의 CLEC12A 결합 분자가 선택되었다: Fabs 3918, 4327 및 4331.

이들 Fab는 전장 사람 IgG1: 3918 CLEC12A IgG, 4327 CLEC12A IgG 및 4331 CLEC12A IgG로 표시되었다.

[0136] 3918 CLEC12A IgG의 VH, 4327 CLEC12A IgG의 VH, 4331 CLEC12A IgG의 VH 및 공통 VL(IGKV1-39; 012)의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 도 20에 제공된다.

[0137] 전장 CLEC12A 항체들을 HL60 세포에 의해서 발현된 CLEC12A와의 결합에 대해 시험했다.

[0138] 3918 CLEC12A IgG, 4327 CLEC12A IgG 및 4331 CLEC12A IgG와 멤브레인 결합된 CLEC12A의 결합을 CLEC12A 발현 HL60 세포를 사용한 FACS 분석에 의해 CLEC12A 벤치마크 항체(3116)과 비교했다. 무관한 사람 IgG1을 이소타입 대조군 IgG로 사용했다. 본 분야에 공지된 표준 과정에 따라서 유세포계수법을 수행했다. 도 16에 나타낸 대로, 4327 CLEC12A IgG는 CLEC12A 벤치마크 항체와 유사한 방식으로 CLEC12A와 결합했다. 또한, 나머지 두 항체 3918 CLEC12A IgG와 4331 CLEC12A IgG도 HL60 세포 상에서 CLEC12A와 우수한 용량-의존적 결합을 증명했다. CLEC12A와의 이들의 결합은 CLEC12A 벤치마크 항체와 비교하여 다소 낮은 것으로 보인다. 결론적으로 Fabs 3918, 4327 및 4331은 우수한 CLEC12A 결합 팔이다.

[0139] 실시예 17

[0140] 3896 CD3 Fab 팔 및 CLEC12A Fab 팔 3981, 4327 또는 4331을 함유하는 이중특이적 분자들이 기능적인지의 여부를 시험했다.

[0141] 이를 위해서, 3896 CD3 Fab 팔의 VH 서열 및 CLEC12A 벤치마크 항체, 3918 CLEC12A Fab, 4327 CLEC12A Fab 또는 4331 CLEC12A의 VH 영역을 재배열된 huVκ1-39 경쇄와 함께 이중특이적 IgG1 생성을 위한 본 분야에 공지된 방법(Gunasekaran et al., WO2009/089004)을 사용하여 발현 벡터에 클로닝해서 이중특이적 항체 3896 xCLEC12A 벤치마크, 3896x3918, 3896x4327 및 3896x4331를 얻었다.

[0142] 이들 이중특이적 항체들을 이미 설명된 HL60 세포독성 분석에서 기능성에 대해 시험했다. 두 명의 건강한 도너로부터의 휴지기 T 세포(HD1 및 HD2)를 E:T 비 5:1에서 또는 10% HS의 존재하에 48시간 다양한 농도의 이중특이적 항체의 존재하에 CFSE-표지된 HL60 세포와 공-배양했다. 생존한 CFSE-양성 HL60 세포를 제2일째에 유세포계수법에 의해 정량했다. 도 17의 결과는 특이적 세포용해 퍼센트로 표시되었다. 도너 1로부터의 T 세포(HD1; 도 17 상부 패널)와 도너 2의 T 세포(HD2; 도 17 하부 패널)을 사용한 두 개별 실험에서, 모든 이중특이적 항체는 고 농도로 인큐베이션되었을 때 3896xCLEC12A 벤치마크 이중특이적 항체만큼 효능있다는 것이 증명되었다.

[0143] 특히 이중특이적 항체의 더 낮은 농도에서는 3896x4327와 3896x4331 이중특이적 항체들이 3896xCLEC12A 벤치마크 이중특이적 항체보다 더 효능있다는 것이 관찰되었다는 점이 중요하다. 이로써 이들 이중특이적 항체들은 CLEC12A Fab 팔에만 차이가 있고 CD3 Fab 팔은 동일하므로 4327 및 4331 CLEC12A Fab 팔의 기능성은 CLEC12A 벤치마크 Fab 팔과 비교하여 더 효능있다는 결론을 내릴 수 있다. 3896xCLEC12A 벤치마크 이중특이적 IgG에 대해 3896x 4327과 3896x4331 사이에서 관찰된 차이는 이들 신규의 항-CLEC12A Fab 팔의 결합 친화성의 차이를 반영할 수 있거나, 또는 이들은 상이한 CLEC12A 에피토프를 표적으로 하여 종양 세포와 CD3 발현 T 세포의 더욱 효과적인 가교결합을 허용할 수 있다는 의미이다.

[0144] 실시예 18

[0145] 실시예 2에서 CLEC12A 벤치마크 항체의 Fab 단편에 대한 Fab 형식으로 ELISA에서 시험되었을 때 CLEC12A 상에서 에피토프와의 결합에 대해 CLEC12A Fabs 3918과 4331이 경쟁한 것이 증명되었다. 그러나, 4327 CLEC12A Fab는 이 분석에서 결합에 대해 CLEC12A 벤치마크 IgG와는 경쟁하지 않았다(표 2).

[0146] 이 실험에서는 4327 CLEC12A IgG의 전장 IgG가 CLEC12A와의 결합에 대해서 CLEC12A 벤치마크 항체와 경쟁했는지의 여부를 시험했다. 간단히 말해, HL60 세포를 20분 동안 얼음 위에서 50μg/ml로 1차 항체와 함께 예비 인큐베이션했다. 이어서 오레곤 그린(OG)-표지된(Invitrogen, cat.no. A10476) 2차 항체를 1차 항체가 더해진 세포에 1μg/ml로 첨가했다(OG-표지된 IgG의 첨가 후 1차 항체의 농도 ~45μg/ml). 20분 후 세포를 세척하고 FACS로 분석했다.

[0147] 결과는 도 18에 나타내며, 4327 CLEC12A IgG와 CLEC12A 벤치마크 IgG가 CLEC12A와의 결합에 대해 경쟁한다는 결론이 내려졌다. 이것은 IgGs가 모두 CLEC12A 항원 상에서 밀접하게 관련된 에피토프와 결합하거나, 또는 이들이 입체장해로 인하여 IgGs 둘 다의 동시 결합을 허용하지 않는 상이한 에피토프와 결합한다는 것을

시사한다.

[0148] 실시예 19

[0149] 앞서 실시예에서 CLEC12A Fab 팔 4327, 4331, 3918 및 3116이 CD3xCLEC12A 이중특이적 형식에서 CLEC12A에 대한 우수한 결합제이며, T 세포 매개 사멸의 효능있는 유도제라는 것이 증명되었다. 지금까지 이중특이적 항체는 면역글로불린 중쇄 이종이량화를 추진하는 공지된 방법을 사용하여 얻어졌다(Gunasekaran et al.).

[0150] 공-계류 US 및 PCT 출원(US 정규출원 NO: 13/866,747 및 PCT/NL2013/050294; 참고자료로 본원에 포함된다)에서 우리는 단일 세포로부터 이중특이적 항체를 생산하는 방법 및 수단을 개시했는데, 이로써 단일특이적 항체의 형성에 비해서 이중특이적 항체의 형성을 선호하는 수단이 제공된다. 이들 방법은 또한 본 발명에도 유리하게 채용될 수 있다. 구체적으로, 본질적으로 이중특이적 전장 IgG 분자만을 생성하는 바람직한 돌연변이는 제1 CH3 도메인에서 아미노산 치환 L351K 및 T366K (Kabat에 따라서 넘버링)('KK-변이체' 중쇄)와 제2 CH3 도메인에서 아미노산 치환 L351D 및 L368E('DE-변이체' 중쇄)이거나, 또는 그 반대의 경우이다. 공-계류 US 13/866,747 및 PCT/NL2013/050294 출원에서 DE-변이체 및 KK-변이체가 우선적으로 짝지어져 이종이량체(소위 말하는 'DEKK' 이중특이적 분자)를 형성한다는 것이 이미 증명되었다. DE-변이체 중쇄(DEDE 동종이량체) 또는 KK-변이체 중쇄(KKKK 동종이량체)의 동종이량화는 동일한 중쇄 사이의 CH3-CH3 계면에서 하전된 잔기들 사이의 강한 반발로 인하여 일어나기 어렵다.

[0151] CD3xCLEC12A 이중특이적 분자의 효과가 이종이량화를 위한 공지된 돌연변이(Gunasekaran) 또는 DEKK 돌연변이에 의해 영향받지 않는다는 것을 증명하기 위해서, DE-변이체 및 KK-변이체 중쇄를 사용하여 상이한 중쇄들의 이종이량화를 추진해서 CD3xCLEC12A 이중특이성을 만들었다. 이에 더하여, CH2/하부 힌지 이중 돌연변이(L235G 및 G236R; DM)를 이들 DE- 및 KK-변이체 중쇄에 도입했다. 이들 결과의 이중특이적 분자의 Fc 테일은 'DM DEKK'로 언급된다.

[0152] 간단히 말해, 3116, 4327 또는 4331 CLEC12A Fab 팔의 VH 영역을 DE-변이체 + DM 중쇄를 함유하는 발현 벡터에 클로닝했고, 3056 CD3 항체의 VH 영역을 KK-변이체 + DM 중쇄를 함유하는 발현 벡터에 클로닝했으며(US 정규출원 NO: 13/866,747 및 PCT/NL2013/050294), 이들 발현 벡터를 재배열된 사람 IGKV1-39/IGKJ1(huVκ1-39) 경쇄를 암호화하는 핵산 분자와 함께 숙주 세포에 제공했고, 이로써 숙주 세포는 이중특이적 항체를 발현하여 생산했다. 이어서 최종 3056x3116 DM DEKK, 3056x4327 DM DEKK 및 3056x4331 DM DEKK 이중특이적 항체들을 이미 설명된 대로 HL60 세포독성 분석에서 효능에 대해 시험했다. 결과가 도 19에 도시되며, 모든 변이체에서 효과적인 종양 세포용해가 여전히 가능한 것이 증명되었고, 따라서 DM과 DEKK 돌연변이가 종양 세포용해를 유도하는 능력을 유지하면서 CD3xCLEC12A 이중특이적 항체의 Fc 영역에 도입될 수 있다는 결론이 내려졌다.

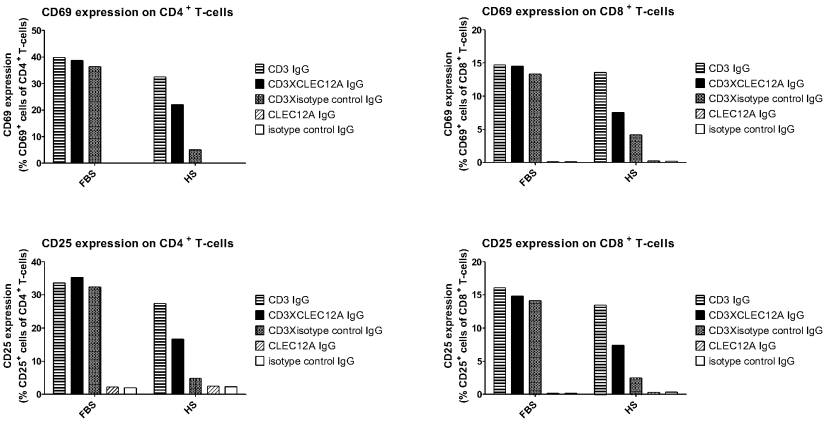
도면

도면1

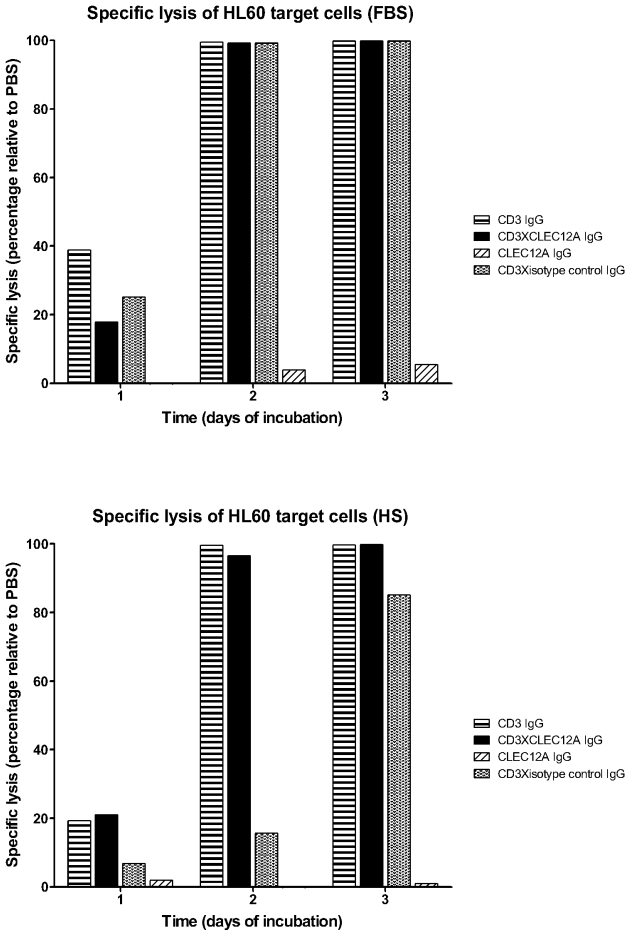
CLL-1: predicted aa sequence Bakker et al.2004
KLRL1: translated aa sequence Han et al.2004 (= Zhang/Cao group; deposited under no. AF247788)
MICL: predicted aa sequence Marshall et al.2004 (deposited under no. AY498550)
DCAL-2: predicted aa sequence Chen et al.2006 (= E.A. Clark group deposited under no. AY426759)
CLEC12B: Predicted aa sequence H.F. Clark et al. 2003 (deposited under no. AY358810)

```
KLRL1      ----------MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIGLGVLASMFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
MICL       ----------MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIGLGVLASMFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
DCAL-2     ----------MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIGLGVLASMFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
CLL-1      MWIDFFTYSSMSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLLIGLGVLASMFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
CLEC12B    ----------MSEEVTYATLTFQDSAGARNNRDGNNLRKRGHPAPSPIWRHAALGLVTLCLMLLIGLVTLGMMFLQISNDINSDSEKLSQLQKT

KLRL1      SEELQRNISLQLMSNMNI-------SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLS-DDVQTWQESKMACAAQNAS
MICL       SEELQRNISLQLMSNMNI-------SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLS-DDVQTWQESKMACAAQNAS
DCAL-2     SEELQRNISLQLMSNMNI-------SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLS-DDVQTWQESKMACAAQNAS
CLL-1      SEELQRNISLQLMSNMNI-------SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLS-DDVQTWQESKMACAAQNAS
CLEC12B    IQQQQDNLSQQLGNSNNLSMEEEFLKSQISSVLKRQEQMAIKLCQELIIHTSDHRCNPCPKMWQWYQNSCYYFTTNEEKTWANSRKDCIDKNST

KLRL1      LLKINNKNALEFIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLYVQYYHCTYKQRMICEKMANPVQL
MICL       LLKINNKNALEFIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLYVQYYHCTYKQRMICEKMANPVQL
DCAL-2     LLKINNKNALEFIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLYVQYYHCTYKQRMICEKMANPVQL
CLL-1      LLKINNKNALEFIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQL
CLEC12B    LVKIDSLEEKDFLMSQPLLMFSFFWLGLSWDSSGRSWFWEDGSVPSPSLFSTKELDQINGSKGCAYFQKGNIYISRCSAEIFWICEKTAAPVKT

KLRL1      GSTYFREA
MICL       GSTYFREA
DCAL-2     GSTYFREA
CLL-1      GSTYFREA
CLEC12B    EDLD----
```

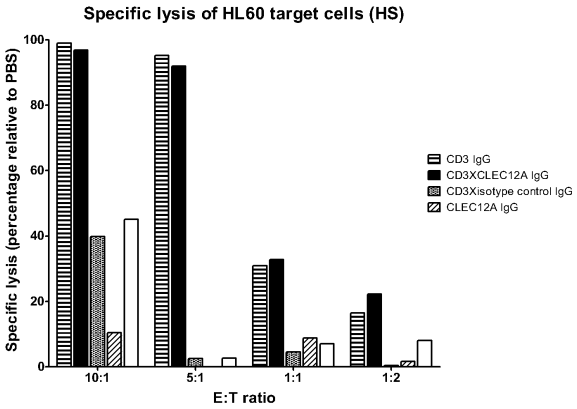
도면2


CD69 expression on CD4 + T-cells
CD69 expression (% CD69+ cells of CD4+ T-cells)
CD69 expression on CD8 + T-cells
CD69 expression (% CD69+ cells of CD8+ T-cells)
CD25 expression on CD4 + T-cells
CD25 expression (% CD25+ cells of CD4+ T-cells)
CD25 expression on CD8 + T-cells
CD25 expression (% CD25+ cells of CD8+ T-cells)
FBS
HS
CD3 IgG
CD3XCLEC12A IgG
CD3Xisotype control IgG
CLEC12A IgG
isotype control IgG

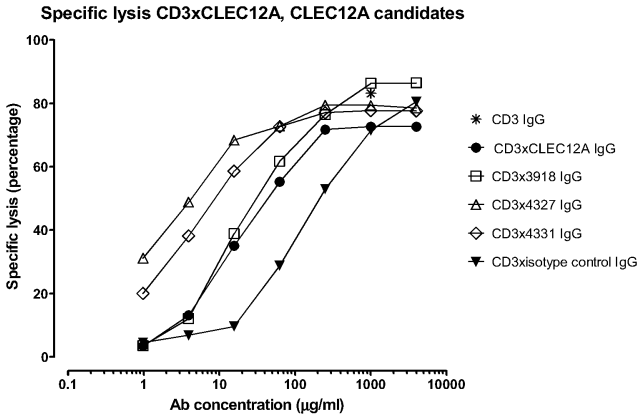
도면3


Specific lysis of HL60 target cells (FBS)
Specific lysis (percentage relative to PBS)
Time (days of incubation)
CD3 IgG
CD3XCLEC12A IgG
CLEC12A IgG
CD3Xisotype control IgG
Specific lysis of HL60 target cells (HS)
Specific lysis (percentage relative to PBS)
Time (days of incubation)
CD3 IgG
CD3XCLEC12A IgG
CLEC12A IgG
CD3Xisotype control IgG

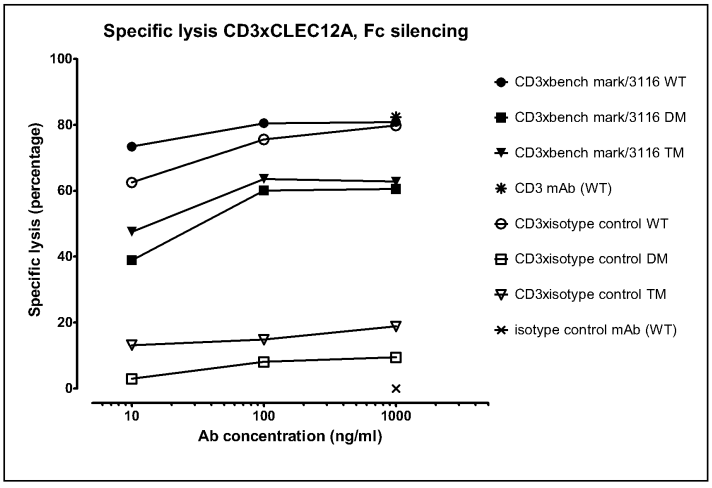
도면4


Specific lysis of HL60 target cells (HS)
Specific lysis (percentage relative to PBS)
100
80
60
40
20
0
10:1
5:1
1:1
1:2
E:T ratio
CD3 IgG
CD3XCLEC12A IgG
CD3Xisotype control IgG
CLEC12A IgG

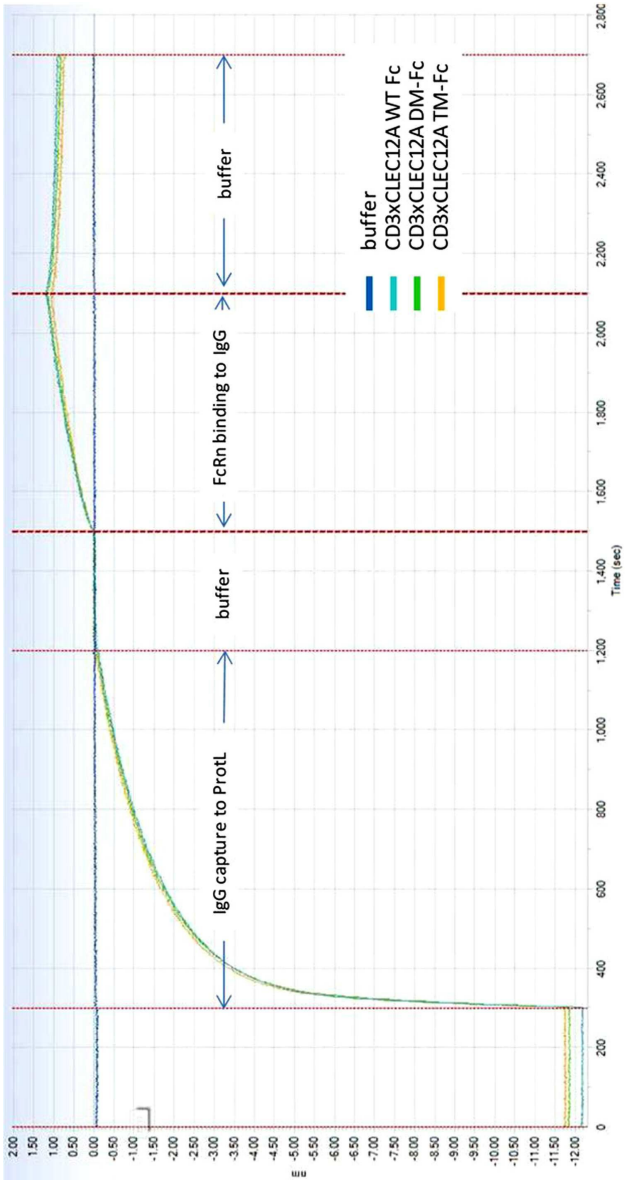
도면5


Specific lysis CD3xCLEC12A, CLEC12A candidates
Specific lysis (percentage)
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
10000
Ab concentration (µg/ml)
CD3 IgG
CD3xCLEC12A IgG
CD3x3918 IgG
CD3x4327 IgG
CD3x4331 IgG
CD3xisotype control IgG

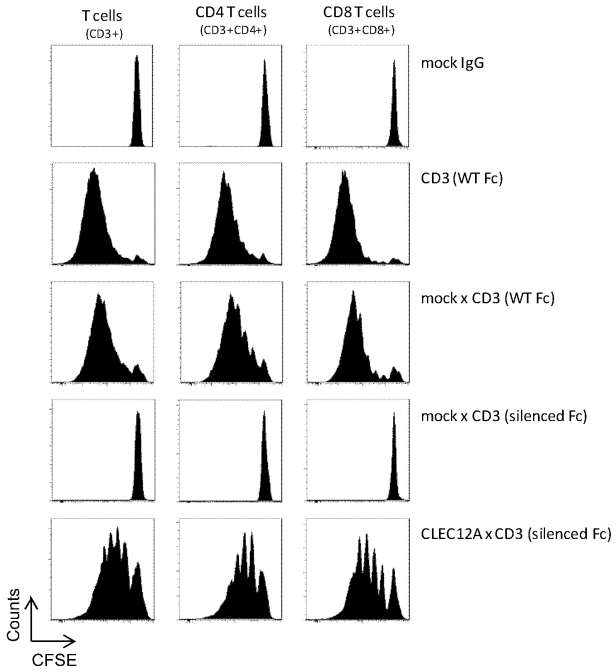
도면6


Specific lysis CD3xCLEC12A, Fc silencing
Specific lysis (percentage)
100
80
60
40
20
0
10
100
1000
Ab concentration (ng/ml)
CD3xbench mark/3116 WT
CD3xbench mark/3116 DM
CD3xbench mark/3116 TM
CD3 mAb (WT)
CD3xisotype control WT
CD3xisotype control DM
CD3xisotype control TM
isotype control mAb (WT)

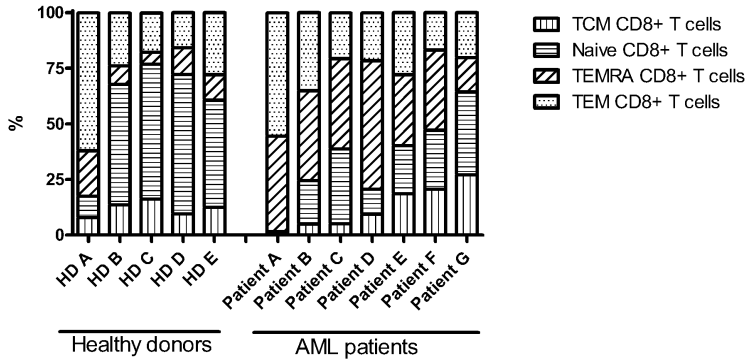
도면7


buffer
CD3xCLEC12A WT Fc
CD3xCLEC12A DM-Fc
CD3xCLEC12A TM-Fc
buffer
FcRn binding to IgG
buffer
IgG capture to ProtL
nm
Time (sec)

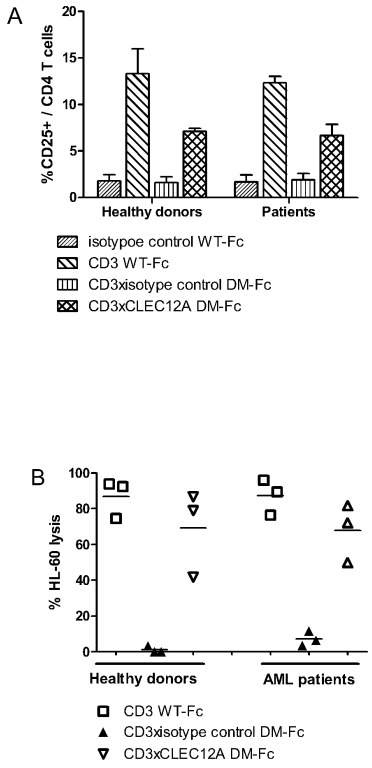
도면8


T cells
(CD3+)
CD4 T cells
(CD3+CD4+)
CD8 T cells
(CD3+CD8+)
mock IgG
CD3 (WT Fc)
mock x CD3 (WT Fc)
mock x CD3 (silenced Fc)
CLEC12A x CD3 (silenced Fc)
Counts
CFSE

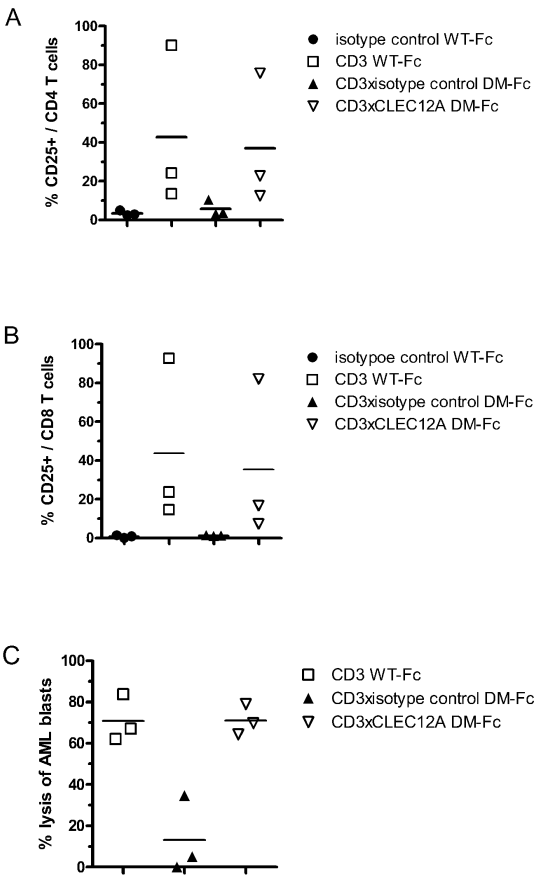
도면9


100
75
50
25
0
%
HD A
HD B
HD C
HD D
HD E
Patient A
Patient B
Patient C
Patient D
Patient E
Patient F
Patient G
Healthy donors
AML patients
TCM CD8+ T cells
Naive CD8+ T cells
TEMRA CD8+ T cells
TEM CD8+ T cells

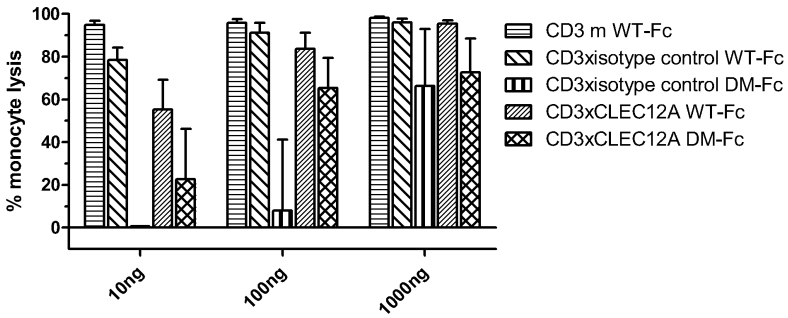
도면10


A
% CD25+ / CD4 T cells
20
15
10
5
0
Healthy donors
Patients
isotypoe control WT-Fc
CD3 WT-Fc
CD3xisotype control DM-Fc
CD3xCLEC12A DM-Fc
B
% HL-60 lysis
100
80
60
40
20
0
Healthy donors
AML patients
CD3 WT-Fc
CD3xisotype control DM-Fc
CD3xCLEC12A DM-Fc

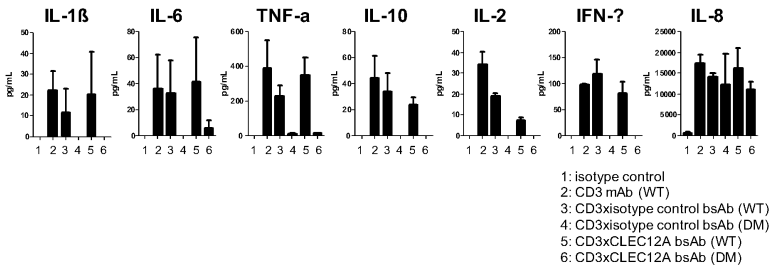
도면11



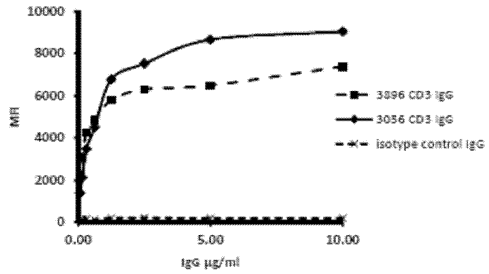
도면12



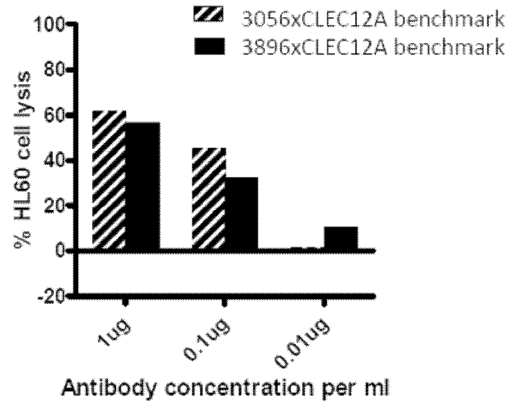
도면13



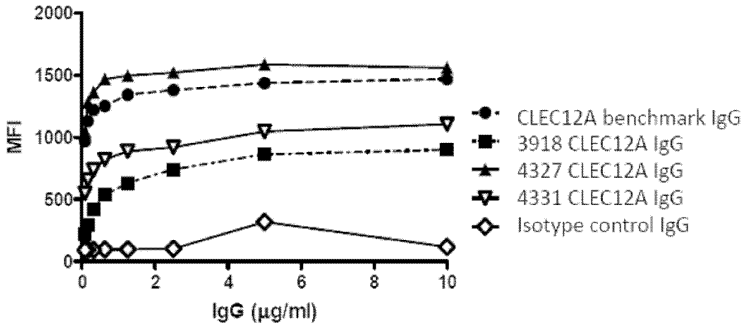
도면14



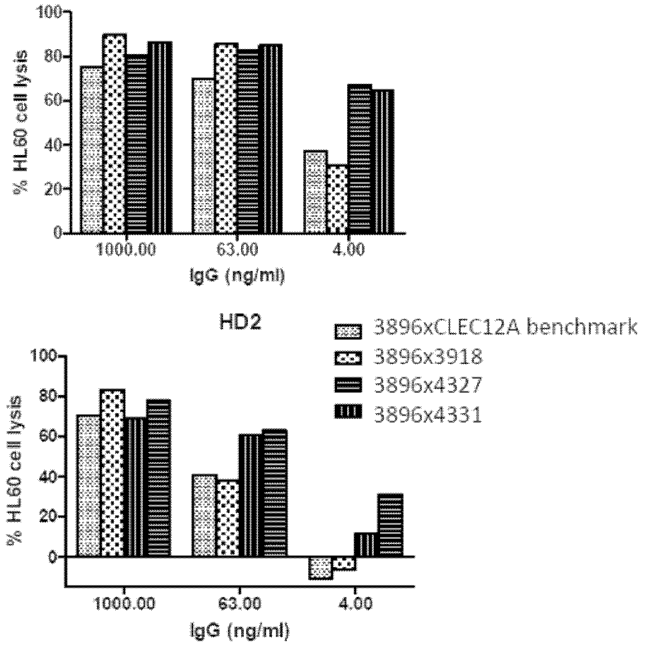
도면15



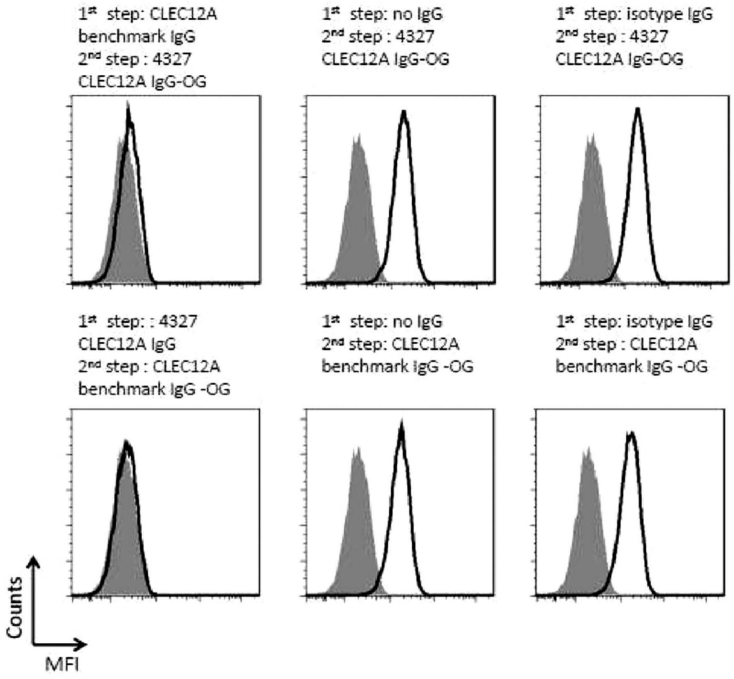
도면16



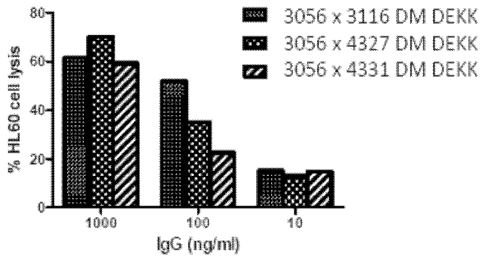
도면17


% HL60 cell lysis
100
80
60
40
20
0
1000.00
63.00
4.00
IgG (ng/ml)
HD2
3896xCLEC12A benchmark
3896x3918
3896x4327
3896x4331
% HL60 cell lysis
IgG (ng/ml)

도면18


1st step: CLEC12A benchmark IgG
2nd step : 4327 CLEC12A IgG-OG
1st step: no IgG
2nd step : 4327 CLEC12A IgG-OG
1st step: isotype IgG
2nd step : 4327 CLEC12A IgG-OG
1st step: : 4327 CLEC12A IgG
2nd step : CLEC12A benchmark IgG -OG
1st step: no IgG
2nd step: CLEC12A benchmark IgG -OG
1st step: isotype IgG
2nd step : CLEC12A benchmark IgG -OG
Counts
MFI

도면19



도면20a

3056

VH (VDJ):

caggtgcagctggtgcagtctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgtgg
ccagcggcttcaccttcagcagctacggcatgcactgggtccgccaggcccctggcaagggactggaatg
ggtggccgccatctggtacaacggcggaagcaggactacgccgacagcgtgaagggccggttcaccatc
agccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctccgggccgaggacaccgccgtgt
actactgtacccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccagggcaccctggtcaccgtctc
cagt

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**AIWYNGRKQDYADSVKG**RFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR**GTGYNWFDP**WGQGTLVTVSS

VL/O12 (VJ):

Gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggca
agtcagagcattagcagctacttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgct
gcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatc
agcagtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccctccaacgttcggccaa
gggaccaaggtggagatcaaac

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPPT**FGQGTKVEIK

3896

VH:

caggtgcagctggtggagtctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgccg
ccagcggcttcaccttcagaagctacggcatgcactgggtccgccaggcccctggcaagggactggaatg
ggtggccatcatctggtacagcggcagcaagaagaactacgccgacagcgtgaagggccggttcaccatc
agccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctccgggccgaggacaccgccgtgt
actactgtgcccggggcaccggctacaattggttcgacccttggggccagggcaccctggtcaccgtctc
cagt

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFR**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**IIWYSGSKKNYADSVKG**RFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GTGYNWFDP**WGQGTLVTVSS

VL:

O12

도면20b

CLEC12A BENCHMARK (3116)

VH:

caggtgcagctgcaggaatctggacccggactggtcaagcccagcgagacactgagcctgacctgtgtgg
tgtccggcggcagcatcagcagcagcaattggtggtcttgggtccgacagccccctggcaagggcctgga
atggatcggcgagatctaccacagcggcagccccgactacaaccccagcctgaagtccagagtgaccatc
agcgtggacaagagccggaaccagttcagcctgaagctgagcagcgtgacagccgccgataccgccgtgt
actactgcgccaaagtgtccaccggcggctttttcgactactggggccagggcacactggtcaccgtctc
cagt

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVV**SGGSISSSN**WWSWVRQPPGKGLEWIG**EIYHSGS**PDYNPSLKSRVTI
SVDKSRNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAK**VSTGGFFDY**WGQGTLVTSS

VL:
O12

3918

VH:

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
cttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctaacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggccgtgt
attactgtgcaagagatggttacttcgctgacgcctttgattattggggccaaggtaccctggtcaccgt
ctccagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA**SGYTFTGY**YMHWVRQAPGQGLEWMG**WINPNSGG**TNYAQKFQGRVTM
TRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR**DGYFADAFDY**WGQGTLVTVSS

VL:
O12

4327

VH:

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaagg
catctggatacaccttcaccagctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaaagggcactactggtgattggtttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgtctc
cagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA**SGYTFTSY**YMHWVRQAPGQGLEWMG**IINPSGGS**TSYAQKFQGRVTM
TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAK**GTTGDWFDY**WGQGTLVTVSS

도면20c

VL:
O12

4331

VH:

gaggtccagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaagg
catctggatacaccttcaccagctactatatgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaaggggcaattatggtgatgagtttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgtctc
cagt

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA**SGYTFTSY**YMHWVRQAPGQGLEWMG**IINPSGGS**TSYAQKFQGRVTM
TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GNYGDEFDY**WGQGTLVTVSS

VL:
O12