



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149438
(43) 공개일자 2024년10월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7031819
- (22) 출원일자(국제) 2023년02월26일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년09월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2023/054762
- (87) 국제공개번호 WO 2023/161457
국제공개일자 2023년08월31일
- (30) 우선권주장
22159045 2022년02월27일 유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하
독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
- (72) 발명자
바우만, 크리스토프
오스트리아 2345 브룬 암 게비르주 터너스트라쎄 19아/1
쿠엔첼레, 클라우스-피터
오스트리아 2331 비센도르프 오르츠스트라쎄 90 아/3/3
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 18 항

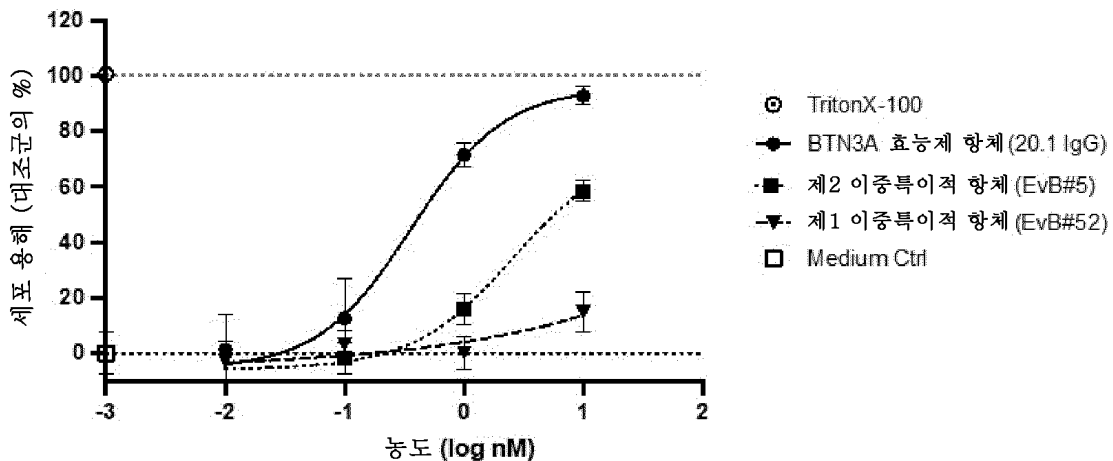
(54) 발명의 명칭 CD277 및 종양-항원에 대한 이중특이적 항체

(57) 요약

본 발명은 CD277 및 인간 종양-항원에 결합하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 이중특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항체를 생산하는 방법 및 질환 치료에서 이러한 항체를 사용하는 방법 및 그의 치료적 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도9b

종양 항원 음성 세포 (CRISPR KO)



(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

오베르크, 한스-하인리히

독일 25105 키엘 빌헬름샤페너스트라쎄 16

파이프, 마티아스

독일 22083 함부르크 훔볼트스트라쎄 19아

베쉬, 다니엘라

독일 24105 키엘 빌헬름샤페너스트라쎄 16

쿠마, 샌디프

미국 06877-0368 코네티컷 릿지필드 릿지버리 로드
900 피.오. 박스 368 베랑거 잉겔하임 유에스에이
코포레이션 리갈 아이피 브이피 내

파나바스, 타다스

미국 06877-0368 코네티컷 릿지필드 릿지버리 로드
900 피.오. 박스 368 베랑거 잉겔하임 유에스에이
코포레이션 리갈 아이피 브이피 내

사마트, 니콜라스

독일 55216 잉겔하임 암 라인 빙거 스트라쎄 173
베랑거 잉겔하임 인터내셔널 게엠베하 글로벌 패이
턴츠

(30) 우선권주장

22162761 2022년03월17일 유럽특허청(EPO)(EP)
23157433 2023년02월19일 유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는 이중특이적 항체로서, 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이고, 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각이 펩티드 링커에 의해 그의 가변 경쇄의 N-말단으로 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 결합 부분이 중쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 및 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열식별번호: 44의 CDRH2가 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 72 또는 서열식별번호: 110에 의해 대체되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 서열식별번호: 6의 CDRL1이 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 121, 서열식별번호: 133, 서열식별번호: 140 또는 서열식별번호: 141에 의해 대체되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 중쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3, 및

b) 경쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트:

- b1) 서열식별번호: 75의 CDRL1, 서열식별번호: 76의 CDRL2 및 서열식별번호: 77의 CDRL3,
- b2) 서열식별번호: 79의 CDRL1, 서열식별번호: 80의 CDRL2 및 서열식별번호: 81의 CDRL3,
- b3) 서열식별번호: 83의 CDRL1, 서열식별번호: 84의 CDRL2 및 서열식별번호: 85의 CDRL3,
- b4) 서열식별번호: 87의 CDRL1, 서열식별번호: 88의 CDRL2 및 서열식별번호: 89의 CDRL3,
- b5) 서열식별번호: 117의 CDRL1, 서열식별번호: 118의 CDRL2 및 서열식별번호: 119의 CDRL3,
- b6) 서열식별번호: 121의 CDRL1, 서열식별번호: 122의 CDRL2 및 서열식별번호: 123의 CDRL3,
- b7) 서열식별번호: 125의 CDRL1, 서열식별번호: 126의 CDRL2 및 서열식별번호: 127의 CDRL3,
- b8) 서열식별번호: 129의 CDRL1, 서열식별번호: 130의 CDRL2 및 서열식별번호: 131의 CDRL3,
- b9) 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
- b10) 서열식별번호: 137의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 139의 CDRL3,
- b11) 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 139의 CDRL3,
- b12) 서열식별번호: 140의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,

- b13) 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
 - b14) 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
 - b15) 서열식별번호: 151의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
 - b16) 서열식별번호: 152의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
 - b17) 서열식별번호: 153의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
 - b18) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 156의 CDRL3,
 - b19) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 157의 CDRL3,
 - b20) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 158의 CDRL3,
 - b21) 서열식별번호: 154의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
 - b22) 서열식별번호: 155의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3
- 을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양-항원이 CLDN18.2, FOLR1, STEAP1 및 DLL3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제2 결합 부분의 경우 가변 경쇄 및 중쇄 CDR이 하기인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체:

- a) 종양-항원으로서 FOLR1의 경우 서열식별번호: 11의 CDRL1, 서열식별번호: 12의 CDRL2 및 서열식별번호: 13의 CDRL3 및 서열식별번호: 15의 CDRH1, 서열식별번호: 16의 CDRH2 및 서열식별번호: 17의 CDRH3,
- b) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 19의 CDRL1, 서열식별번호: 20의 CDRL2 및 서열식별번호: 21의 CDRL3 및 서열식별번호: 23의 CDRH1, 서열식별번호: 24의 CDRH2 및 서열식별번호: 25의 CDRH3,
- c) 종양-항원으로서 DLL3의 경우 서열식별번호: 27의 CDRL1, 서열식별번호: 28의 CDRL2 및 서열식별번호: 29의 CDRL3 및 서열식별번호: 31의 CDRH1, 서열식별번호: 32의 CDRH2 및 서열식별번호: 33의 CDRH3,
- d) 종양-항원으로서 CLDN18.2의 경우 서열식별번호: 35의 CDRL1, 서열식별번호: 36의 CDRL2 및 서열식별번호: 37의 CDRL3 및 서열식별번호: 39의 CDRH1, 서열식별번호: 40의 CDRH2 및 서열식별번호: 41의 CDRH3.

청구항 9

제1항에 있어서, 제1 결합 부분의 경우 가변 중쇄가 서열식별번호: 42의 것이고, 가변 경쇄가 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 78, 서열식별번호: 82, 서열식별번호: 86으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제2 결합 부분의 경우 가변 경쇄가 서열식별번호: 10이고, 가변 중쇄가 서열식별번호: 14의 것임을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 본 발명에 따른 항체의 제1 결합 부분이 인간화 또는 CDR 이식된 항체인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 scFv가 펩티드링커1-VL-펩티드링커2-VH 배향으로 상기 C-말단에 결합되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제1 펩티드-링커가 5-25개의 아미노산으로 이루어지고, 상기 제2 펩티드-링커가 10-25개의 아미노산으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 질환의 치료에 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 결장 암종, 난소암, 폐암, 전립선암, 췌장암, 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 질환의 치료에 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 재조합 핵산 서열.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 특허 출원과 함께 출원된 전자적으로 제출된 서열 목록 (명칭: Evo-PCT sequence list.xml)의 내용은 명세서의 일부이다.

[0002] 발명의 분야

[0003] 본 발명은 부티로필린 3 패밀리 구성원 CD277 (BTN3A) 및 인간 종양-항원에 결합하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 이중특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항체를 생산하는 방법 및 질환 치료에서 이러한 항체를 사용하는 방법 및 그의 치료적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] V γ 9V δ 2 T 세포는 말초 혈액에서 γ δ T 세포의 주요 서브세트이며 약 60%-95%를 차지한다. 대규모 메타-게놈 데이터세트의 생물정보학적 분석은 종양 내 V γ 9V δ 2 T 세포의 상대적 풍부함을 결정하였고 이를 환자 결과와 연관시켰다. 종양-침윤성 γ δ T 림프구 (γ δ TIL)는 모든 종양 실체에서 발견되었지만 수는 적었다. 중요하게는, 다양한 암에서 γ δ TIL의 상대적 풍부함과 면역 체크포인트 요법에 대한 유리한 반응 간의 상관관계가 입증되었다 (Gentles, A.J et al.; Nat. Med. 2015, 1-12; Tosolini, M.; et al.; Oncoimmunology 2017, 6, 1-10). 생체내 자극 또는 V γ 9V δ 2 T 세포의 입양 T 세포 전이에 기초한 암 요법은 지난 수십 년 동안 테스트되었지만 일관된 임상 효능을 제공하지 못하였다. 추가 개념, 예컨대 γ δ 키메라 항원 수용체 (CAR)-T 세포 및 γ δ T-세포 결합제는 현재 전임상 평가 중이다 (Kuenkele KP., et al.; Cells 2020, 9, 829).

[0005] 부티로필린 3 패밀리 구성원 BTN3A (CD277; UniProtKB - 000481 (BT3A1_HUMAN))는 2개의 세포외 이뮤노글로불린 (Ig)-유사 도메인 및 세포내 B30.2 도메인을 보유하는 막횡단 수용체이다. CD277은 T-세포 활성화 및 적응 면역 반응에서 역할을 하고, 활성화된 T-세포의 증식을 조절하고, 활성화된 T-세포에 의한 시토카인 및 IFN γ 의 방출을 조절하고, 높은 수준의 인산화된 대사산물, 예컨대 이소펜테닐 피로포스페이트를 특징으로 하는 감염되고 형질전환된 세포에 대한 T-세포의 반응을 매개한다 (Afrache, H., et al., Immunogenetics 64, 781-794 (2012)).

- [0006] (E)-4-히드록시-3-메틸-부트-2-에닐 피로포스페이트) HMBPP는 이소프레노이드 합성을 위한 원핵생물 비-메발로네이트/2-C-메틸-D-에리트ρί톨 4-포스페이트/1-데옥시-D-크실로스 5-포스페이트 (MEP) 경로의 필수적인 중간체 생성물이다. BTN3A는 TLR이 보존된 병원체 구조, 예컨대 LPS 또는 DNA를 인식하는 방식과 비슷하게 이 병원체-유래 분자를 인식하도록 정교하게 조정된다 (O'Neill, L.A.J.; et al.; Nat. Rev. Immunol. 2013, 13, 453-460; Gu, S. et al.; Front. Immunol. 2014, 5, 688; Vavassori, S. et al.; Nat. Immunol. 2013, 14, 908-916). BTN3A1의 세포내 도메인 B30.2는 박테리아 대사산물 HMBPP와 직접 상호작용한다 (Rhodes, D.A. et al.; J. Immunol. 2015, 194, 2390-2398; Harly, C.; et al. Blood 2012, 120, 2269-2279; Sandstrom, A.; et al.; Immunity 2014, 40, 490-500). BTN3A1과 HMBPP 간의 상호작용은 $\gamma\delta$ TCR을 포함하는 면역학적 시냅스의 구성 성분에 대한 BTN3A1의 결합 및 $V\delta 2$ T 세포의 후속 활성화를 초래한다. 부티로필린 3A1은 인간 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 프레닐 피로포스페이트 자극에 필수적인 역할을 한다 (Wang H. et al. J Immunol 2013; 191:1029-1042; Sandstrom A. et al.; Immunity Volume 40, Issue 4, 17 April 2014, Pages 490-500, Janssen O. et al., J Immunol 1991; 146; 35-39).
- [0007] CD277은 모든 종양의 필수적인 화합물이다 (Liang, F. et al., Febs Open Bio 2021 11, 2586-2599; Ghigo, C. et al., J Immunother Cancer 2020 8, A3-A3). 문헌 [Payne KK. et al.; Science 369, 942-949 (2020)]은 BTN3A1이 $\alpha\beta$ 및 $\gamma\delta$ T 세포를 조정함으로써 항종양 반응을 지배한다고 기재하고 있다.
- [0008] 문헌 [De Bruin et al. (De Bruin RCG. et al.; Oncoimmunology 2018, VOL. 7, NO. 1, e1375641)]은 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포 및 EGFR 둘 다를 표적화하는 이중특이적 나노바디 접근법을 기재하고 있으며, 이는 시험관내 및 생체내 마우스 이중이식편 모델 둘 다에서 $V\gamma 9V\delta 2$ -T 세포 활성화 및 후속 종양 세포 용해를 유도하여, $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 세포용해 능력을 입증한다.
- [0009] 문헌 [Palakodeti et al. (Palakodeti A. et al.; JBC Vol. 287, No. 39, pp. 32780-32790, 2012)]은 CD277-특이적 항체에 의한 인간 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포 반응의 조절을 기재하고 있다. W02012080769 및 W02020025703은 항-BTN3A1 항체 및 그의 용도에 관한 것이다. BTN3A1 효능제는 또한 W02012080769; W02010106051 (US20150353643); W02011014438; W02017144668; W02019211370, W02011/014438 및 W02012080351에 기재되어 있다.
- [0010] W02012080351 및 W02012080769는 항-C277 항체 (7.2 및 20.1)를 언급한다. scFv가 가능한 항체 포맷으로 언급된다. 최신 기술에 따른 효능작용성 항-C277 항체는 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 세포용해 기능, 시토카인 생산 및 증식을 활성화시킨다. 문헌 [De Gassart A. et al. in Science Translational Medicine 13, (2021), (<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj0835>)]에 따르면 말초 혈액 내 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 활성화는 고갈의 결과가 아니라 트래피킹 및 경계화의 결과로 순환하는 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 일시적인 감소를 유도한다. 고갈의 관련성은 본 발명자들에 의해 처음으로 인식되었다.
- [0011] 문헌 [Imbert C. and Olive D. in A. Birbrair (ed.), Tumor Microenvironment, Advances in Experimental Medicine and Biology 1273 (https://doi.org/10.1007/978-3-030-49270-0_5)] 및 [Imbert C. et al., in Advances in Experimental Medicine and Biology, (2020), Springer, Vol. 1273, 91-104]은 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포의 활성화를 위해 CD277 및 종양-항원 둘 다를 표적화하는 이중특이적 항체를 제안한다. W02020025703에서는 또한 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체가 제안되었는데, 이는 항-CD277 항체의 VH 및 VL을 포함하는 Fab 또는 scFv를 포함하는 하나의 아암을 포함하며, 이중특이적 분자 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질 포맷이 제안되었다.
- [0012] 이중특이적 항체는 다양한 포맷으로 많이 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Brinkmann U. and Kontermann E.; MAbs. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212]에 의해 검토됨; 문헌 [Brinkmann and Kontermann]의 도 2 참조). 2019년에는 bsAb 생성 및 개발을 위해 20개 초과 상이한 상용화된 기술 플랫폼이 이용가능하였다 (문헌 [Lanriijn AF et al.; Nature Reviews; <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>]에 의해 검토됨). 이중특이적 항체 포맷은 문헌 [Coloma M. J. and Morrison S. L., Nat. Biotechnol. 15:159-163 (1997)]에 기재되어 있으며; 또한 문헌 [Ulrich Brinkmann & Roland E. Kontermann (2017), The making of bispecific antibodies, mAbs, 9:2, 182-212, DOI: 10.1080/19420862.2016.1268307]을 참조한다. 이들 이중특이적 분자는 IgG 항체 (마스터 또는 부모 모듈로 지정됨)와 중쇄의 C 말단에 커플링된 상이한 특이성의 scFv (IgG-HC-scFv, "모리슨(Morrison)-유형 이중특이적 항체"; 도 1 참조)로 구성된다.
- [0013] W02010112193 (US009382323; EP2414391B1)은 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄 및 2개의 항체 경쇄로 이루어진 전장 항체; 및 하나 이상의 추가 항원에 결합하는 하나 이상의 단일-쇄 Fv 단편을 포함하는 다

중특이적 항체로서, 여기서 상기 단일-쇄 Fv 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단 또는 N-말단에서 펩티드 커넥터를 통해 상기 전장 항체에 융합되는 것인 이중특이적 항체에 관한 것이다.

- [0014] 문헌 [Presti et al. (Presti, E. L. et al., *Frontiers in immunology* 2017, 8, 975-11)]은 항체를 사용하여 γ δ T 세포를 암 세포로 재지시할 수 있다고 기재하고 있다. 예를 들어, 이는 이중특이적 항체를 사용하여 달성될 수 있으며, 여기서 하나의 결합 부위는 종양-특이적 세포 표면 분자 (예를 들어, EpCAM 또는 HER2/neu)를 인식하고, 다른 결합 부위는 $V\gamma 9V\delta 2$ TCR의 CD3 또는 $V\gamma 9$ 쇄를 표적화하며; 이러한 이중특이적 항체는 전임상 모델에서 효과적인 것으로 입증되었다 (Hoh A, et al. *Liver Int* (2013) 33:127-36. doi:10.1111/liv.12011; Oberg HH, et al.; *Cell Immunol* (2015) 296:41-9).
- [0015] WO2018041827은 이중특이적 T 세포 결합제 (BiTE)로 무장된 아데노바이러스를 기재하고 있으며, 여기서 BiTE의 결합 도메인 중 하나는 비-TCR 활성화 단백질, 예컨대 BTN3A1에 특이적이고, 결합 도메인 중 하나는 종양-항원, 예컨대 CEA, MUC-1, EpCAM, HER 수용체 HER1, HER2, HER3, HER4, PEM, A33, G250, 탄수화물 항원 Ley, Lex, Leb, PSMA, TAG-72, STEAP1, CD166, CD24, CD44, E-카드헤린, SPARC, ErbB2 및 ErbB3에 특이적이다. WO2012080769는 항-CD277 항체 (예를 들어, mAb 7.2, mAb 20.1)에 관한 것이다. Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, Sc(Fv)₂ 및 디아바디와 같은 항체 단편이 일반적으로 언급된다.
- [0016] WO2020060406은 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종 또는 급성 골수성 백혈병의 치료에 사용하기 위한, 인간 CD1d에 결합할 수 있는 제1 결합 모이어티 및 γ δ T 세포의 T 세포 수용체의 $V\gamma 9$ 쇄에 결합할 수 있는 제2 결합 모이어티를 포함하는 항체를 기재하고 있다.
- [0017] 종양-항원은 다양한 연구, 예를 들어 종양 대 정상 조직 또는 세포주에서 각각의 mRNA 수준 또는 단백질 발현 수준을 비교하는 연구 또는 종양 대 정상 세포의 표면 상의 항원 밀도를 비교하는 연구로부터 공지되어 있다 (Woell, S. et al.. *Int. J. Cancer* 134, 731-739 (2014); Herlyn, M. et al., *PNAS* 76, 1438-1442 (1979); Rusnak, D. W. et al., *Cell Prolif* 580-594 (2007); Karhemo, P.-R. et al., *Frontiers in pharmacology* 3, 192 (2012); Imai, K. et al., *Clin Cancer Res* 14, 6487-6495 (2008); Coto-Llerena, M. et al., *Frontiers Oncol* 10, 979 (2020); Moreaux J., *Biochem Biophys Res Commun* 14, 148-155 (2012); Owen, D. H. et al., *J Hematol Oncol* 12, 61 (2019); Wu, M. et al., *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 8, 775-82 (1999); Tarn, C. et al., *Proc National Acad Sci* 105, 8387-8392 (2008)). 클라우딘 18 (CLD18) 분자 (UniProtKB - P56856 (CLD18_HUMAN)는 대략 27.9 / 27.72 kD의 분자량을 갖는 통합 막횡단 단백질이다. 클라우딘은 상피 및 내피의 밀착 연결부 내에 위치한 통합 막 단백질이다. 밀착 연결부는 인접한 세포 사이에 막내 입자의 상호연결된 가닥의 네트워크를 구성한다. 밀착 연결부에서, 오클루딘 및 클라우딘은 가장 두드러진 막횡단 단백질 구성성분이다. 강한 세포간 접착 특성으로 인해, 용질의 세포주위 수송을 방지하고 제어하고 세포 극성을 유지하기 위해 막 지질 및 단백질의 측면 확산을 제한하는 1차 장벽을 생성한다. 밀착 연결부 형성 단백질은 상피 조직 구조를 구성하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 단백질은 잘 구조화된 상피에서는 항체에 거의 접근이 불가능하지만 종양 세포에서는 노출되는 것으로 추정된다. 클라우딘18 및 그의 스플라이스 변이체 클라우딘 18.2에 대한 항체는 예를 들어 WO2007059997, WO2008145338, US20150374789, WO2013174403 및 US9770487 (US10314890; EP2958945; IMAB362)에 기재되어 있다. WO2021024020은 암 치료를 위한 항-클라우딘18.2 항체 및 면역 체크포인트 억제제를 사용한 조합 요법을 기재하고 있다.
- [0018] STEAP-1 (전립선의 6-막횡단 상피 항원-1)은 정상 조직에서 주로 전립선 세포에서 발현되는 339개 아미노산 세포 표면 단백질이다. STEAP-1 단백질 발현은 다양한 상태의 전립선암에서 높은 수준으로 유지되며, STEAP-1은 또한 다른 인간 암, 예컨대 폐암 및 결장암에서 고도로 과발현된다. 정상 및 암 조직에서 STEAP-1의 발현 프로파일은 면역요법에 대한 표적으로서의 그의 잠재적인 용도를 제안하였다. WO 2008/052187은 항-STEAP-1 항체 및 그의 면역접합체를 보고한다. STEAP-1xCD3 이중특이적 항체는 WO2014165818 및 WO2017055388에 기재되어 있다.
- [0019] FOLR1은 다양한 기원의 상피 종양 세포, 예를 들어 난소암, 폐암, 유방암, 신장암, 결장직장암, 자궁내막암에서 발현된다. 10.1517/17425247.2012.694863. Epub 2012. WO2012119077은 FOLR1에 대한 항체를 언급한다. FOLR1 및 CD3를 표적화하는 이중특이적 항체는 WO2016/079076 및 WO2021255143에 기재되어 있다.
- [0020] DLL3은 SCLC 및 LCNEC를 포함한 고등급 폐 신경내분비 종양에서 선택적으로 발현된다. DLL3의 증가된 발현은 SCLC 및 LCNEC 환자-유래 이중이식편 종양에서 관찰되었으며 원발성 종양에서도 확인되었다. 문헌 [Saunders et al., *Sci Translational Medicine* 7(302): 302ral36 (2015)]을 참조한다. DLL3의 증가된 발현은 전립선 신

경내분비 암종을 포함한 폐의 신경내분비암에서도 관찰되었다 (Puca et al., Sci TranslMed 11(484): pii: eaav0891 (2019)). DLL3은 이러한 종양 세포의 표면에서 발현되지만 정상 조직에서는 발현되지 않는다. WO2021007371은 항-DLL3 항체에 관한 것이며, 인간화, 키메라 또는 이중특이적 항체가 제안된다. WO2019195409는 NKG2D 수용체, CD16 및 종양-항원에 결합하는 다중특이적 단백질을 언급한다.

발명의 내용

- [0021] 최신 기술에 따른 효능작용성 항-C277 항체는 V_γ9V_δ2 T 세포의 세포용해 기능, 시토카인 생산 및 증식을 활성화시킨다. 최신 기술에 따른 효능작용성 항-C277 항체는 순환하는 V_γ9V_δ2 T 세포의 일시적인 감소를 유도하며, 이는 고갈의 결과가 아니라 순환으로부터 암 조직을 포함한 조직으로의 V_γ9V_δ2 T 세포의 트래피킹의 결과로 기재되어 있다.
- [0022] 그러나 본 발명자들은 최신 기술에 따른 효능작용성 항-C277 항체에 의한 종양 세포의 부재 하의 V_γ9V_δ2 T 세포의 이러한 활성화가 V_γ9V_δ2 T 세포의 자기-제거를 유도한다는 것을 인식하였다. 본 발명자들은 하기 기재된 바와 같은 특성을 갖는, CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하고 ("이중특이적 항-CD277 항체"라고도 함) 인간 종양-항원 ("종양-항원"이라고도 함)에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체가 상기 종양-항원을 보유하는 인간 종양 세포의 우수한 사멸 및 비-종양 세포의 용해에 관해서 높은 안전성을 보이며 V_γ9V_δ2 T 세포의 자기-제거를 유도하지 않는다는 것을 인식하였다.
- [0023] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이고, 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다.
- [0024] 한 실시양태에서 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 그의 가변 경쇄의 N-말단으로 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다.
- [0025] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 제1 결합 부분에 중쇄 CDR 서열로서 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 CDRH1, 서열식별번호: 3의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 및 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 CDRH2 (서열식별번호: 44)에 N5S 및 K10N (N53S, K58N (카바트 (Kabatt)) 또는 N185S-K190N으로도 지칭됨)의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 CDRH2 치환에 더하여 CDRL1 (서열식별번호: 75)에 L8V (L31V로도 지칭됨)의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 CDRL1 (서열식별번호: 140)에 치환 L8V 및 H1R을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 상기 제1 결합 부분은 제1 결합 부분에 중쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 및 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3을 포함하는 전장 2가 항체이고, 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다.
- [0029] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CDRH2가 서열식별번호: 68, 서열식별번호: 72 또는 서열식별번호: 110의 것임을 특징으로 한다.
- [0030] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CDRL1이 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 121, 서열식별번호: 133, 서열식별번호: 140 또는 서열식별번호: 141의 것임을 특징으로 한다.
- [0031] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 CDRH2 (서열식별번호: 44)에 N5S 및 K10N의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 CDRH2 치환에 더하여 CDRL1 (서열식별번호: 75)에 L8V의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 CDRL1 (서열식별번호: 140)에 치환 L8V

및 H1R을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0033] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체의 제1 결합 부분은 인간, 인간화 또는 CDR 이식된 항체이다.
- [0034] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0035] 중쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1), 및
- [0036] b) 경쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:
- [0037] b1) 서열식별번호: 75의 CDRL1, 서열식별번호: 76의 CDRL2 및 서열식별번호: 77의 CDRL3,
- [0038] b2) 서열식별번호: 79의 CDRL1, 서열식별번호: 80의 CDRL2 및 서열식별번호: 81의 CDRL3,
- [0039] b3) 서열식별번호: 83의 CDRL1, 서열식별번호: 84의 CDRL2 및 서열식별번호: 85의 CDRL3,
- [0040] b4) 서열식별번호: 87의 CDRL1, 서열식별번호: 88의 CDRL2 및 서열식별번호: 89의 CDRL3,
- [0041] b5) 서열식별번호: 117의 CDRL1, 서열식별번호: 118의 CDRL2 및 서열식별번호: 119의 CDRL3,
- [0042] b6) 서열식별번호: 121의 CDRL1, 서열식별번호: 122의 CDRL2 및 서열식별번호: 123의 CDRL3,
- [0043] b7) 서열식별번호: 125의 CDRL1, 서열식별번호: 126의 CDRL2 및 서열식별번호: 127의 CDRL3,
- [0044] b8) 서열식별번호: 129의 CDRL1, 서열식별번호: 130의 CDRL2 및 서열식별번호: 131의 CDRL3,
- [0045] b9) 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
- [0046] b10) 서열식별번호: 137의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 139의 CDRL3,
- [0047] b11) 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 139의 CDRL3,
- [0048] b12) 서열식별번호: 140의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
- [0049] b13) 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 134의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
- [0050] b14) 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 135의 CDRL3,
- [0051] b15) 서열식별번호: 151의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
- [0052] b16) 서열식별번호: 152의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
- [0053] b17) 서열식별번호: 153의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
- [0054] b18) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 156의 CDRL3,
- [0055] b19) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 157의 CDRL3,
- [0056] b20) 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 158의 CDRL3,
- [0057] b21) 서열식별번호: 154의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
- [0058] b22) 서열식별번호: 155의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3,
- [0059] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 각각은 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다.
- [0060] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 제1 결합 부분의 경우 가변 중쇄가 서열식별번호: 42의 것이고, 가변 경쇄가 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 78, 서열식별번호: 82, 서열식별번호: 86으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0061] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 상기 가변 쇄의 인간화 버전을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0062] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 상기 종양-항원이 CLDN18.2 (UniProtKB - P56856-2,

CLD18_HUMAN), FOLR1 (UniProtKB - P15328, FOLR1_HUMAN), STEAP1 (UniProtKB - Q9UHE8, STEA1_HUMAN), 또는 DLL3 (UniProtKB - Q9NYJ7, DLL3_HUMAN)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다. 추가로 유용한 종양-항원은 예를 들어 문헌 [Middleburg et al., Cancers (2021) 13, 287, pp 4-6]에 기재되어 있다.

- [0063] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 제1 결합 부분이 표 3의 화합물 EvB# 21 내지 136에 대해 표시된 바와 같은 CDR 조합, 또는 표 3의 화합물 EvB#21 내지 136에 대한 가변 경쇄 및 가변 중쇄 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 CDR 조합을 포함하고, 상기 제2 결합 부분이 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간화된 것을 특징으로 한다.
- [0064] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 제2 결합 부분이 종양-항원으로서 FOLR1의 경우 경쇄 CDR로서 서열식별번호: 11의 CDRL1, 서열식별번호: 12의 CDRL2 및 서열식별번호: 13의 CDRL3 및 중쇄 CDR로서 서열식별번호: 15의 CDRH1, 서열식별번호: 16의 CDRH2 및 서열식별번호: 17의 CDRH3 (FOLR1 CDR 세트)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0065] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 제2 결합 부분에 CDR로서 서열식별번호: 19의 CDRL1, 서열식별번호: 20의 CDRL2 및 서열식별번호: 21의 CDRL3 및 서열식별번호: 23의 CDRH1, 서열식별번호: 24의 CDRH2 및 서열식별번호: 25의 CDRH3 (STEAP1 CDR 세트)을 포함한다.
- [0066] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 DLL3의 경우 제2 결합 부분에 CDR로서 서열식별번호: 27의 CDRL1, 서열식별번호: 28의 CDRL2 및 서열식별번호: 29의 CDRL3 및 서열식별번호: 31의 CDRH1, 서열식별번호: 32의 CDRH2 및 서열식별번호: 33의 CDRH3 (DLL3 CDR 세트)을 포함한다.
- [0067] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 CLDN18.2의 경우 제2 결합 부분에 CDR로서 서열식별번호: 35의 CDRL1, 서열식별번호: 36의 CDRL2 및 서열식별번호: 37의 CDRL3 및 서열식별번호: 39의 CDRH1, 서열식별번호: 40의 CDRH2 및 서열식별번호: 41의 CDRH3 (CLDN 18.2 CDR 세트)을 포함한다.
- [0068] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 FOLR-1의 경우 제2 결합 부분에 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 14의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 제2 결합 부분에 서열식별번호: 18 및 서열식별번호: 22의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0070] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 DLL3-4의 경우 제2 결합 부분에 서열식별번호: 26 및 서열식별번호: 30의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0071] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 종양-항원으로서 CLDN 18.2의 경우 제2 결합 부분에 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 38의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0072] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 하기를 특징으로 한다:
- [0073] a) 상기 이중특이적 항체는 중쇄로서 서열식별번호: 94의 중쇄 및 경쇄로서 서열식별번호: 93의 경쇄를 포함하는 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 종양-항원을 보유하는 제1 세포주의 용해에 대해 0.001 내지 0.2의 EC50 비율을 나타내고,
- [0074] b) 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 상기 종양-항원을 보유하지 않는 제2 세포주의 용해에 대해 5 내지 1000의 EC50 비율을 나타내며,
- [0075] 모두는 5:1의 E/T 비율로 활성화된 V γ 9V δ 2 T 림프구의 존재 하에, 12.5 IU/mL 인터류킨-2의 존재 하에, 및 동일한 조건 하에 동일한 검정에서 측정된다.
- [0076] 한 실시양태에서 이중특이적 항체는 Mab-scFv 포맷이다.
- [0077] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0078] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이고,
- [0079] b) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄 CDR로서 하기로 이루어진 군으로

로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:

- [0080] b1) 종양-항원으로서 FOLR1의 경우 서열식별번호: 11의 CDRL1, 서열식별번호: 12의 CDRL2 및 서열식별번호: 13의 CDRL3 및 서열식별번호: 15의 CDRH1, 서열식별번호: 16의 CDRH2 및 서열식별번호: 17의 CDRH3 (FOLR1 CDR 세트),
- [0081] b2) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 19의 CDRL1, 서열식별번호: 20의 CDRL2 및 서열식별번호: 21의 CDRL3 및 서열식별번호: 23의 CDRH1, 서열식별번호: 24의 CDRH2 및 서열식별번호: 25의 CDRH3 (STEAP1 CDR 세트),
- [0082] b3) 종양-항원으로서 DLL3의 경우 서열식별번호: 27의 CDRL1, 서열식별번호: 28의 CDRL2 및 서열식별번호: 29의 CDRL3 및 서열식별번호: 31의 CDRH1, 서열식별번호: 32의 CDRH2 및 서열식별번호: 33의 CDRH3 (DLL3 CDR 세트),
- [0083] b4) 종양-항원으로서 CLDN18.2의 경우 서열식별번호: 35의 CDRL1, 서열식별번호: 36의 CDRL2 및 서열식별번호: 37의 CDRL3 및 서열식별번호: 39의 CDRH1, 서열식별번호: 40의 CDRH2 및 서열식별번호: 41의 CDRH3 (CLDN 18.2 CDR 세트),
- [0084] c) 상기 이중특이적 항체는 중쇄로서 서열식별번호: 94의 중쇄 및 경쇄로서 서열식별번호: 93의 경쇄를 포함하는 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 종양-항원을 보유하는 제1 세포주의 용해에 대해 0.001 내지 0.2의 EC50 비율을 나타내고,
- [0085] d) 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 상기 종양-항원을 보유하지 않는 제2 세포주의 용해에 대해 5 내지 1000의 EC50 비율을 나타내며,
- [0086] 모두는 5:1의 E/T 비율로 활성화된 V γ 9V δ 2 T 림프구의 존재 하에, 12.5 IU/mL 인터류킨-2의 존재 하에, 및 동일한 조건 하에 동일한 검정에서 측정된다.
- [0087] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0088] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 6의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 1), 및
- [0089] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0090] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0091] b2) 서열식별번호: 47의 CDRH1, 서열식별번호: 48의 CDRH2 및 서열식별번호: 49의 CDRH3 (CDRH 세트 2),
- [0092] b3) 서열식별번호: 51의 CDRH1, 서열식별번호: 52의 CDRH2 및 서열식별번호: 53의 CDRH3 (CDRH 세트 3),
- [0093] b4) 서열식별번호: 55의 CDRH1, 서열식별번호: 56의 CDRH2 및 서열식별번호: 57의 CDRH3 (CDRH 세트 4),
- [0094] b5) 서열식별번호: 59의 CDRH1, 서열식별번호: 60의 CDRH2 및 서열식별번호: 61의 CDRH3 (CDRH 세트 5),
- [0095] b6) 서열식별번호: 63의 CDRH1, 서열식별번호: 64의 CDRH2 및 서열식별번호: 65의 CDRH3 (CDRH 세트 6),
- [0096] b7) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 68의 CDRH2 및 서열식별번호: 69의 CDRH3 (CDRH 세트 7),
- [0097] b8) 서열식별번호: 71의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 73의 CDRH3 (CDRH 세트 8),
- [0098] b10) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 106의 CDRH2 및 서열식별번호: 107의 CDRH3 (CDRH 세트 10),
- [0099] b11) 서열식별번호: 109의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 111의 CDRH3 (CDRH 세트 11),
- [0100] b12) 서열식별번호: 113의 CDRH1, 서열식별번호: 114의 CDRH2 및 서열식별번호: 115의 CDRH3 (CDRH 세트 12),
- [0101] b13) 서열식별번호: 59의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 14)
- [0102] b14) 서열식별번호: 59의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 15)
- [0103] b15) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 20)

- [0104] b16) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 18)
- [0105] b17) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0106] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0107] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0108] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 121의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 2) 및
- [0109] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0110] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0111] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0112] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0113] b4) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 20),
- [0114] b5) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 68의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 7),
- [0115] b6) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0116] b7) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0117] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0118] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0119] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 83의 CDRL1, 서열식별번호: 84의 CDRL2 및 서열식별번호: 85의 CDRL3 (CDRL 세트 3) 및
- [0120] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0121] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) 서열식별번호: 2의 CDRH1, 서열식별번호: 3의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 9), b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0122] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0123] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0124] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 4) 및
- [0125] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0126] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0127] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0128] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0129] b4) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0130] b5) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0131] b6) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 68의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 7),

- [0132] b7) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 23),
- [0133] b8) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 106의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 24),
- [0134] b9) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 25),
- [0135] b10) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 114의 CDRH2 및 서열식별번호: 115의 CDRH3 (CDRH 세트 26),
- [0136] b11) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 27),
- [0137] b12) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0138] b13) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0139] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0140] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0141] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 75의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 5) 및
- [0142] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0143] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0144] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0145] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0146] b4) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 20),
- [0147] b5) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 68의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 7), b2) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0148] b6) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 4의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0149] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0150] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0151] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 140의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 6) 및
- [0152] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0153] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0154] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0155] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0156] b1) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 20),
- [0157] b2) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 23)
- [0158] b3) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0159] b4) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0160] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0161] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를

특징으로 한다:

- [0162] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 7) 및
- [0163] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0164] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0165] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0166] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0167] b4) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0168] b5) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0169] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0170] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0171] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 141의 CDRL1, 서열식별번호: 7의 CDRL2 및 서열식별번호: 8의 CDRL3 (CDRL 세트 8) 및
- [0172] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0173] b1) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0174] b2) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0175] b3) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0176] b4) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 20),
- [0177] b5) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 23), 및
- [0178] b6) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0179] b7) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 19),
- [0180] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0181] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0182] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 133의 CDRL1, 서열식별번호: 138의 CDRL2 및 서열식별번호: 139의 CDRL3 (CDR 세트 12), 및
- [0183] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0184] b1) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 20),
- [0185] b2) 서열식별번호: 67의 CDRH1, 서열식별번호: 68의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 23), 및
- [0186] b3) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 18),
- [0187] b4) 서열식별번호: 105의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 19), 및
- [0188] b5) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 44의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 1),
- [0189] b6) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 72의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 21),
- [0190] b7) 서열식별번호: 43의 CDRH1, 서열식별번호: 110의 CDRH2 및 서열식별번호: 45의 CDRH3 (CDRH 세트 22),
- [0191] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0192] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원

에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:

- [0193] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 87의 CDRL1, 서열식별번호: 88의 CDRL2 및 서열식별번호: 89의 CDRL3 (CDRL 세트 9) 및
- [0194] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0195] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) (CDRH 세트 9), b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0196] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0197] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0198] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 79의 CDRL1, 서열식별번호: 80의 CDRL2 및 서열식별번호: 81의 CDRL3 (CDRL 세트 10) 및
- [0199] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0200] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9), b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0201] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0202] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0203] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이며, 경쇄 CDR 서열로서 서열식별번호: 75의 CDRL1, 서열식별번호: 76의 CDRL2 및 서열식별번호: 77의 CDRL3 (CDRL 세트 11), 및
- [0204] b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 서열을 포함하고:
- [0205] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9), b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0206] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0207] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 경쇄 CDR 서열로서 CDRL1 세트 1 및 b) 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:
- [0208] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, 및 b8) CDRH 세트 8, b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0209] 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 CDR로서 FOLR1 CDR 세트, STEAP1 CDR 세트, DLL3 CDR 세트 및 CLDN 18.2 CDR 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함한다.
- [0210] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 경쇄 CDR 서열로서 CDRL1 세트 2 및 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:
- [0211] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9, b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0212] 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 CDR로서 FOLR1 CDR 세트, STEAP1 CDR 세트, DLL3 CDR 세트 및 CLDN 18.2 CDR 세

트로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함한다.

- [0213] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 경쇄 CDR 서열로서 CDRL1 세트 3 및 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:
- [0214] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, 및 b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9, b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0215] 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 CDR로서 FOLR1 CDR 세트, STEAP1 CDR 세트, DLL3 CDR 세트 및 CLDN 18.2 CDR 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함한다.
- [0216] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 경쇄 CDR 서열로서 CDRL1 세트 4 및 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고:
- [0217] b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9, b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0218] 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 CDR로서 FOLR1 CDR 세트, STEAP1 CDR 세트, DLL3 CDR 세트 및 CLDN 18.2 CDR 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함한다.
- [0219] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 경쇄 CDR 서열로서 CDRL1 세트 5 및 중쇄 CDR 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함하고: b1) CDRH 세트 1, b2) CDRH 세트 2, b3) CDRH 세트 3, b4) CDRH 세트 4, b5) CDRH 세트 5, b6) CDRH 세트 6, b7) CDRH 세트 7, b8) CDRH 세트 8, 및 b9) CDRH 세트 9, b10) CDRH 세트 10, b11) CDRH 세트 11, b12) CDRH 세트 12,
- [0220] 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 CDR로서 FOLR1 CDR 세트, STEAP1 CDR 세트, DLL3 CDR 세트 및 CLDN 18.2 CDR 세트로 이루어진 군으로부터 선택된 CDR 세트를 포함한다.
- [0221] 본 발명의 한 실시양태는 제1 결합 부분이 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0222] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 가변 중쇄로서 서열식별번호: 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66 및 70, 또는 상기 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 인간화 버전으로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 중쇄,
- [0223] 및 경쇄 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고:
- [0224] a) 서열식별번호: 5,
- [0225] b) 서열식별번호: 74,
- [0226] c) 서열식별번호: 78,
- [0227] d) 서열식별번호: 82,
- [0228] e) 서열식별번호: 86,
- [0229] 또는 상기 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 인간화 버전,
- [0230] 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다. 한 실시양태에서 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 세트를 포함한다:
- [0231] e) 종양-항원으로서 FOLR-1의 경우 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 14,
- [0232] f) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 18 및 서열식별번호: 22,
- [0233] g) 종양-항원으로서 DLL3-4의 경우 서열식별번호: 26 및 서열식별번호: 30, 및

- [0234] h) 종양-항원으로서 CLDN 18.2의 경우 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 38.
- [0235] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 가변 중쇄로서 서열식별번호: 1의 가변 중쇄 또는 상기 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 인간화 버전, 및 경쇄 서열로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고:
- [0236] a) 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 78, 서열식별번호: 82, 서열식별번호: 86,
- [0237] 또는 상기 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 그의 인간화 버전,
- [0238] 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지며, 상기 단일-쇄 Fv 항체 각각은 펩티드 링커에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다. 한 실시양태에서 제2 결합 부분은 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 세트를 포함한다:
- [0239] e) 종양-항원으로서 FOLR-1의 경우 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 14,
- [0240] f) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 18 및 서열식별번호: 22,
- [0241] g) 종양-항원으로서 DLL3-4의 경우 서열식별번호: 26 및 서열식별번호: 30, 및
- [0242] h) 종양-항원으로서 CLDN 18.2의 경우 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 38.
- [0243] 한 실시양태에서 본 발명은 Mab-scFv 포맷의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다: 제1 결합 부분은 표 3에 기재된 바와 같은 군으로부터 선택된 가변 경쇄 및 가변 중쇄 세트를 포함하고,
- [0244] 제2 결합 부분은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 가변 경쇄 및 가변 중쇄 세트를 포함한다:
- [0245] a) 종양-항원으로서 FOLR1의 경우 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 14,
- [0246] b) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 18 및 서열식별번호: 22,
- [0247] c) 종양-항원으로서 DLL3의 경우 서열식별번호: 26 및 서열식별번호: 30, 및
- [0248] d) 종양-항원으로서 CLDN18.2의 경우 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 38.
- [0249] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0250] a) 상기 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이고,
- [0251] b) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하고 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로서 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 세트를 포함하는, Mab-scFv 포맷의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)이고:
- [0252] b1) 종양-항원으로서 FOLR1의 경우 서열식별번호: 10 및 서열식별번호: 14,
- [0253] b2) 종양-항원으로서 STEAP1의 경우 서열식별번호: 18 및 서열식별번호: 22,
- [0254] b3) 종양-항원으로서 DLL3의 경우 서열식별번호: 26 및 서열식별번호: 30, 및
- [0255] b4) 종양-항원으로서 CLDN18.2의 경우 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 38,
- [0256] a) 상기 이중특이적 항체는 중쇄로서 서열식별번호: 94의 중쇄 및 경쇄로서 서열식별번호: 93의 경쇄를 포함하는 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 종양-항원을 보유하는 제1 세포주의 용해에 대해 0.001 내지 0.2의 EC50 비율을 나타내고,
- [0257] b) 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 상기 종양-항원을 보유하지 않는 제2 세포주의 용해에 대해 5 내지 1000의 EC50 비율을 나타내며,
- [0258] 모두는 5:1의 E/T 비율로 활성화된 V γ 9V δ 2 T 림프구의 존재 하에, 12.5 IU/mL 인터류킨-2의 존재 하에, 및 동일한 조건 하에 동일한 검정에서 측정된다.
- [0259] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 제1 결합 부분이 CDR-이식된 또는 인간화 항체인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 인간 VH 프레임워크 (FRH)는 IGHV1-46*01 (X92343) 또는 IGHV4-34*01 (AB019439)의 것

이다. 한 실시양태에서 인간 VL 프레임워크 (FRL)는 IGKV3-11*01 V-KAPPA (X01668) 또는 IGKV1-12*01 V-KAPPA (V01577)의 것이다 (IMGT 레퍼토리 참조). 한 실시양태에서 인간 VH/VL 프레임워크 조합은 IGHV1-46*01 및 IGKV3-11*01, IGHV1-46*01 및 IGKV1-12*01, IGHV4-34*01 및 IGKV3-11*01, IGHV4-34*01 및 IGKV1-12*01의 것이다. 본 발명에 따라 프레임워크 서열은 4개 부분 (FRH1-4 및 FRL1-4)으로 이루어진다.

- [0260] 한 실시양태에서 본 발명은 인간 CD277에 특이적으로 및 효능작용적으로 결합하는 제1 결합 부분 및 종양-항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부분을 포함하는, Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체를 포함하며, 이는 하기를 특징으로 한다:
- [0261] a) 상기 제1 결합 부분은 포맷 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4의 가변 경쇄 (여기서 FRL1은 서열식별번호: 142의 것이고, FRL2는 서열식별번호: 143의 것이고, FRL3은 서열식별번호: 144 또는 145의 것이고, FRL4는 서열식별번호: 146의 것임) 및 포맷 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4의 가변 중쇄 (여기서 FRH1은 서열식별번호: 147의 것이고, FRH2는 서열식별번호: 148의 것이고, FRH3은 서열식별번호: 149의 것이고, FRH4는 서열식별번호: 150의 것임)를 포함하는 전장 2가 항체이고 (표 6 또는 7의 세트로부터 선택된 CDRH/CDRL 세트와 조합됨),
- [0262] c) 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어진다.
- [0263] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4의 서열로 이루어진 가변 경쇄 및 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4의 서열로 이루어진 가변 중쇄 또는 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3a-CDRL3-FRL4의 서열로 이루어진 가변 경쇄 및 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4의 서열로 이루어진 가변 중쇄 및 표 6 또는 7의 세트로부터 선택된 CDRH/CDRL 세트를 포함하는 인간화 항체인 것을 특징으로 한다.
- [0264] 한 실시양태에서 본 발명은 상기 제2 결합 부분이 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체로 이루어지는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 상기 제2 결합 부분은 상기 종양-항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 단일-쇄 Fv 항체 (scFv)로 이루어지며, 각각은 그의 N-말단에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 연결된다. 따라서, 제1 결합 부분 (전장 단일특이적 항-CD277 항체)의 Fc 부분의 각 C-말단에는 단 하나의 scFv만이 연결된다. 제1 결합 부분으로서 전장 2가 항체 및 제2 결합 부분으로서 상기 2개의 scFv로 이루어진 상기 이중특이적 항체의 포맷은 본원에서 "Mab-scFv 포맷"으로 명명된다. 예시적 Mab-scFv 포맷은 도 1a에 표시되어 있다.
- [0265] 한 실시양태에서 상기 scFv 각각은 제1 펩티드 링커 (링커1)에 의해 제1 결합 부분의 각 C-말단에 화학적으로 연결된다.
- [0266] 한 실시양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 상기 scFv가 펩티드 링커1-VL-펩티드 링커2-VH 배향으로 상기 C-말단에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0267] 한 실시양태에서 펩티드 링커는 서열식별번호: 97, 98, 99, 100 및 101의 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0268] 한 실시양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 상기 제1 펩티드 링커가 5-25개, 한 실시양태에서 10-25개의 아미노산으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0269] 한 실시양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 상기 제2 펩티드 링커가 10-25개의 아미노산으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0270] 한 실시양태에서 상기 이중특이적 항체는 상기 제2 세포주에서 배경 용해의 10배 이상, 한 실시양태에서 5배 이상, 한 실시양태에서 2배 이상인 유의한 용해를 유도하지 않는다.
- [0271] 본 발명의 한 실시양태에서 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 상기 제1 세포주의 용해에 대해 한 실시양태에서 0.2 이하, 한 실시양태에서 0.001 내지 0.2, 한 실시양태에서 0.005 내지 0.2, 한 실시양태에서 0.01 내지 0.2의 EC50 비율을 나타낸다.
- [0272] 한 실시양태에서 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체에 의한 용해와 비교하여 상기 제2 세포주의 용해에 대해 5 이상, 10 이상, 5 내지 1000, 한 실시양태에서 5 내지 2000, 한 실시양태에서 5 내지 5000, 한 실시양태에서 10 내지 1000, 한 실시양태에서 10 내지 2000, 한 실시양태에서 10 내지 5000의 EC50 비율을 나타낸다.
- [0273] 본 발명에 따른 EC50 비율은 세포 용해에 대해 측정된 바와 같은 EC50 값의 비율을 의미한다. 예시적 방법은 실시예 6에 기재되어 있다.

- [0274] 한 실시양태에서 상기 제2 종양-항원 음성 세포주는 상기 제1 세포주이며, 여기서 종양-항원은 불활성화된다 (녹아웃 세포주).
- [0275] 한 실시양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 상기 항체는 참조 항체와 비교하여 0.5 이상, 0.8 이상, 또는 0.9 이상의 Emax를 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 한 실시양태에서 상기 이중특이적 항체는 상기 참조 항체의 Emax와 비교하여 상기 제1 종양-항원 양성 세포주의 용해에 대해 0.5 내지 1.5, 한 실시양태에서 0.8 내지 1.5, 한 실시양태에서 0.9 내지 1.5의 Emax 비율을 나타낸다.
- [0276] 참조 항체는 중쇄로서 서열식별번호: 94의 중쇄 및 경쇄로서 서열식별번호: 93의 경쇄를 포함하는, 전장 2가 단 일특이적 효능작용성 항-CD277 항체이다. 참조 항체는 서열식별번호: 1의 가변 중쇄 및 서열식별번호: 5의 가 변 경쇄 및 서열식별번호: 2, 3, 4, 6, 7, 8의 CDR을 포함한다.
- [0277] 한 실시양태에서 본 발명은 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하며, 상기 종양-항원이 본 발명의 이중특이 적 항체를 내재화하지 않는 종양-항원인 것을 특징으로 한다.
- [0278] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 재조합 핵산 서열이다.
- [0279] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 벡터이다.
- [0280] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포이다.
- [0281] 한 실시양태에서 본 발명은 종양 질환의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0282] 한 실시양태에서 본 발명은 종양 질환의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0283] 한 실시양태에서 종양 질환은 결장 암종, 난소암, 폐암, 전립선암, 췌장암, 유방암으로 이루어진 군으로부터 선 택된다.
- [0284] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 상기 이중특이적 항체를 포함하는 제약 조성물이다.
- [0285] 한 실시양태에서 본 발명은 암을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 항체 또는 상기 이 중특이적 항체를 포함하는 제약 조성물을 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다.
- [0286] 본 발명에 따른 CD277 Mab 및 그의 특성은 표 3 및 5에 추가로 기재되어 있다. 한 실시양태에서 CD277 Mab는 제1 및 제2 서브유닛으로 구성된 Fc 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서 CD277 Mab는 제2 항원에 결합하는 제 2 항원 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서 제2 결합 부분은 종양-항원에 특이적으로 결합하는 scFv 분 자이고, 항체는 Mab-scFv 포맷이다.

도면의 간단한 설명

- [0287] 도 1a: 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 구조의 한 실시양태.
- 도 1b: BTN3A 효능제 (서열식별번호: 94 및 93의 HC 및 LC, "제2 이중특이적 항체") 및 종양-항원에 대한 이중 특이적 항체는 동일한 서열의 단일특이적 BTN3A 항체와 비교하여 종양-항원 보유 세포에서 향상된 효력을 나타 내지만, 동일한 BTN3A 항체 서열의 단일특이적 BTN3A 항체와 동일한 효력으로 종양-항원 음성 세포에 여전히 결 합한다 (하부 패널 참조). 이러한 "제2" 이중특이적 항체는 여전히 순환 및 정상 조직에서 Vg9Vd2 세포의 비특 이적 활성화를 야기한다. 반대로, 본 발명의 이중특이적 항체는 여전히 종양-항원 양성 세포에서 강한 효력을 나타내지만 BTN3A 효능제에 대한 "제2" 이중특이적 항체와 비교하여 종양-항원 음성 세포에서 더 낮은 효력을 나타낸다. 따라서, 예상치 못하게도, 본 발명의 이중특이적 항체는 요법에서 더 낮은 유해 부작용을 나타낸다.
- 도 2: FOLR1+ 및 FOLR1- 종양 세포에 대한 EvB#5의 활성화.
- 10,000개의 Ovcар-3 (FOLR1+) 또는 NCI-H1693 (FOLR1-) 세포를 완전 배지 (25 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 100 μg/ mL 스트렙토마이신, 100 U/ mL 페니실린 및 10% 소태아 혈청이 보충된 RPMI 1640)에서 배양하였다. 종양 세포의 밤새 부착 후, 5:1의 E/T 비율로 10 IU/mL rIL-2에서 표시된 농도의 항체 및 단기간 활성화된 Vg9Vd2 T 세포와 함께 추가 완전 배지에서 세포를 배양하였다. 종양 세포 자체의 자발적 용해에 대한 대조군으로, Vg 9Vd2 T 세포 또는 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다

("SL", 자발적 용해 대조군). 최대 용해에 대한 대조군으로, 최대 용해를 달성하기 위해 첨가된 Triton-X 세제를 갖고 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Triton X 100" 대조군). V_γ9V_δ2 T 세포에 의한 종양 세포의 배경 용해에 대한 대조군으로, 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Medium Ctrl"). 그 후, 90시간에 걸쳐 3분마다 세포 지수 (CI)를 측정하였다. 시점 tx에서 종양 세포의 용해는 하기와 같은 공식에 의해 계산되었다:

$$\text{종양 세포 용해(tx)} = (\text{CI(tx)} - \text{Medium Ctrl(tx)}) / (\text{Triton X100} - \text{Medium Ctrl(tx)}) * 100$$

그래프패드 프리즘 9를 사용한 S자형 용량-반응 함수를 사용하여 곡선 적합화를 수행하여 참조 항체로 달성된 최대 종양 세포 용해(tx)에 대한 최선-적합 값을 제공하였다 (상위 값). 참조 항체에 의해 달성된 최대 종양 세포 용해 ("Top")에 대한 % 종양 세포 용해는 하기 공식에 의해 계산되었다:

$$\% \text{ 종양 세포 용해(tx)} = \text{종양 세포 용해(tx)} / \text{Top} * 100.$$

도 2a)는 FOLR1+ Ovcар-3 종양 세포의 % 종양 세포 용해를 보여주고, 도 2b)는 24시간 시점에서 NCI-H1693 WT (FOLR1-) 세포의 % 종양 세포 용해 ± SD를 보여준다. 상이한 구축물에 대한 EC50 값이 표시된다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 0.12 nM의 농도에서 Ovcар-3 세포의 50% 사멸을 나타낸다. 24시간 시점에서 배경 용해 ± SD는 Medium Ctrl에 의해 표시된다. 도 2c)는 본 발명에 따른 scFv 포맷의 이중특이적 항체 및 역위 포맷의 이중특이적 항체에 대한 Ovcар-3 세포의 % 종양 세포 용해의 비교를 보여준다. (EvB#1: 항-종양-항원 항체의 2개의 scFv에 연결된 서열식별번호: 1 및 5의 VH/VL 조합의 전장 2가 항체; EvB#8: VH/VL로서 서열식별번호: 1 및 5의 조합된 2개의 scFv에 연결된 동일한 항-종양-항원 항체의 VH/VL 조합의 전장 2가 항체. 두 포맷 모두는 도 2d에 표시되어 있음).

도 3: 용해 효율의 통계적 분석.

통계적 분석은 0.1 nM의 농도에서 이중특이적 항체 EvB#5가 5:1의 E/T 비율로 활성화된 V_γ9V_δ2 T 림프구의 존재 하에 FOLR1을 보유하는 세포주 Ovcар-3의 48% 용해를 유도하는 반면 (도 3a), 상기 이중특이적 항체가 FOLR1을 보유하지 않는 NCI-H1693에서 동일한 검정에서 및 동일한 조건 하에 배경 용해 ("Medium Ctrl")보다 유의하게 높은 용해를 유도하지 않음을 입증한다 (도 3b). 차이의 유의성은 그래프패드 프리즘 9 소프트웨어를 사용하여 비쌍체 t-테스트에 의해 결정되고, 유의성의 정도는 하기와 같이 표시된다:

ns P > 0.05

* P ≤ 0.05

** P ≤ 0.01

*** P ≤ 0.001

그러므로, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 FOLR1+ Ovcар-3에 대한 V_γ9V_δ2 T 세포 세포독성을 향상시키고 FOLR1- NCI-H1693 세포에 대해서는 향상시키지 않는 반면, 참조 항체 ("Ref. Ab")는 FOLR1+ Ovcар-3 세포에 대한 V_γ9V_δ2 T 세포 세포독성을 향상시키지 않는다.

도 4. NCI-H1693sgNT (WT 대조군) 및 항원 1 녹아웃을 갖는 NCI-H1693sgNT (클론 27)에 대한 EvB#2의 활성화.

10,000개의 NCI-H1693sgNT (WT 대조군) 또는 클론 27 세포를 완전 배지에서 배양하였다. 종양 세포의 밤새 부착 후, 5:1의 E/T 비율로 12.5 IU/mL rIL-2에서 표시된 농도의 항체 및 단기간 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포와 함께 추가 완전 배지에서 세포를 배양하였다. 종양 세포 자체의 자발적 용해에 대한 대조군으로, V_γ9V_δ2 T 세포 또는 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("SL", 자발적 용해 대조군). 최대 용해에 대한 대조군으로, 최대 용해를 달성하기 위해 첨가된 Triton-X 세제를 갖고 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Triton X 100" 대조군). V_γ9V_δ2 T 세포에 의한 종양 세포의 배경 용해에 대한 대조군으로, 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Medium Ctrl"). 그 후, 90시간에 걸쳐 3분마다 세포 지수 (CI)를 측정하였다. 시점 tx에서 종양 세포의 용해는 하기와 같은 공식에 의해 계산되었다:

$$\text{종양 세포 용해(tx)} = (\text{CI(tx)} - \text{Medium Ctrl(tx)}) / (\text{Triton X100} - \text{Medium Ctrl(tx)}) * 100$$

그래프패드 프리즘 9를 사용한 S자형 용량-반응 함수를 사용하여 곡선 적합화를 수행하여 참조 항체로 달성된 최대 종양 세포 용해(tx)에 대한 최선-적합 값을 제공하였다 (상위 값). 참조 항체에 의해 달성된 최대 종양 세포 용해 ("Top")에 대한 % 종양 세포 용해는 하기 공식에 의해 계산되었다:

$$\% \text{ 종양 세포 용해}(tx) = \text{종양 세포 용해}(tx)/\text{Top} * 100$$

도 4a)는 항원 1+ NCI-H1693 sgNT 종양 세포의 % 종양 세포 용해를 보여주고, 도 4b)는 24시간 시점에서 항원 1- 클론 27 세포의 % 종양 세포 용해 ± SD를 보여준다. 상이한 구축물에 대한 EC50 값이 표시된다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 0.012 nM의 농도에서 NCI-H1693 sgNT 세포의 50% 사멸을 나타낸다. 24시간 시점에서 배경 용해 ± SD는 Medium Ctrl에 의해 표시된다.

도 5: 용해 효율의 통계적 분석.

통계적 분석은 0.01 nM의 농도에서 이중특이적 항체 EvB#2가 5:1의 E/T 비율로 활성화된 Vγ9Vδ2 T 림프구의 존재 하에 항원 1을 보유하는 세포주 NCI-H1693 sgNT의 61% 용해를 유도하는 반면 (도 5a), 상기 이중특이적 항체가 상기 종양-항원을 보유하지 않는 NCI-H1693 ko 세포 (클론 27)에서 동일한 검정에서 및 동일한 조건 하에 배경 용해보다 유의하게 높은 용해를 유도하지 않음을 입증한다 (도 5b). 차이의 유의성은 그래프패드 프리즘 9 소프트웨어를 사용하여 비쌍체 t-테스트에 의해 결정되고, 유의성의 정도는 하기와 같이 표시된다:

ns P > 0.05

* P ≤ 0.05

** P ≤ 0.01

*** P ≤ 0.001

그러므로, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 NCI-H1693sgNT에 대한 Vδ2+ γδ T-세포 세포독성을 향상시키고 ko 세포에 대해서는 향상시키지 않는 반면, 참조 항체 ("Ref. Ab")는 종양-항원 1 보유 NCI-H1693sgNT 세포에 대한 Vδ2+ γδ T-세포 세포독성을 향상시키지 않는다.

도 6: STEAP1+ 및 STEAP1- 종양 세포에 대한 EvB#3의 활성화.

10,000개의 UMUC-3 (STEAP1+) 또는 Ovcар-3 (STEAP1-) 세포를 완전 배지에서 배양하였다. 종양 세포의 밤새 부착 후, 5:1의 E/T 비율로 10 IU/mL rIL-2에서 표시된 농도의 항체 및 단기간 활성화된 Vγ9Vδ2 T 세포와 함께 추가 완전 배지에서 세포를 배양하였다. 종양 세포 자체의 자발적 용해에 대한 대조군으로, Vγ9Vδ2 T 세포 또는 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("SL", 자발적 용해 대조군). 최대 용해에 대한 대조군으로, 최대 용해를 달성하기 위해 첨가된 Triton-X 세제를 갖고 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 Vγ9Vδ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Triton X 100" 대조군). Vγ9Vδ2 T 세포에 의한 종양 세포의 배경 용해에 대한 대조군으로, 항체의 첨가 없이 12.5 IU/mL rIL-2를 갖는 배지에서 5:1의 E/T 비율로 단기간 활성화된 Vγ9Vδ2 T 세포와 함께 추가 웰의 종양 세포를 배양하였다 ("Medium Ctrl"). 그 후, 90시간에 걸쳐 3분마다 세포 지수 (CI)를 측정하였다. 시점 tx에서 종양 세포의 용해는 하기와 같은 공식에 의해 계산되었다:

$$\text{종양 세포 용해}(tx) = (\text{CI}(tx) - \text{Medium Ctrl}(tx)) / (\text{Triton X100} - \text{Medium Ctrl}(tx)) * 100$$

그래프패드 프리즘 9를 사용한 S자형 용량-반응 함수를 사용하여 곡선 적합화를 수행하여 참조 항체로 달성된 최대 종양 세포 용해(tx)에 대한 최선-적합 값을 제공하였다 (상위 값). 참조 항체에 의해 달성된 최대 종양 세포 용해 ("Top")에 대한 % 종양 세포 용해는 하기 공식에 의해 계산되었다:

$$\% \text{ 종양 세포 용해}(tx) = \text{종양 세포 용해}(tx)/\text{Top} * 100$$

도 6a)는 STEAP1+ UMUC-3 종양 세포의 % 종양 세포 용해를 보여주고, 도 6b)는 24시간 시점에서 STEAP1- Ovcар-3 종양 세포의 % 종양 세포 용해 ± SD를 보여준다 (tx). 상이한 구축물에 대한 EC50 값이 표시된다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 0.17 nM의 농도에서 UMUC-3 세포의 50% 사멸을 나타낸다. 24시간 시점에서 배경 용해 ± SD는 Medium Ctrl에 의해 표시된다.

도 7: 분자 클로닝 및 종양 앵커 카세트 교환.

도 8: FOLR1+ Ovcар-3 및 FOLR- 종양 세포의 % 세포 용해를 보여준다 (도 2 설명 참조). BTN3A 효능제 항체:

참조 항체; EvB#5: CDR 돌연변이가 없는 이중특이적 항체, EvB#47 및 EvB#52: 돌연변이를 갖는 이중특이적 항체, 예를 들어 표 2 참조).

도 9a: V_γ9V_δ2 T 세포 탈과립화 검정.

종양-항원 양성 세포의 부재 하에 V_δ2 T 세포의 탈과립화는 세포 표면의 CD107a 수준의 FACS 분석에 의해 모니터링하였다. 항체는 정맥내 투여 후 1차 분포 구획에서 더 높은 약물 수준을 반영하기 위해 효능있는 농도보다 10배 높은 농도로 적용되었다. 상부 패널은 항체가 없는 배지의 존재 하에 CD107a 표면 수준과 비교하여 참조 항체 20.1로 활성화 시 4명의 상이한 공여자로부터의 V_γ9V_δ2 T 세포의 유의한 탈과립화를 보여준다. 하부 패널은 항체가 없는 배지의 존재 하에 CD107a 표면 수준과 비교하여 본 발명의 항체의 존재 하에 4명의 상이한 공여자로부터의 V_γ9V_δ2 T 세포의 유의한 탈과립화가 없음을 보여준다.

도 9b: V_γ9V_δ2 T 세포 자기-제거 검정.

종양-항원 양성 세포의 부재 하에 V_δ2 T 세포의 자기-제거는 사이토스그린(SytoxGreen)을 사용한 사멸 세포의 염색 후 FACS 분석에 의해 모니터링하였다. 항체는 정맥내 투여 후 1차 분포 구획에서 더 높은 약물 수준을 반영하기 위해 효능있는 농도보다 10배 높은 농도로 적용되었다. 상부 패널은 항체가 없는 배지의 존재 하에 사멸 V_δ2 T 세포의 백분율과 비교하여 참조 항체 20.1로 활성화 시 4명의 상이한 공여자로부터의 V_δ2 T 세포의 유의한 사멸을 보여준다. 하부 패널은 본 발명의 항체의 존재 하에 4명의 상이한 공여자로부터의 V_δ2 T 세포의 유의한 사멸이 없음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0288] 본 발명자들은 앙베르 씨.(Imbert C.) 등의 W02012080351 및 W02012080769에서 언급된 바와 같이 효능작용성 뮤린 항-CD277 항체 (부모 항체, 20.1) 및 상기 항-CD277 항체로 이루어진 이중특이적 항체 및 이러한 이중특이적 항체에서 종양-항원에 대한 예시적 항체에 대한 종양-항원 양성 및 음성 세포에 대한 세포 용해를 조사하였다. 도 9에서 입증된 바와 같이, Mab-scFv 포맷의 이러한 이중특이적 항체는 각각의 단일특이적 항-CD277 항체보다 더 나은 종양 세포 용해를 나타낸다.
- [0289] 놀랍게도, 본 발명자들은 또한 CDR 중쇄 CDRH2 (서열식별번호: 44)에 2개의 점 돌연변이 (CDRH2 카운팅에서 N53S, K58N 또는 N5S 및 K10N으로도 지칭됨)를 갖는 상기 부모 항-CD277 항체를 포함하는 Mab-scFv 포맷의 이중특이적 항체가 종양-항원 양성 세포의 높은 용해를 제공하지만, 이들 돌연변이가 없는 부모 항체 및 항-종양-항원 항체로 이루어진 이중특이적 항체와 비교하여 종양-항원 음성 세포의 감소된 용해를 제공한다는 것을 발견하였다. 이 놀라운 효과는 항-CD277 항체 부분의 경쇄 CDRL1 (예를 들어, 서열식별번호: 75, 140, 141)에서의 추가 점 돌연변이 (CDRL1 카운팅에서 L31V, L8V)에 의해 더욱 개선된다. 따라서 본 발명은 이러한 이중특이적 항체 및 그의 인간화 버전을 제공한다.
- [0290] 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 CDRH2 치환에 더하여 CDRL1에 L8V의 치환을 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 CDRL1에 치환 L8V 및 H1R을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0291] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포"는 본 발명에 따라 V_γ9V_δ2 T 세포가 아미노비스 포스포네이트 (n-BP) 졸레드론산을 사용한 자극 및 재조합 IL2 (rIL2)의 첨가에 의해 활성화됨을 의미한다 (실시예 3 참조).
- [0292] 용어 "제1 결합 부분"은 전장 항체를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "전장 항체"는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이중사량체 당단백질을 지칭한다. 전장 항체는 가변 및 불변 도메인 및 Fc 부분을 포함하는 단일특이적 2가 항체이다. 전형적으로, 각 경쇄는 하나의 공유결합적 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설피드 연결의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소타입의 중쇄 간에 다르다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각 중쇄는 하나의 단부에 가변 도메인 (VH), 그 뒤에 수많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 하나의 단부에 가변 도메인 (VL) 및 다른 단부에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 전장 항체는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1 (CH1), 항체 힌지 영역 (HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2 (CH2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3 (CH3)으로 이루어지고, VH-CH1-HR-CH2-CH3으로 약칭된다. "전장 항체 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인 (VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인 (CL)으로 이루어지고, VL-CL로 약칭된다. 항체 경쇄 불변 도메인

(CL)은 κ (카파) 또는 λ (람다)일 수 있다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다 [Chothia et al., J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)]. 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 및 람다로 지칭되는 2개의 명확히 구별되는 유형 중 하나에 할당될 수 있다. 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 클래스에 할당될 수 있다. 이뮤노글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 주요 클래스가 있으며, 이들 중 여러개는 서브클래스 (이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; IgA1 및 IgA2로 추가로 나뉘질 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭된다.

[0293] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 획득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 지시된다.

[0294] 용어 "인간화 항체 또는 그의 인간화 버전"은 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역" (CDR)이 부모 이뮤노글로불린과 비교하여 상이한 특이성의 이뮤노글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 무린 CDR은 인간 항체의 프레임워크 영역에 이식되어 "인간화 항체 또는 버전"을 제조한다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327]; 및 [Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270]을 참조한다. 한 실시양태에서 인간 프레임워크는 IGHV1-46*01 (X92343) 또는 IGHV4-34*01 (ABO19439), IGKV3-11*01 V-KAPPA (X01668) 또는 IGKV1-12*01 V-KAPPA (V01577)이다. 본 발명에 포함되는 한 실시양태에서 불변 영역은 본 발명에 따른 특성, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체 (FcR) 결합과 관련된 특성을 생성하기 위해 원래 항체의 불변 영역으로부터 추가적으로 변형 또는 변경되었다.

[0295] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "가변 도메인"은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 지칭되는 3개의 세그먼트를 포함하는 항체 영역을 지칭한다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR 영역을 포함하며, 대체로 3개의 CDR에 의해 연결된 β -시트 구성을 채택하며, 이는 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하여 함께 유지되고, 다른 쇠로부터의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데 직접적으로 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존적 세포 독성에 항체의 참여를 나타낸다.

[0296] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다를 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 약 위치 Cys226의 아미노산 잔기 또는 약 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 영역의 카르복실-말단까지 뻗어 있는 것으로 정의된다 (본원에서 상기 문헌 [Kabat et al.]에 따른 numbering 시스템 사용). 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하며, 임의로 CH4 도메인 (IgE)을 포함한다.

[0297] 본원에서 "Fc 영역 쇠"는 Fc 영역의 2개의 폴리펩티드 쇠 중 하나를 의미한다.

[0298] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인" (" $C\gamma 2$ " 도메인으로도 지칭됨)은 일반적으로 약 위치 231의 아미노산 잔기로부터 약 위치 340의 아미노산 잔기까지 연장한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍형성되지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇠가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 끼어 있다. 탄수화물이 도메인-도메인 쌍형성의 치환물을 제공하고 CH2 도메인을 안정화시키는데 도움이 될 수 있다고 추측되었다. Burton, Mol. Immunol. 22:161-206 (1985). 본원에서 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변이체 CH2 도메인일 수 있다.

[0299] "CH3 도메인"은 Fc 영역의 CH2 도메인에 C-말단에 있는 잔기 (IgG의 약 위치 341의 아미노산 잔기로부터 약 위치 447의 아미노산 잔기까지)의 스트레치를 포함한다. 본원에서 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변이체 CH3 도메인 (예를 들어, 그의 한 사슬에 도입된 "돌기" 및 그의 다른 쇠에 도입된 상응하는 "공동"을 갖는 CH3 도메인; 미국 특허 번호 5,821,333 참조)일 수 있다.

[0300] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 약 Glu216 또는 약 Cys226으로부터 약 Pro230까지 뻗어 있는 것으로 정의된다 (Burton, Mol. Immunol. 22:161-206 (1985)). 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형

성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치함으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다. 본원에서 힌지 영역은 천연 서열 힌지 영역 또는 변이체 힌지 영역일 수 있다. 변이체 힌지 영역의 2개 폴리펩티드 쇄는 일반적으로 폴리펩티드 쇄당 적어도 하나의 시스테인 잔기를 유지하므로, 변이체 힌지 영역의 2개 폴리펩티드 쇄는 2개 쇄 사이에 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 본원에서 바람직한 힌지 영역은 천연 서열 인간 힌지 영역, 예를 들어 천연 서열 인간 IgG1 힌지 영역이다.

[0301] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 적어도 하나의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체 의존적 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합되어야 하며, 이러한 항체 이펙터 기능을 평가하기 위해 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다.

[0302] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 천연 서열 Fc 영역과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 부모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 가지며, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 부모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1개 내지 약 10개의 아미노산 치환, 및 바람직하게는 약 1개 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 부모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 서열 동일성을 보유할 것이고, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 동일성을 보유할 것이다.

[0303] IgG4 서브클래스의 항체는 감소된 Fc 수용체 (FcγRIIIa) 결합을 나타내는 반면, 다른 IgG 서브클래스의 항체는 강한 결합을 나타낸다. 그러나, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297, Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435는 변경되면 또한 감소된 Fc 수용체 결합을 제공하는 잔기이다 (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434). 한 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 IgG1 항체와 비교하여 감소된 FcγR 결합을 가지며, 전장 항체는 S228, L234, L235 및/또는 D265에 돌연변이를 갖는 IgG4 서브클래스 또는 IgG1 또는 IgG2 서브클래스의 것이고/거나, PVA236 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서 전장 항체의 돌연변이는 S228P, L234A, L235A, L235E 및/또는 PVA236이다. 또 다른 실시양태에서 전장 항체의 돌연변이는 IgG4 S228P 및 IgG1 L234A 및 L235A에 있다.

[0304] 추가 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG1 서브클래스, 또는 돌연변이 L234A 및 L235A를 갖는 인간 IgG1 서브클래스의 것임을 특징으로 한다. 추가 실시양태에서 본 발명에 따른 항체는 상기 전장 항체가 인간 IgG4 서브클래스, 또는 추가 돌연변이 S228P를 갖는 인간 IgG4 서브클래스의 것임을 특징으로 한다. 한 실시양태는 IgG4 서브클래스의 불변 중쇄 영역에 돌연변이 S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) 및 P329G (Pro329Gly), 또는 S228P (Ser228Pro) 및 P329G (Pro329Gly)를 포함한다.

[0305] 용어 "제2 결합 부분"은 단일-쇄 Fv 분자를 지칭한다. 제1 결합 부분의 Fc 부분의 각 C-말단에 하나의 동일한 단일-쇄 Fv 분자가 연결된다. 따라서, 제2 결합 부분은 2개의 단일-쇄 Fv 분자를 포함한다.

[0306] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "단일-쇄 Fv 분자 (scFv)"는 경쇄 (VL)의 가변 도메인이 폴리펩티드 쇄에 의해 그의 C-말단에서 중쇄 (VH)의 가변 도메인의 N-말단 단부까지 연결된 분자를 지칭한다. 대안적으로 scFv는 VH의 C-말단 단부가 폴리펩티드 쇄에 의해 VL의 N-말단 단부에 연결된 폴리펩티드 쇄로 구성된다.

[0307] 본 발명 내에서 사용된 바와 같은 용어 "펩티드 링커" 또는 "링커"는 바람직하게는 합성 기원의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 나타낸다. 본 발명에 따른 펩티드 링커는 단일-쇄 Fab 또는 scFv 단편을 전장 항체의 C-말단에 융합시키는데 사용된다. 바람직하게는 상기 펩티드 링커는 적어도 5개의 아미노산의 길이, 바람직하게는 5 내지 30개, 더욱 바람직하게는 10 내지 20개의 아미노산의 길이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 한 실시양태에서 상기 펩티드 커넥터는 (GxS)_n 또는 (GxS)_nGm이며, 여기서 G = 글리신, S = 세린, 및 (x = 3, n = 3, 4, 5 또는 6, 및 m = 0, 1, 2 또는 3) 또는 (x = 4, n = 2, 3, 4 또는 5, 및 m = 0, 1, 2 또는 3), 바람직하게는 x = 4 및 n = 2 또는 3, 더욱 바람직하게는 x = 4, n = 3이다. 한 실시양태에서 상기 펩티드 커넥터는 (G4S)₃이다. 유용한 펩티드 링커는 또한 서열식별번호: 97-101에 기재되어 있다.

[0308] 가변 영역은 직접 연결되거나, 전형적으로 기능적 항원 결합 모이어티의 형성을 허용하는 링커 펩티드를 통해 연결될 수 있다. 전형적인 펩티드 링커는 약을 포함하며, 본원에 기재되어 있거나 관련 기술분야에 공지되어

있다.

- [0309] scFv 분자는 예를 들어 문헌 [Reiter et al. (Nat. Biotechnol. 14, 1239-1245 (1996))]에 기재된 바와 같이 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 사이의 디설피드 브릿지에 의해 더욱 안정화될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서 본 발명의 T 세포 활성화 이중특이적 항원 결합 분자는 중쇄 가변 도메인의 아미노산 및 경쇄 가변 도메인의 아미노산이 시스테인에 의해 대체되어 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 사이에 디설피드 브릿지가 형성될 수 있는 scFv 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서 경쇄 가변 도메인의 위치 44의 아미노산 및 중쇄 가변 도메인의 위치 100의 아미노산이 시스테인에 의해 대체되었다 (카바트 넘버링).
- [0310] 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, scFv는 또한 (Miller et al., Protein Eng Des Sel. 2010 Jul;23(7):549-57; Igawa et al., MAbs. 2011 May-Jun;3(3):243-5; Perchiacca & Tessier, Annu Rev Chem Biomol Eng. 2012;3 :263- 86)에 기재된 바와 같이 CDR 서열의 돌연변이에 의해 안정화될 수 있다.
- [0311] 한 실시양태에서 scFv는 생산 수율을 개선하기 위해 단일-쇄 Fab 단편에 의해 대체될 수 있다. "단일-쇄 Fab 단편"은 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 항체 불변 도메인 1 (CH1), 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 링커로 이루어진 폴리펩티드이며, 여기서 상기 항체 도메인 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 하기 순서 중 하나를 갖고: a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL; 여기서 상기 링커는 적어도 30개 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개 아미노산의 폴리펩티드이다. 상기 단일-쇄 Fab 단편 a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 및 d) VL-CH1-링커-VH-CL은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 천연 디설피드 결합을 통해 안정화된다. 용어 "N-말단"은 N-말단의 마지막 아미노산을 나타내고, 용어 "C-말단"은 C-말단의 마지막 아미노산을 나타낸다.
- [0312] 본원에 기재된 항원 결합 구조물은 이중특이적이며, 일반적인 실시양태에서 이들은 각각 2개의 별개의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 결합 폴리펩티드 구조물을 포함한다. 제1 결합 부분은 전장 2가 항체이고, 제2 결합 부분은 Fc 부분이 없는 2개의 1가 항체 단편으로 이루어진다. 바람직한 실시양태에서 2개의 1가 항체 단편은 scFv 포맷 (즉, 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인으로 구성된 항원 결합 도메인)이다. 한 실시양태에서 상기 scFv 분자는 인간이다. 또 다른 실시양태에서 상기 제1 및 제2 결합 부분은 인간화된다.
- [0313] 바람직한 Mab-scFv 포맷을 나타내는 예시적 중쇄 (또한 도 1a 참조)는 서열식별번호: 102 (DLL3) 및 서열식별번호: 103 (CLDN18.2)에 표시되어 있다.
- [0314] "특이적 결합" 또는 "선택적 결합"은 결합이 항원에 대해 선택적이고 원치않는 또는 비특이적 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특이적 항원 결정기에 결합하는 항원 결합 모이어티의 능력은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술 (비아코어(BIAcore) 기기에서 분석됨)에 의해 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 관련없는 단백질에 대한 항원 결합 모이어티의 결합 정도는 SPR에 의해 측정된 바와 같이 항원에 대한 항원 결합 모이어티의 결합의 약 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만이다.
- [0315] 본 발명에 따른 용어 "EC50 비율"은 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 대한 값이 분자 (위)이고 참조 항체에 대한 값이 분모 (아래)인 비율을 의미한다.
- [0316] 한 실시양태에서 상기 제2 종양-항원 음성 세포주는 종양-항원이 불활성화된 상기 제1 세포주이다 (녹아웃 세포주; ko 세포주).
- [0317] 본 발명의 한 실시양태에서 상기 이중특이적 항체는 상기 제1 종양-항원 양성 세포주의 용해에 대해 상기 참조 항체의 Emax와 비교하여 0.5 내지 1.5의 Emax 비율을 나타낸다. 용해는 종양 세포의 임피던스를 모니터링함으로써 측정된다 (실시예 6 참조).
- [0318] 본원에서 사용될 때 용어 "상기 종양-항원을 보유하지 않는 인간 세포의 용해를 유도하지 않음"은 배경 용해와 유의하게 상이하지 않은 (p 값>0.05) 12.5 IU/mL 인터튜킨-2의 존재 하에 5:1의 E/T 비율로 활성화된 Vγ9Vδ2 T 림프구의 존재 하에 측정된 본 발명의 항체에 의한 종양 세포의 용해를 지칭한다. 배경 용해는 항체의 첨가 없이 동일한 조건 하에 동일한 검정에서 측정된다 ("Medium Ctrl").
- [0319] 본원에서 사용된 바와 같은 "CD277 결합"은 BTN3A1, BTN3A2 및/또는 BTN3A3에 대한 결합을 의미한다.
- [0320] "친화성"은 분자 (예를 들어, CD277)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항-CD277 항체) 간의 상호작용 강도를 지칭하며, 해리 상수 (kD)로 표시되며, 이는 해리 속도 상수 및 회합 속도 상수 (각각 koff 및 kon)의 비율이다. 그러므로, 속도 상수의 비율이 동일하게 유지되는 한 동등한 친화성은 상이한 속도 상수를 포함할 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 방법을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 잘 확립된 방법에 의해 측

정될 수 있다. 친화성을 측정하기 위한 특정 방법은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)이다.

- [0321] 본원에서 사용된 바와 같은 "친화성 성숙 항체"는 그의 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하며, 이는 이러한 변경(들)을 보유하지 않는 부모 항체와 비교하여 항-CD277 항체의 친화성의 감소를 초래한다. 감소된 친화성을 갖는 바람직한 친화성 성숙 항체는 CD277에 대해 나노몰 내지 마이크로몰 범위의 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙 항체는 알려진 스캔 (Tiller KE et al.; *Front. Immunol.*, 04 September 2017 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00986>) 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 절차 (예를 들어 문헌 [Tabasinezhada M. et al.; *Immunology Letters Volume 212*, August 2019, Pages 106-113]; [I.Georgiev, I. S. et al. *J Immunol* 192, 1100-1106 (2014)] 참조)에 의해 생산될 수 있다.
- [0322] 본원에서 사용될 때 용어 "효능제" 및 "효능작용성"은 V γ 9V δ 2 T 세포의 생물학적 활성 또는 활성화를 직접 또는 간접적으로 실질적으로 유도, 촉진 또는 향상시킬 수 있는 분자를 지칭하거나 기재한다 (V δ TCR에 대한 면역학적 시냅스의 형성을 촉진함으로써). 임의로, "효능제 CD277 항체"는 CD277의 결합 및 활성화에 의해 V γ 9V δ 2 T 세포의 상기 언급된 활성화를 달성하는 활성을 갖는 항체이다. 바람직하게는, 효능제는 인간 및 사이노물구스 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화시킬 수 있는 분자이다. 더욱 더 바람직하게는, 효능제는 CD277에 대한 항체이고, 상기 항체는 항체 20.1보다 5배 덜 강력한 효능제 활성을 갖는다. 이러한 항체의 효능제 활성은 실시예 6에 기재된 검정에 의해 결정될 수 있다.
- [0323] "종양-항원에 대한 특이적 결합"은 결합이 종양-항원에 대해 선택적이고 원치않는 또는 비특이적 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특이적 종양-항원에 결합하는 본 발명에 따른 이중특이적 항체 (또는 제2 결합 부분)의 능력은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙한 다른 기술, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술 (비아코어 기구에서 분석됨) (Liljeblad et al., *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), 및 전통적인 결합 검정 (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 관련없는 단백질에 대한 결합 정도는 예를 들어 SPR에 의해 측정된 바와 같이 종양-항원에 대한 본 발명에 따른 이중특이적 항체 (또는 제2 결합 부분)의 결합의 약 10% 미만이다.
- [0324] 본원에서 사용된 바와 같이, 본 발명에 따른 용어 "CD277에 특이적으로 결합하는 효능작용성 항체"는 이러한 항체가 V γ 9/V δ 2 T 세포의 세포용해 기능, 시토키인 생산 및 증식을 활성화시킨다는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 관련없는 단백질에 대한 결합 정도는 예를 들어 SPR에 의해 측정된 바와 같이 종양-항원에 대한 본 발명에 따른 이중특이적 항체 (또는 제2 결합 부분)의 결합의 약 10% 미만이다. 한 실시양태에서 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 5 nM 이하, 한 실시양태에서 20 nM 이하의 농도에서 실시예 6에 기재된 바와 같은 세포 용해 검정에서 상기 각각의 종양-항원을 보유하는 종양 세포의 부재 하에 V γ 9/V δ 2 T 세포의 세포용해 기능, 시토키인 생산 및 증식을 활성화시키지 않는다.
- [0325] 본원에서 사용된 바와 같은 "종양-항원 녹아웃 세포주 또는 녹아웃 세포주"는 야생형 버전에서 각각의 종양-항원을 보유하는 종양 세포주를 지칭하며, 여기서 각각의 종양-항원 유전자는 불활성화된다. 본 발명에 따라 CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 상기 유전자의 유전적 변이체를 도입하고 그러므로 상기 항원 발현을 불활성화시킬 수 있다.
- [0326] 용어 "종양-항원"은 종양-특이적 항원 (TSA) 및 종양-연관 항원 (TAA)을 포함하여 종양 세포 표면에 제시된 항원을 의미한다. 바람직한 실시양태에서 종양-항원은 클라우딘18.2, FOLR1, STEAP 또는 DLL3이다. 추가로 유용한 종양-항원은 예를 들어 문헌 [Middleburg et al., *Cancers* (2021) 13, 287, pp 4-6]에 기재되어 있다. FOLR1과 같은 일부 종양-항원은 천연 리간드, 예컨대 폴레이트 (Cheung et al., *Oncotarget*, 7 (32), 2016, pp 52553-32574) 또는 치료적 항체 (Paulos et al., *Molecular Pharmacology*, 66 (6), 2004, pp 1406-1414)에 의해 결합된 후 내재화된다.
- [0327] 따라서, V γ 9V δ 2 T 세포의 동원과 관련된 이용률이 감소되고 본 발명에 따른 이중특이적 항체가 공동-내재화되어 세포 표면의 CD277-수용체를 고갈시킬 수 있으며 그 반대도 마찬가지이다. 이러한 경우, 수용체는 면역 세포의 V γ 9V δ 2 T 세포 수용체와 접촉하는 면역학적 시냅스의 형성에 더 이상 이용가능하지 않을 것이다. 따라서, 본 발명에 따라, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 각각의 항체의 결합 후 내재화되지 않은 종양-항원에 결합하거나, 세포 표면에서 (공동)내재화 후 남아있는 종양-항원 및 CD277 수준이 V γ 9V δ 2 T 세포 활성화를 촉발하기에 여전히 충분한 정도로만 결합하는 것이 바람직하다.
- [0328] 바람직하게는 본 발명에 따른 종양-항원은 항원 보유 종양 세포 뿐만 아니라 항원 음성 세포인 두 세포 모두가 각각의 이중특이적 항체 또는 참조 항체로 8시간 동안 처리되었다는 점에서 선택된다. 다음으로, V γ 9V δ 2 T

세포를 첨가하고, 표면 노출된 및 활성화된 CD277에 의한 % 종양 세포 용해를 실시예 6에 기재된 바와 같이 측정한다. 곡선 적합화에 의해 Emax 값을 획득하고, 이중특이적 항체 대 참조 항체에 대한 Emax 비율을 각 세포주에 대해 각각 계산한다. 항원 보유 종양 세포에서의 Emax 비율은 종양-항원을 보유하지 않는 세포에서의 Emax 비율의 절반보다 작아서는 안되며, 이는 종양-항원의 존재가 항원-보유 종양 세포에서 이중특이적 항체에 의한 CD277의 공동-내재화로 인해 50% 초과 활성화 손실로 이어지지 않았음을 나타낸다.

- [0329] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "Emax"는 시험관내 또는 생체내 검정에서 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 임의의 농도에 의해 유도된 반응을 지칭하며, 이는 최대 반응이다.
- [0330] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "EC50"은 시험관내 검정에서 반응을 유도하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 농도를 지칭하며, 이는 최대 반응의 50%, 즉, 최대 반응과 기준선의 중간 지점이다.
- [0331] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "KD 또는 K_D "는 항체와 항원 간의 결합 반응의 평형 해리 상수를 지칭한다.
- [0332] 본 발명에 따른 항체는 재조합 수단에 의해 생산된다. 그러므로, 본 발명의 한 실시양태는 본 발명에 따른 항체를 코딩하는 핵산이고, 추가 실시양태는 본 발명에 따른 항체를 코딩하는 상기 핵산을 포함하는 세포이다. 재조합 생산 방법은 최신 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 원핵생물 및 진핵생물 세포에서 단백질 발현을 포함하고, 후속적으로 항체를 단리하고, 일반적으로 제약상 허용되는 순도로 정제한다. 숙주 세포에서 본 발명의 항체의 발현을 위해, 각각의 변형된 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산은 표준 방법에 의해 발현 벡터에 삽입된다. 발현은 적절한 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 이. 콜라이(*E. coli*) 세포에서 수행되고, 항체는 세포 (상청액 또는 용해 후 세포)로부터 회수된다. 항체의 재조합 생산을 위한 일반적인 방법은 최신 기술 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202]; [Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282]; [Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160]; [Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880]의 검토 논문에 기재되어 있다.
- [0333] 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리된다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA 및 RNA는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 시퀀싱된다.
- [0334] 본 출원에서 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 나타낸다. 한 실시양태에서 HEK293 세포 및 CHO 세포가 숙주 세포로서 사용된다.
- [0335] 본 발명의 한 측면은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 제약 조성물이다. 본 발명의 또 다른 측면은 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다. 본 발명의 추가 측면은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 제약 조성물을 제조하는 방법이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약 담체와 함께 제형화된, 본 발명에 따른 항체를 함유하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 제공한다.
- [0336] 본 발명의 한 실시양태는 암 (종양 질환)의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0337] 본 발명의 또 다른 측면은 암 치료에 사용하기 위한 상기 제약 조성물이다.
- [0338] 본 발명의 또 다른 측면은 암 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- [0339] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하는 방법이다.
- [0340] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 제약 조성물이다.
- [0341] 본원에서 사용된 바와 같은 "제약 담체"는 생리학적으로 양립가능한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하다.
- [0342] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 화합물을 특정 투여 경로에 의해 투여하기 위해, 불활성화를 방지하는 물질로 화합물을 코팅하거나 화합물을 이와 함께 공동-투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어 리포솜 또는 희석제에서 대상체에게 투여될 수 있다. 제약상 허용되는 희석제는 식염수 및 수성 버퍼 용액을 포함한다. 제약 담체는

멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약상 활성인 물질에 대한 이러한 배치 및 작용제의 용도는 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0343] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 암은 증식성 질환, 예컨대 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐암 (NSCL), 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위 암, 위장암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 호지킨병을 지칭한다.

[0344] 한 측면에서, 상기 암 (종양 질환)은 결장 암종, 난소암, 폐암, 전립선암, 췌장암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

표 1 서열 목록		
서열 번호:	하기에 관련됨	서열
SEQ ID NO:1	부모 VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYLY WVKQRPGQGLEWIGEINPNNGGTFNEKFKSKATL TVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGTP DAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:2	CHRH1	RYYLY
SEQ ID NO:3	CDRH2	EINPNNGGTFNEKFKS
SEQ ID NO:4	CDRH3	EDDYDGTPDAMDY
SEQ ID NO:5	부모 VL	DIQMNQSPSSLSASLGDITITCHASQNINLWLSWY QQRPGNIPKLLIYRASNLTGVPSRFSGSGSATGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGHSYPYTFGGGKLDIK
SEQ ID NO:6	CDRL1	HASQNINLWLS
SEQ ID NO:7	CDRL2	RASNLT
SEQ ID NO:8	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:9	SEQ ID 12 EvB#5: 중쇄 단백질 (리더 있음): 항-FOLR1 scFv	MGWSYIILFLVTTATGVHSQVQLQQSGAELVKPGA SVKLSCKASGYTFTRYLYWVKQRPGQGLEWIGEI NPNGGTFNEKFKSKATLTVDKSSRTTYIQLSSLT SEDSAVYYCSREDDYDGTPDAMDYWGQGTAVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQS PSSLSASVGDRTITCSVSSISSNNLHWYQQKPGK APKRWIYGTSNLSGVPSRFSGSGGTDYFTISSLQ PEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGGGKVEIKGGGGS

[0345]

		GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSG GSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSL RPE DTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSS
SEQ ID NO:10	FOLR1-VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSISNNLHWY QQKPGKAPKPIWYGTSNLASGVPSRFSGSGSDTYT FTISSLQPEDATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEI K
SEQ ID NO:11	CDRL1	SVSSSISNNLH
SEQ ID NO:12	CDRL2	GTSNLAS
SEQ ID NO:13	CDRL3	QQWSSYPYMYT
SEQ ID NO:14	FOLR1-VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLS WVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTTYADSVKGRFA ISRDNANTLFLQMDSL RPE DTGVYFCARHGDDPA WFAYWGQGPVTVSS
SEQ ID NO:15	CDRH1	GFTFSGYGLS
SEQ ID NO:16	CDRH2	MISGGSYTTYADSVKG
SEQ ID NO:17	CDRH3	HGDDPAWFAY
SEQ ID NO:18	STEAP1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQLLYRSNQK NYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGS GGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQYYNYPRTFGQG TKVEIK
SEQ ID NO:19	CDRL1	QSLLYRSNQKNYLA
SEQ ID NO:20	CDRL2	LIYWASTRES
SEQ ID NO:21	CDRL3	QYYNYPR
SEQ ID NO:22	STEAP1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAW NWVRQAPGKGLEWVGYSISNGSTSYNPSLKSRTIS RDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERNYDYD DYYYAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO:23	CDRH1	YSITSDYAWN
SEQ ID NO:24	CDRH2	WVGYSISNGSTSY
SEQ ID NO:25	CDRH3	RERNYDYDDYYYAMDY

[0346]

SEQ ID NO:26	DLL3-4 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAW YQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSDFT LTISRLEPEDFAVYYCQYDRSPLTFGGGKLEIK
SEQ ID NO:27	CDRL1	RASQRVNNNYLA
SEQ ID NO:28	CDRL2	GASSRAT
SEQ ID NO:29	CDRL3	QYDRSPLT
SEQ ID NO:30	DLL3-4 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSW IRQPPGKGLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDY WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:31	CDRH1	SYYS
SEQ ID NO:32	CDRH2	YVYYSGTTNYPNPSLKS
SEQ ID NO:33	CDRH3	IAVTGFYFDY
SEQ ID NO:34	CLDN 18.2-VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQLLNSGNQK NYLTWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSG TKLEIK
SEQ ID NO:35	CDRL1	QSLNSGNQKNYLT
SEQ ID NO:36	CDRL2	LLIYWASTRES
SEQ ID NO:37	CDRL3	QNDYSYPF
SEQ ID NO:38	CLDN 18.2-VH	QVQLQQGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWIN WVKQRPGGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSF DYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:39	CDRH1	YTFTSYWIN
SEQ ID NO:40	CDRH2	WIGNIYPSDSYTN
SEQ ID NO:41	CDRH3	RSWRGNSFDY
SEQ ID NO:42	VH-N185S- K190N	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYLY WVKQRPGGLEWIGEINPSNGGTNFNEKFKSKATL TVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGRP DAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:43	CDRH1	RYLY
SEQ ID NO:44	CDRH2	EINPSNGGTNFNEKFKS
SEQ ID NO:45	CDRH3	EDDYDGRPAMDY

[0347]

SEQ ID NO:46	VH-R162S-Y164W	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWLY WVKQRPQGQLEWIGEINPNNGGTFNEKFKSKATL TVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGTP DAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:47	CDRH1	SYWLY
SEQ ID NO:48	CDRH2	EINPNNGGTFNEKFKS
SEQ ID NO:49	CDRH3	EDDYDGTPDAMDY
SEQ ID NO:50	VH-클러스터1-2:	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWM HWVKQRPQGQLEWIGEINPSNGRTNYNEKFKSKAT LTVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGT PDAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:51	CDRH1	SYWMH
SEQ ID NO:52	CDRH2	EINPSNGRTNYNEKFKS
SEQ ID NO:53	CDRH3	EDDYDGTPDAMDY
SEQ ID NO:54	VH-클러스터1:	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWM HWVKQRPQGQLEWIGEINPNNGGTFNEKFKSKAT LTVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGT PDAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:55	CDRH1	SYWMH
SEQ ID NO:56	CDRH2	EINPNNGGTFNEKFKS
SEQ ID NO:57	CDRH3	EDDYDGTPDAMDY
SEQ ID NO:58	VH-클러스터2	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYLY WVKQRPQGQLEWIGEINPSNGRTNYNEKFKSKATL TVDKSSRTTYIQLSSLTSEDSAVYYCSREDDYDGTP DAMDYWGQGTAVTVSS
SEQ ID NO:59	CDRH1	RYLY
SEQ ID NO:60	CDRH2	EINPSNGRTNYNEKFKS
SEQ ID NO:61	CDRH3	EDDYDGTPDAMDY
SEQ ID NO:62	VH-46_1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYLY YWVRQAPQGQLEWIGEINPSNGGTNFNEKFKSRVT LTVDKSTRTTYIELSSLRSEDYAVYYCSREDDYDGT PDAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO:63	CDRH1	RYLY
SEQ ID NO:64	CDRH2	EINPSNGGTNFNEKFKS

[0348]

SEQ ID NO:65	CDRH3	EDDYDGTPDA MDY
SEQ ID NO:66	VH-46_1B	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYYMYWVRQA PGQGLEWMGE INPSNGGTNF AQKFQGRVTM TVDKSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCSRED DYDGTPDAMD YWGQGLTVTV SS
SEQ ID NO:67	CDRH1	RYYMY
SEQ ID NO:68	CDRH2	EINPSNGGTN FAQKFQG
SEQ ID NO:69	CDRH3	EDDYDGTPDA MDY
SEQ ID NO:70	VH-34_01A	QVQLQSGAG LLKPSETLSL TCAAYGYTFT RYYLYWVRQP PGKGLEWIGE INPSNGGTNF NEKLSRVTL SVDKSKRQTS IKLSSVTAAD TAVYYCSRED DYDGTPDAMD YWGQGLTVTV SS
SEQ ID NO:71	CDRH1	RYYLY
SEQ ID NO:72	CDRH2	EINPSNGGTN FNEKLKS
SEQ ID NO:73	CDRH3	EDDYDGTPDA MDY
SEQ ID NO:74	경쇄 - L31V- R39K-R50K- A68G-H92Q- Y96L	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINWLSWY QQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLDIK
SEQ ID NO:75	CDRL1	HASQNIN <u>Y</u> WLS
SEQ ID NO:76	CDRL2	KASNLHT
SEQ ID NO:77	CDRL3	QGQSYPLT
SEQ ID NO:78	경쇄 - L31V- H92Q-Y96L	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINWLSWY QQRPGNIPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSATGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLDIK
SEQ ID NO:79	CDRL1	HASQNINWLS
SEQ ID NO:80	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:81	CDRL3	QGQSYPLT

[0349]

SEQ ID NO:82	경쇄 - H92Q-Y96L:	DIQMNQSPSSLASLGDTTTTCHASQNINLWLSWY QQRPGNIPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSATGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLDIK
SEQ ID NO:83	CDRL1	HASQNINLWLS
SEQ ID NO:84	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:85	CDRL3	QGQSYPLT
SEQ ID NO:86	경쇄 - L31V:	DIQMNQSPSSLASLGDTTTTCHASQNINVWLSWY QQRPGNIPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSATGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGHSYPYTFGGGTKLDIK
SEQ ID NO:87	CDRL1	HASQNINWLS
SEQ ID NO:88	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:89	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:90	IGF-1R VH	QVELVESGGGVVQGRSQRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKLEWVAIIWFDGSSYYADSVRGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYF DLWGRGTLVSVSS
SEQ ID NO:91	IGF-1R VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISLLEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVES K
SEQ ID NO:92	EvB#3 전장 CD277- STEAP1 (VH)	MGWSYIILFLVTTATGVHSQVQLQQSGAELVKPGA SVKLSCKASGYTFTRYLYWVKQRPQGLEWIGEI NPNNGGTFKNEKFKSKATLTVDKSSRTTYIQLSSLT SEDSAVYYCSREDDYDGTDPAMDYWGQGTAVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGGGGSDIQMTQS

[0350]

		PSSLSASVGDVRTITCKSSQSLLYRSNQKNYLAWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQYYNYPRFTFGQGTKVEIKGG GGSGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAVSGYSITSDYAWNWRQAPKGLEWVG YISNSGSTSYPNPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARERNYDYDDYYYAMDYWGQGLV TVSS
SEQ ID NO:93	EvB#3 전장 LC (참조 LC)	MRVLAELLGLLLFCFLGVRCDIQMNQSPSSLSASLG DTITITCHASQINLWLSWYQQRPGNIPKLLIYRASN LHTGVPSRFSGSGSATGFTLTISLQPEDIATYYCQQ GHSYPYTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEV THQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:94	전장 HC (참조 HC)	MGWSYIILFLVTTATGVHSQVQLQQSGAELVKPGA SVKLSCKASGYTFTRYLYLVWVKRPGQGLEWIGEI NPNNGGTFNEKFKSKATLTVDKSSRTTYIQLSSLT SEDSAVYYCSREDDYDGTDPAMDYWGQGTAVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:95	참조 HC 리더	MGWSYIILFLVTTATGVHS
SEQ ID NO:96	RNA 서열	CAAGGAAAAGCCAGGCCCG
SEQ ID NO:97	링커 1	GGGGSGGGGGGGGG
SEQ ID NO:98	링커 2	GGGGSGGGGGGGGGGG

[0351]

SEQ ID NO:99	링커 3	GSAPAPAPAPAP
SEQ ID NO:100	링커 4	APAPAPAPAP
SEQ ID NO:101	링커 5	APAPAPAPAPAPAPAPAP
SEQ ID NO:102	EvB#4-HC	MGWSYIILFLVTTATGVHSQVQLQSGAELVKPGA SVKLSCKASGYTFTRYLYWVKQRPGGLEWIGEI NPNNGGTFNEKFKSKATLTVDKSSRTTYIQLSSLT SEDSAVYYCSREDDYDGTDPAMDYWGQGTAVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGGSEIVLTQSP GTLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEP EDFAVYYCQYDRSPLTFGGGKLEIKGGGGSGGG GSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYVYYSGTTN YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CASIAVTGFYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:103	EvB#6-HC	MGWSYIILFLVTTATGVHSQVQLQSGAELVKPGA SVKLSCKASGYTFTRYLYWVKQRPGGLEWIGEI NPNNGGTFNEKFKSKATLTVDKSSRTTYIQLSSLT SEDSAVYYCSREDDYDGTDPAMDYWGQGTAVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

[0352]

		APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQS PSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFT LTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIKG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQPGAELVRPG ASVKLSCKASGYFTFSYWINWVKQRPQGLEWIGN IYPSDSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSP TSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:104	VH-34_1B	QVQLQQSGAGLLKPSSETLSLTCAAYGGTFT RYYWYWVRQPPGKLEWIGEINPSNGGTNFNEKL KSRVTLSDKSKRQTSIKLSSVTAADTAVYYCSRED DYDGTDPAMDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:105	CDRH1	RYYWY
SEQ ID NO:106	CDRH2	EINPSNGGTN FNEKLKS
SEQ ID NO:107	CDRH3	EDDYDGTDPAMDY
SEQ ID NO:108	VH-34_1C	QVQLQQSGAGLLKPSSETLSLTCAAYGYTFSRYLY WIRQPPGKLEWIGEINPSNGGTNFNESLKSRTISV DKSKNQTSKLSSVTAADTAVYYCSREDDYDGTDP AMDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:109	CDRH1	RYYLY
SEQ ID NO:110	CDRH2	EINPSNGGTNFNESLKS
SEQ ID NO:111	CDRH3	EDDYDGTDPAMDY
SEQ ID NO:112	VH-334_1D	QVQLQQSGAGLLKPSSETLSLTCAAYGGTFSRYWY WIRQPPGKLEWIGEINPSNGGTNFNESLKSRTISV DKSKNQTSKLSSVTAADTAVYYCSREDDYDGTDP AMDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:113	CDRH1	RYYWY
SEQ ID NO:114	CDRH2	EINPSNGGTNFNESLKS
SEQ ID NO:115	CDRH3	EDDYDGTDPAMDY

[0353]

SEQ ID NO:116	VL-12_1A	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTITCHASQNINLWLSWY QQKPGKAPKLLIYRASNLHTGVPSRFGSGSATDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:117	CDRL1	HASQNINLWLS
SEQ ID NO:118	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:119		
SEQ ID NO:120	VL-12_1B	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTICRASQGISSWLSWY QQKPGKAPKLLIYRASNLHTGVPSRFGSGSATDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:121	CDRL1	RASQGISSWLS
SEQ ID NO:122	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:123	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:124	VL-12_1C	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTICRASQGISSWLSWY QQKPGKAPKLLIYRASNLHTGVPSRFGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:125	CDRL1	RASQGISSWLS
SEQ ID NO:126	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:127	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:128	VL-11_1A	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCHASQNINLWLSWY QQKPGQAPRLLIYRASNLHTGIPARFSGSGSATDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:129	CDRL1	HASQNINLWLS
SEQ ID NO:130	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:131	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:132	VL-11_1B	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLSWY QQKPGQAPRLLIYRASNLHTGIPARFSGSGSATDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:133	CDRL1	RASQSVSSWLS
SEQ ID NO:134	CDRL2	RASNLHT
SEQ ID NO:135	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:136	VL-11_1C	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSWLSWY QQKPGQAPRLLIYRASNRHTGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQGHSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:137	CDRL1	RASQSVSSWLS

[0354]

SEQ ID NO:138	CDRL2	RASNRHT
SEQ ID NO:139	CDRL3	QGHSYPYT
SEQ ID NO:140	CDRL1 (EvB#52)	RASQGISVWLS
SEQ ID NO:141	CDRL1a (EvB#52)	RASQSVSVWLS
SEQ ID NO:142	FRL1	DIQMTQSPSS VSASVGDRVTTIC
SEQ ID NO:143	FRL2	WYQQKPGKAP KLLIY
SEQ ID NO:144	FRL3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
SEQ ID NO:145	FRL3a	GIPARFSGSGSATDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ
SEQ ID NO:146	FRL4	FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:147	FRH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
SEQ ID NO:148	FRH2	WVRQAPGQGLEWIG
SEQ ID NO:149	FRH3	RVTISVDKSKNQTSLKLSVTAADTAVYYCSR
SEQ ID NO:150	FRH4	WGQGTLVTVSS

[0355]

[0356] 각 VH 또는 VL 다음의 서열 목록에서, 각각의 CDR이 나열되어 있다. 여러 VH 및 VL은 하나 이상의 동일한 CDR

을 포함한다:

- [0357] 서열식별번호: 2는 서열식별번호: 43, 59, 63, 71, 109와 동일하다.
- [0358] 서열식별번호: 4는 서열식별번호: 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 107, 111, 115와 동일하다.
- [0359] 서열식별번호: 7은 서열식별번호: 80, 84, 88, 118, 122, 126, 130, 134와 동일하다.
- [0360] 서열식별번호: 8은 서열식별번호: 119, 89, 123, 127, 131, 135, 139와 동일하다.
- [0361] 서열식별번호: 44는 서열식별번호: 64와 동일하다.
- [0362] 서열식별번호: 47 단일 SEQ
- [0363] 서열식별번호: 51은 서열식별번호: 54와 동일하다.
- [0364] 서열식별번호: 67 단일 SEQ
- [0365] 서열식별번호: 75는 서열식별번호: 79, 87과 동일하다.
- [0366] 서열식별번호: 105는 서열식별번호: 113과 동일하다.
- [0367] 서열식별번호: 138 단일 SEQ
- [0368] 재료 및 방법
- [0369] 세포 배양, 형질감염, 항체 생산 및 정제: CHO-S 세포 (프리스타일(FreeStyle)TM, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))를 코닝(Corning)[®] 에를렌마이어 플라스크 (125 ml, 코닝, 인크.(Corning, Inc.))에서 37 °C 및 5% CO₂에서 일정하게 교반하면서 (120 rpm) 보관하였다. 세포를 1% (v/v) 글루타맥스 100x 및 1% (v/v) HT 보충제 100x (써모 피셔 사이언티픽)가 보충된 CD CHO 성장 배지 (김코(Gibco)[®]/써모 피셔 사이언티픽)에서 보관하였다. 격일로, 세포를 지수적 성장을 유지하기 위해 0.3 x 10⁶개 세포/ml의 밀도로 조정하였다. 형질감염 하루 전에, 세포를 형질감염 당일에 4 x 10⁶개 세포/ml의 원하는 밀도에 도달하기 위해 2 x 10⁶개 세포/ml의 밀도로 시딩하였다. 제조업체의 지침서에 따라 맥스사이트(MaxCyte) STXTM 형질감염 유닛 (맥스사이트, 인크.(MaxCyte, Inc.), 미국 메릴랜드주 게이더스버그)로 형질감염을 수행하였다. 맥스사이트 프로세싱 어셈블리 OC-400 및 CHO-S 세포에서 단백질 생산을 위한 최적화된 형질감염 프로토콜을 사용하였다. 총 8 x 10⁸개 세포의 양을 원심분리에 의해 수확하고, 8 x 10⁷개 세포의 동일한 크기의 10개 부분으로 분할하였다. 4 ml 전기천공 (EP) 버퍼로 2회 세척한 후, 세포를 EP 버퍼에 재현탁하여 8 x 10⁷개 세포/400 µl의 밀도를 획득하였다. 총 300 µg/ml 플라스미드 DNA를 1:1의 중쇄: 경쇄 비율로 또는 표면 항원의 발현을 위한 단일 벡터와 함께 첨가하였다. 전기천공 후, CHO-S 세포를 임의의 추가 버퍼 또는 배지를 첨가하지 않고 배양 플라스크에 직접 시딩하고, 37°C 및 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 형질감염 후 배양 조건은 단백질 생산 및 표면 마커의 일시적 발현 간에 상이하였다:
- [0370] 표면 수용체 발현: 세포를 CD CHO 성장 배지에서 48시간 동안 보관한 후, FACS 분석을 위해 사용하였다.
- [0371] 항체 생산: 150 ml 생산 배지를 첨가하였다 (CD OptiCHOTM + 1% (v/v) 글루타맥스 100x + 1% (v/v) HT 보충제 100x + 1% (v/v) 플루로닉(Pluronic)TM F-68 100x, 모두 김코[®]/써모 피셔 사이언티픽). 형질감염 후 1일 후, 1 mM 나트륨 부티레이트 (써모 피셔 사이언티픽)를 첨가하고, 세포에 3.5% (v/v) 맥스사이트 피드(Feed) 스톡 (28 ml 이소플레이트 스톡 용액 0.5% + 140 ml CHO CD 효율적 피드 A 스톡 용액 + 7 ml 글루타맥스 100x + 24.8 ml 글루코스 (450 g/l) 스톡 용액, 김코[®]/써모 피셔 사이언티픽)을 공급하였다. 나머지 생산 주기 (14일 또는 세포 생존성이 50% 미만으로 떨어질 때까지) 동안 인큐베이션 온도를 32°C로 낮추었다. 생산 단계 동안, 세포 밀도 및 생존성을 격일로 측정하고, 생산이 중단될 때까지 세포에 맥스사이트 피드 스톡 (상기 참조)을 매일 공급하였다. 상청액을 원심분리에 의해 수확하고 여과하여 세포 파편을 제거하였다 (최종 부피 약 200 ml). 제1 단계에서, 캡처셀렉트(CaptureSelect)TM CH1-XL (Hu) 친화성 매트릭스 (써모 피셔 사이언티픽)를 사용한 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 간략하게, 1 ml의 비드를 첨가하고, 밤새 4°C에서 천천히 교반하였다. 비드를 중력 유동 칼럼에서 10 ml PBS로 3회 세척하였다. 단백질을 5 ml의 0.1 M 글리신, pH3.0으로 용출하고, 1 ml Tris/HCL pH8.0을 첨가하여 즉시 중화하였다. 용출 분획을 4°C에서 2l의 PBS로 총 3회 투석하였다. 그 후, 하이로드(HiLoad) 26/600 슈퍼덱스 200 pg 칼럼 (지이 헬스케어 라이프 사이언스(GE Healthcare Life

Science))을 사용하여 1 ml/min (PBS 버퍼)의 유속으로 크기 배제 크로마토그래피 (액타 퓨어(AKTA Pure) 25, 지이 헬스케어 라이프 사이언스)를 수행하여 단량체 항체를 단리하였다. 항체 체제를 표준 절차를 사용하여 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 겔을 쿠마시 블루로 염색하였다. 정제된 단백질의 단백질 농도를 제조업체의 조건에 따라 BCA 검정 (피어스(Pierce))에 의해 분석하였다.

[0372] 유동 세포계측법: 개별 염색 반응에 0.5×10^6 개 세포를 사용하였다. 세포를 1 ml의 PBA (PBS, 1% BSA, 0.05% NaN_3)로 1회 세척하였다. 세포 펠렛을 PBA에 희석된 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 정제된 재조합 단백질 50 μl 로 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1 ml의 PBA로 2회 세척하였다. 그 후, 세포 펠렛을 항-인간-IgGFITC (잭슨 이뮤노 리써치(Jackson Immuno Research), 카탈로그 번호: 109-096-098)의 1:20 희석액 25 μl 에 재현탁하고, 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 1 ml PBA로 2회 세척하였다. 최종적으로 세포를 500 μl PBA에 재현탁하고, 나비오스(Navios) 유동 세포계측기 (벡크만 쿨터(Beckman Coulter))에서 즉시 분석하였다.

[0373] 실시예

[0374] 실시예 1: 이중특이적 항체의 클로닝 (도 5)

[0375] 이중특이적 CD277 항체를 하기 절차에 따라 제조하였다:

[0376] IgG-scFv 분자의 생산을 위한 발현 벡터를 표준 절차에 의해 설계하였다 (Kellner, CS.et al.; Methods Mol Biol, 2018. 1827: p. 381-397). pSEC-Tag2-Hygro-C를 포유동물 발현 벡터의 생성을 위한 백본으로서 사용하였다. IgG-scFv 항체 유도체를 문헌 [Coloma, M.J. et al.; Nat Biotechnol, 1997. 15(2): p. 159-63]에 원래 기재된 프로토타입 IgG-scFv 포맷에 기초하여 변형된 포맷으로 설계하였다.

[0377] 경쇄: 경쇄 설계를 문헌 [Kellner, CS.et al.; supra]에 기재된 바와 같이 실현하였다. 경쇄 발현 카세트의 경우, 분비 리더 서열 (L1; Haryadi, RS. et al.; PLoS One, 2015. 10(2): p. e0116878)을 VL-영역의 5'-말단에 첨가하였다. 인간 C-카파 영역을 3'-말단에 융합하여 전체 카파 경쇄 코딩 서열을 형성하였다. 최소한의 코작 (Kozak) 서열을 시작 코돈의 상류에 첨가하여 최적의 번역 개시를 허용하였다. NheI 및 PmeI 제한 부위를 각각 5'- 및 3'-말단에 도입하였다. 벡터 백본에서의 클로닝을 표준 절차에 따라 수행하였다.

[0378] 중쇄 유도체: 중쇄 유도체는 Fc 수용체 상호작용을 방지하기 위해 하부 힌지 영역에서 L234A 및 L235A 아미노산 교환을 운반하는 IgG1 중쇄를 코딩한다 (Lund, JG. et al.; J Immunol, 1991. 147(8): p. 2657-62). 중쇄 분비 리더를 VH 영역의 5'-말단에 첨가하였다 (H7; Haryadi, RS. et al.; PLoS One, 2015. 10(2): p. e0116878). 최소한의 코작 서열을 시작 코돈의 상류에 첨가하여 최적의 번역 개시를 허용하였다. IgG 중쇄의 정지 코돈을 제거하고, 15개의 아미노산 유연한 링커 (G4S)3을 코딩하는 서열 (서열식별번호: 97)을 도입하였다. DNA 수준에서 유연한 링커 (GS)의 마지막 2개 코돈은 BamHI 제한 부위, 다음에 PmeI 제한 부위를 보유한다. 각각의 scFv 단편을 BamHI-PmeI 클로닝 카세트로서 VL-(G4S)4-VH 포맷으로 설계하였다. 최종 발현 구축물의 클로닝을 표준 절차에 따라 수행하였다.

[0379] 중쇄 유도체에서 아미노산 조성에 영향을 미치지 않는 추가 제한 부위를 도입하여 모듈식 설계 및 분자의 특이적 부분의 교환을 허용하였다:

[0380] NheI-PpuMI: VH-영역의 교환.

[0381] PpuMI-BsrGI: CH2 도메인의 침묵 돌연변이의 교환.

[0382] BsrGI-BamHI: 링커 서열의 교환.

[0383] BamHI-PmeI: scFv 단편의 교환.

[0384] 표 2a: 제1 결합 부분으로서 부모 항-CD277 항체를 포함하는 이중특이적 CD277 항체

라벨	분자	SEQ ID VL2	SEQ ID VH2	SEQ ID VL1	SEQ ID VH1	SEQ ID IgG LC	SEQ ID IgG HC
EvB#3	CD277-STEAP1	18	22	5	1	93	92
EvB#4	CD277-DLL3	26	30	5	1	93	102
EvB#5	CD277-FOLR1	10	14	5	1	93	9
EvB#6	CD277-CLDN18.2	34	38	5	1	93	103

[0385]

[0386] 표 2b: 제1 결합 부분으로서 항체 47을 포함하는 이중특이적 CD277 항체

분자	SEQ ID VL2	SEQ ID VH2	SEQ ID VL1	SEQ ID VH1	SEQ ID IgG LC
CD277-STEAP1	18	22	5	42	93
CD277-DLL3	26	30	5	42	93
CD277-FOLR1	10	14	5	42	93
CD277-CLDN18.2	34	38	5	42	93

[0387]

[0388] 표 2c: 제1 결합 부분으로서 항체 52를 포함하는 이중특이적 CD277 항체

분자	SEQ ID VL2	SEQ ID VH2	SEQ ID VL1	SEQ ID VH1	SEQ ID IgG LC
CD277-STEAP1	18	22	65	42	93
CD277-DLL3	26	30	65	42	93
CD277-FOLR1	10	14	65	42	93
CD277-CLDN18.2	34	38	65	42	93

[0389]

[0390] 항체 47:VL 부모, VH CDR2 N185S, K190N, 다른 모든 VH/VL CDR은 부모와 동일함

[0391] 항체 52:VL CDR1 L31V, VH CDR2 N185S, K190N, 다른 모든 VH/VL CDR은 부모와 동일함

[0392] 실시예 2: 인간화 이중특이적 항체의 생성

[0393] 항체의 친화성 성숙은 면역 반응 동안 단계적 프로세스이다. 생식세포계열과 비교하여 CDR 영역에서 추가 돌연

변이를 추적하고 엄격한 선택 프로세스를 거치면, 항체 친화성이 1988년에 라제프스키(Rajewsky) 및 동료들에 의해 기재된 바와 같이 단계적 방식으로 증가할 수 있다 (Allen, D., et al.; EMBO J, 1988. 7(7): p. 1995-2001., Kocks, C. and K. Rajewsky, Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(21): p. 8206-10). 따라서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역 내의 생식세포계열 구성의 단계적 복원에 의해, 본 발명의 인간화 항체를 생성할 수 있다.

[0394] 인간화 방법

[0395] 표준 CDR-이식 기술을 사용하여 무린 모노클로날 항체의 인간화를 수행하였다. 이 방법의 원리는 인간의 치료제로서 사용될 때 면역원성을 감소시킬 목적으로 무린 모노클로날 항체로부터의 상보성 결정 영역 (CDR)만을 함유하는 인간 항체를 재구성하는 것이다. CDR-이식에 의한 인간화는 무린 항체로부터의 항원-결합 잔기가 인간화 항체에서 유지되는 것을 필요로 하며; 그러므로 이들 잔기의 식별은 프로토콜에서 분명히 중요한 역할을 한다. 인간화 프로세스를 가이드하고 부모 무린 잔기를 보존할지 아니면 인간 생식세포계열 대응부로 치환할지의 결정을 돕기 위해, 항원 BTN3A1을 갖는 무린 모노클로날 항체 scFv의 4F9L X선 구조를 사용하였다.

[0396] 사용된 CDR-이식 프로토콜은 영국 케임브리지 의학 연구 위원회의 그렉 윈터(Greg Winter) 및 동료들이 개척한 접근법의 현대화된 버전이다. CDR의 정의는 카바트 명명법에 기초한다. 무린 모노클로날 항체 무린 CDR 영역이 이식되는 인간 프레임워크 수용자 영역의 선택은 입력으로서 무린 모노클로날 항체 무린 가변 영역 서열을 사용하여 NCBI에서 이뮤노글로불린 V 영역 서열의 분석을 용이하게 하기 위해 개발한 IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 사용하여 IMGT 무린 및 인간 V 유전자 데이터베이스를 검색하여 성취하였다. 적용된 전략은 개별 인간 항체 서열에서 발견되는 특이 체세포 돌연변이를 함유하지 않는 천연 인간 서열인 인간 생식세포계열 서열을 사용하는 것이다.

[0397] 경쇄 역돌연변이: 부모 항체의 제1 결합 부분으로부터의 경쇄의 가변 영역을 마우스의 생식세포계열 레퍼토리 (IMGT 데이터베이스)와 비교하고 가장 가까운 상동성을 나타내는 생식세포계열 유전자를 식별하였다. 이에 의해, IGKV15-103*01 및 IGKJ2*01 [F] 유전자를 식별하고, 부모 VL 영역에 정렬하였다. 6개의 아미노산 잔기가 생식세포계열과 상이한 것으로 식별되었다. 부모 항체의 결정 구조에서 식별된 잔기를 예시함으로써, 표면에 노출되어 항원 상호작용에 직접 기여할 수 있는 아미노산 잔기를 식별하였다. 개별 아미노산 또는 아미노산 클러스터를 생식세포계열 구성으로 전환시키고 발현 구축물의 생성을 위해 사용하였다.

[0398] 중쇄 역돌연변이: 유사한 전략을 적용하여 중쇄 가변 영역에서 잠재적 아미노산 위치를 식별하였다. IGHV1S81*02 [F] v-유전자가 가장 가깝게 일치하는 것으로 식별되었다. CDR3 영역이 고도로 돌연변이되어 상응하는 유전자 세그먼트의 식별을 어렵게 만드는 것으로 보였기 때문에, D 및 J 세그먼트는 식별되지 않았다. VL-영역을 생식세포계열로 재설정하는데 적용된 전략과 유사하게, 중쇄의 CDR1 및 CDR2 영역의 돌연변이는 단계적 방식 (단일 돌연변이 또는 클러스터)으로 생식세포계열 구성으로 복귀되었다. CDR3의 잔기를 식별하기 위해, 상동성 생식세포계열 유전자 세그먼트를 식별할 수 없었기 때문에 상이한 전략을 적용하였다. 여기서, CDR3 영역의 표면 노출된 잔기는 20.1 및 BNT3A 잔기의 공결정 구조의 분석에 의해 식별하였다 (Payne, KK et al.; Science, 2020. 369(6506): p. 942-949). 이들 잔기 중 3개는 잠재적 접촉 잔기로서 기재되어 있으며 (Payne, KK et al.; supra), 따라서 알라닌으로 전환되었다. 알라닌 스캐닝은 항체/항원 상호작용을 방해함으로써 에피토프 결합에 중요한 잔기를 식별하는 것으로 기재된 바 있기 때문에 알라닌 교환을 선택하였다 (Parhami-Seren, BM. et al.; J Immunol, 2001. 167(9): p. 5129-35). 개별 아미노산 또는 아미노산 클러스터는 개별 아미노산 또는 아미노산 클러스터를 생식세포계열 구성으로 전환시키고 발현 구축물의 생성을 위해 사용하였다.

[0399] 표 3: 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 제1 결합 부분

분자	VL SEQ ID NO	CDRL1,2,3 SEQ ID NO	VL 설명	VH SEQ ID NO	CDRH1,2,3 SEQ ID NO	VH 설명
EvB#1	5	6, 7, 8	부모 (참조)	1	2, 3, 4	부모 참조
EvB#21	5	6, 7, 8	부모	54	55, 56, 57	클러스터 1
EvB#22	5	6, 7, 8	부모	58	59, 60, 61	클러스터 2
EvB#23 (EvB#47)	5	6, 7, 8	부모	42	43, 44, 45	N185S-K190N
EvB#24	5	6, 7, 8	부모	46	47, 48, 49	R162S-Y164W
EvB#43	5	6, 7, 8	부모	62	63, 64, 65	VH-46_1A
EvB#44	5	6, 7, 8	부모	66	67, 68, 69	VH-46_1B
EvB#45	5	6, 7, 8	부모	70	71, 72, 73	VH-46_1C
EvB#26	78	79, 80, 81	L31V-H92Q-Y96L	1	2, 3, 4	부모
EvB#28	86	87, 88, 89	L31V	1	2, 3, 4	부모
EvB#29 (EvB#52)	86	87, 88, 89	L31V	42	43, 44, 45	N185S-K190N
EvB#30	86	87, 88, 89	L31V	46	47, 48, 49	R162S-Y164W
EvB#31	82	83, 84, 85	H92Q-Y96L	42	43, 44, 45	N185S-K190N
EvB#27	82	83, 84, 85	H92Q-Y96L	1	2, 3, 4	부모
EvB#32	82	83, 84, 85	H92Q-Y96L	46	47, 48, 49	R162S-Y164W
EvB#33	78	79, 80, 81	L31V-H92Q-Y96L	42	43, 44, 45	N185S-K190N
EvB#34	78	79, 80, 81	L31V-H92Q-Y96L	46	47, 48, 49	R162S-Y164W

[0400]

EvB#35	78	79, 80, 81	L31V- H92Q- Y96L	54	55, 56, 57	클러스터 1
EvB#36	78	79, 80, 81	L31V- H92Q- Y96L	58	59, 60, 61	클러스터 2
EvB#37	78	79, 80, 81	L31V- H92Q- Y96L	50	51, 52, 53	클러스터 1-2
EvB#38	74	75, 76, 77	L31V- R39K- R50K- A68G- H92Q- Y96L	42	43, 44, 45	N185S- K190N
EvB#25	74	75, 76, 77	L31V- R39K- R50K- A68G- H92Q- Y96L	1	2, 3, 4	부모
EvB#39	74	75, 76, 77	L31V- R39K- R50K- A68G- H92Q- Y96L	46	47, 48, 49	R162S- Y164W
EvB#40	74	75, 76, 77	L31V- R39K- R50K- A68G- H92Q- Y96L	54	55, 56, 57	클러스터 1
EvB#41	74	75, 76, 77	L31V- R39K-	58	59, 60, 61	클러스터 2

[0401]

			R50K- A68G- H92Q- Y96L			
EvB#42	74	75, 76, 77	L31V- R39K- R50K- A68G- H92Q- Y96L	50	51, 52, 53	클러스터 1-2
EvB#101	62	63,64,65	VH-46_1A	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#102	62	63,64,65	VH-46_1A	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#103	62	63,64,65	VH-46_1A	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#104	62	63,64,65	VH-46_1A	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#105	62	63,64,65	VH-46_1A	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#106	62	63,64,65	VH-46_1A	136	137,138,139	VL-11_1C
EvB#107	66	67,68,69	VH-46_1B	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#108	66	67,68,69	VH-46_1B	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#109	66	67,68,69	VH-46_1B	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#110	66	67,68,69	VH-46_1B	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#111	66	67,68,69	VH-46_1B	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#112	66	67,68,69	VH-46_1B	136	137,138,139	VL-11_1C
EvB#113	70	71,72,73	VH-34_1A	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#114	70	71,72,73	VH-34_1A	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#115	70	71,72,73	VH-34_1A	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#116	70	71,72,73	VH-34_1A	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#117	70	71,72,73	VH-34_1A	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#118	70	71,72,73	VH-34_1A	136	137,138,139	VL-11_1C
EvB#119	104	105,106,107	VH-34_1B	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#120	104	105,106,107	VH-34_1B	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#121	104	105,106,107	VH-34_1B	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#122	104	105,106,107	VH-34_1B	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#123	104	105,106,107	VH-34_1B	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#124	104	105,106,107	VH-34_1B	136	137,138,139	VL-11_1C

[0402]

EvB#125	108	109,110,111	VH-34_1C	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#126	108	109,110,111	VH-34_1C	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#127	108	109,110,111	VH-34_1C	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#128	108	109,110,111	VH-34_1C	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#129	108	109,110,111	VH-34_1C	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#130	108	109,110,111	VH-34_1C	136	137,138,139	VL-11_1C
EvB#131	112	113,114,115	VH-34_1D	116	117,118,119	VL-12_1A
EvB#132	112	113,114,115	VH-34_1D	120	121,122,123	VL-12_1B
EvB#133	112	113,114,115	VH-34_1D	124	125,126,127	VL-12_1C
EvB#134	112	113,114,115	VH-34_1D	128	129,130,131	VL-11_1A
EvB#135	112	113,114,115	VH-34_1D	132	133,134,135	VL-11_1B
EvB#136	112	113,114,115	VH-34_1D	136	137,138,139	VL-11_1C

[0403]

[0404]

클러스터 1: R162S, Y164W, L165M, Y166H

[0405]

클러스터 2: N185S, G188R, K190N, F191Y

[0406] 클러스터 1-2: R162S, Y164W, L165M, Y166H, N185S, G188R, K190N, F191Y

[0407] 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 세트는 표의 한 라인의 2개 쇠로서 정의된다. "R162S"는 위치 162의 아미노산 R이 아미노산 S에 의해 대체된 것을 의미한다. N185S는 위치 185의 아스파라긴이 세린에 의해 대체된 것을 의미한다. N185S 및 K190N은 서열식별번호: 44에서 볼드체 및 밑줄 표시되어 있다. L31V는 서열식별번호: 75에서 볼드체 및 밑줄 표시되어 있다. 다른 모든 유사한 용어에 대한 각각의 의미이다. 가변 쇠의 다른 아미노산의 카운팅은 N185 및 L31을 사용하여 시작할 수 있다.

[0408] 실시예 3: 활성화된 V γ 9V δ 2 T 세포주의 생성 및 특징화.

[0409] 확장된 γ δ T 세포주를 생성하기 위해, 건강한 성인 혈액 공여자로부터의 백혈구 농축물 (LRS)로부터의 10⁶개 세포/mL을 50 IU/mL rIL-2 (노바티스, 스위스 바젤)를 갖는 완전 배지에서 6-웰 플레이트에서 배양하고, 2.5 μ M 아미노비스포스포네이트 (n-BP) 졸레드론산 (노바티스)으로 자극하였으며, 이는 V γ 9V δ 2-발현 γ δ T 세포의 선택적 성장을 유도하였다. 휴지 이후, 초기에 자극된 γ δ T 세포는 매우 적은 양의 IL-2만을 생산하였으며, 50 IU/mL (15 pg/mL) rIL2를 격일로 첨가하였다 (Oberge et al., Cancer Res. 2014). 2주 후, 순도 > 94%의 V δ 2 쇠를 발현하는 γ δ T 세포의 선택적 확장이 관찰되었다. V δ 2 T 세포 활성화는 약간 향상된 CD25 발현 (Pechhold et al. J Immunol Baltim Md 1950 152, 4984-92 (1994)) 및 활성화 마커 CD69의 강한 상향-조절로 나타났다. 또한, 증가된 V δ 2 T 세포 집단은 이들 확장된 γ δ T 세포의 활성화를 나타내는 중심 기억- (CM, CD27+ CD45RA-) 또는 이펙터 기억 (EM, CD27- CD45RA-) 표현형을 나타내었다.

[0410] 실시예 4: 종양 세포주의 선택

[0411] 다양한 항체 구축물을 테스트하기 위해, 각각의 종양-항원을 발현하는 상이한 종양 세포주 패널을 항원 발현 수준에 대한 공개된 정보 또는 FACS 분석에 기초하여 선택하였다. 간략하게, 표면 염색을 위해, 3 내지 5 x 10⁵ 개 세포를 세척 버퍼 (1% BSA, 0.1% NaN₃을 함유하는 PBS)로 2회 세척하였다. 그 후, 세포를 제조업체가 설명한 절차에 따라 형광색소-접합된 또는 비접합된 항체 또는 이소타입 대조군으로 25분 동안 염색하고, 2회 세척하고, PBS 버퍼 중 1% PFA (파라포름알데히드)에 재현탁하거나 제2 단계 항체로 염색하였다. 제2 단계 항체와 함께 인큐베이션 후, 세포를 2회 세척하고, 1% PFA 버퍼에 재현탁하였다. Diva 9 및 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 LSR-Fortessa 유동 세포계측기 (BD 바이오사이언시스)에서 모든 샘플을 분석하였다. 문헌 및 FACS 분석 결과는 표 4에 요약되어 있다.

[0412] 표 4: 종양 세포에서 종양-항원의 발현

종양 세포		발현				
		CD277	FOLR1	DLL3	STEAP1	CLDN18.2
OVCAR-3	문헌	예 (1)	예 (2,3)			
난소 Ca	FACS	약함	양성			
NCI-H1693	문헌					
NSCLC	FACS	양성				
UM-UC-3	문헌	예 (4)			예 (5)	
방광 Ca	FACS	양성		약함	약함	
PA-TU-8988s	문헌					예 (6)
췌장 Ca	FACS	양성		약함		약함
NCI-H510	문헌			예 (7)		
SCLC	FACS			약함		
BxPC3	문헌	예 (8)				예 (6)
PDAC	FACS	양성				

[0413]

[0414] * = 개시되지 않음

[0415] 문헌: 1. Payne, K. K. et al. Science 369, 942-949 (2020); 2. Ebel, W. et al. Cancer Immun 7, 6 (2007);

3. Shivange, G. et al. *Cancer Cell* 34, 331-345.e11 (2018); 4. Shimizu, T., et al., *Oncoimmunology* 7, e1424671 (2018), 5. Gomes, I. M., et al., *Mol Cancer Res* 10, 573-587 (2012), 6. Tuereci, Oezlem, et al., *Oncoimmunology* 8, e1523096 (2018), 7. Hipp, S. et al. *Clin Cancer Res Official J Am Assoc Cancer Res* 26, 5258-5268 (2020), Benyamine, A. et al. *Oncoimmunology* 7, 00-00 (2017).

[0416] 실시예 5: 녹아웃 종양 세포주의 생성

[0417] RNP 형질감염에 의한 종양-항원 KO 세포의 생성: 각각의 crRNA 및 tracrRNA를 등몰 농도 (100 μM)로 조합하고, 95°C에서 5분 동안 어닐링하고, 실온에서 원형재현함으로써 가이드 RNA (gRNA)를 준비하였다. 후속적으로 gRNA 및 재조합 S.p. Cas9 단백질을 PBS에서 조합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션함으로써 RNP를 준비하였다. RNP는 제조업체의 지침서 및 프로그램 FE-132에 따라 SF 세포주 4D-뉴클레오펙터(Nucleofector) X 키트 S (론자 (Lonza); # V4XC-2032) 및 4D-뉴클레오펙터 X 유닛 (론자)을 사용하여 부모 세포에 전기천공하였다. 후속적으로 모노클로날 세포를 FACS 분류 (BD Aria)에 의해 생성하고, 확장하고, 유동 세포계측법 염색 및 앰플리콘 시퀀싱 (NGS)에 의해 검증하였다.

[0418] 렌티바이러스 형질감염에 의한 종양-항원 KO 세포의 생성: 부모 세포를 먼저 Cas9-p2A-블라스티시딘-렌티바이러스로 형질도입하고, Cas9의 안정적 발현을 달성하기 위해 블라스티시딘을 사용하여 선택하였다. 그 후, 각각의 가이드 RNA를 CROP-seq-가이드-Puro 플라스미드 (애드진(Addgene) # 86708)에 클로닝하고, 렌티바이러스를 생산하였다. 후속적으로 블라스티시딘-선택된 Cas-9 발현하는 세포를 상기 렌티바이러스로 형질도입하고, 세포를 퓨로마이신을 사용하여 선택하고, 확장하고, 유동 세포계측법 염색 및 앰플리콘 시퀀싱 (NGS)에 의해 검증하였다. 대조군으로, 각각의 sgNT 세포주를 생성하는 비-표적화된 가이드 RNA ("sgNT")를 사용하여 동일한 형질감염 프로토콜을 적용하였다. FOLR1 KO 세포의 생성을 위한 적합한 가이드 RNA 서열은 서열식별번호: 96이다.

[0419] 실시예 6: 세포 용해 검정

[0420] 종양 세포주, 예컨대 OVCAR-3 (난소암), NCI-H1693 (NSCLC) 또는 UM-UC-3 (방광암)에 대한 세포독성은 다른 곳에 기재된 바와 같이 실시간 세포 분석기 (RTCA, X-Celligence, ACEA 바이오사이언시스(ACEA Biosciences), 미국 캘리포니아주 샌디에고)에 의해 삼중으로 결정하였다 (Oberger et al., 2014 and 2020). 간략하게, 완전 배지 RPMI 1640 (25 mM HEPES, 2 mM L-글루타민, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 100 U/mL 페니실린 및 10% 소태아 혈청이 보충됨)에서 $7.5-10 \times 10^3$ 개 부착성 종양 세포/ 웰을 96-웰 마이크로-E-플레이트에 첨가하여 전자 센서를 통해 최대 ~ 24-40시간 동안 5분마다 종양 세포의 임피던스를 모니터링하였다. 종양 세포의 측정된 임피던스는 세포 지수 ("CI")라고 지칭되는 임의의 단위로 표현되며, 이는 세포 파라미터, 예컨대 형태학적 변화 (예를 들어, 부착, 확산), 세포 증식 및 세포 용해의 변화를 반영한다. 상이한 웰에서 종양 세포의 초기 부착은 약간 상이할 수 있으므로, CI는 종양 암 세포가 선형 성장 단계에 도달한 후 1로 정규화될 수 있다. ~ 24-40시간 후 선형 성장 속도에 도달하면, 5:1의 E/T 비율로 활성화된 Vγ9Vδ2 T 림프구, 뿐만 아니라 12.5 IU/mL rIL-2를 함유하는 배지 및 표시된 농도의 다양한 항체 구축물 또는 다양한 대조군 ("실험 시작", t=0h)을 첨가하였다. 대조군의 경우, 종양 세포를 완전 용해에 대한 양성 대조군으로서 1% Triton X-100의 최종 농도를 갖는 여러 웰에 처리하고, 배경 용해에 대한 대조군으로 활성화된 Vγ9Vδ2 T 림프구 (상기와 동일한 조건)가 있는 여러 다른 웰에 처리하였다. 부착성 종양 세포의 용해는 상이한 시점에서 적어도 3분 동안 정규화된 CI를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0421] RTCA 소프트웨어 (ACEA 바이오사이언시스 인크.)를 사용함으로써, 원시 데이터 파일을 추가 평가를 위해 마이크로소프트 엑셀 또는 그래프패드 프리즘으로 내보냈다. Triton-X-100 샘플 및 항체의 첨가 없이 Vγ9Vδ2 T 림프구의 평균 CI는 실험 시작 후 표시된 시점에서 계산되었으며, 각각 완전 용해 ("Triton X 100") 및 배경 용해 ("Medium Ctrl")로서 정의되었다. 항체 구축물에 의해 유도된 종양 세포 용해는 종양 세포와 동일한 시점 ("tx")에서 각 샘플에 대해 계산되었다:

[0422] 용해(tx)=(CI(tx)-Medium Ctrl(tx))/(Triton X100-Medium Ctrl(tx))*100

[0423] 그래프패드 프리즘 9를 사용한 S자형 용량-반응 함수를 사용하여 곡선 적합화를 수행하여 참조 항체로 달성된 최대 종양 세포 용해(tx)에 대한 최선-적합 값을 제공하였다 (상위 값). 참조 항체에 의해 달성된 최대 종양 세포 용해 ("Top")에 대한 % 종양 세포 용해는 하기 공식에 의해 계산되었다: % 종양 세포 용해(tx) = 종양 세포 용해(tx)/Top*100

[0424] 문헌 [Oberger, H.H.; et al.; *Front. Immunol.* 2014, 5, 643] 및 [Oberger, H.H.; et al.; *Methods Enzymol.*

2020, 631, 429-441]. 결과는 도 4, 6 및 8에 표시되어 있다.

[0425] 실시예 7: SPR 검정

[0426] SPR 검정을 최신 기술에 따라 수행하였다. 참조 항체에 대한 결과는 표 5에 표시되어 있다. 간단히 말해서, 재조합 CD277을 비아코어 아민 커플링 키트 프로토콜에 따라 공유결합적 EDC / NHS 커플링에 의해 비아코어 CM5 광학 센서 칩의 표면에 고정하였다. 항체 샘플을 연속 희석 방식으로 분석물로서 적용하여 동일한 표적 분자 표면에 결합하는 모든 항체의 표준화된 비교를 허용하였다. 운동 분석 데이터는 1:1 랭뮤어 곡선 적합화 모델 및 평균 랭뮤어 온-레이트, 오프-레이트 및 KD 값에 기초한다: 표 5 참조.

[0427] 표 5

VL 변형	VH 변형	ka	kd	KD (nM)
없음	없음	3.69 ± 0.54 E+4	1.04 ± 0.20 E-4	2.80 ± 0.31
없음	N53S, K58N	1.58 ± 0.22 E+4	4.09 ± 0.48 E-4	26.30 ± 4.72
L31V	N53S, K58N	2.79 ± 0.13 E+4	3.85 ± 0.23 E-4	13.90 ± 1.33

[0428]

[0429] E+4는 10⁴를 의미하고, E-4는 10⁻⁴를 의미한다.

[0430] 실시예 8: 탈과립화 및 세포 사멸 검정

[0431] 원리: 세포독성 T 세포, 예컨대 $\gamma \delta$ T 세포는 분비성 리소솜에 세포독성 매개체, 예컨대 그랜자임, 퍼포린 및 그라눌린을 저장한다. 리소솜-연관 막 당단백질 (LAMP), 예컨대 LAMP-1 (CD107a) 및 LAMP-2 (CD107b)는 분비성 리소솜의 지질 이중층 막에 내장되어 있다. T 세포의 활성화 후, 분비성 리소솜은 세포막을 향해 이동하여 이와 융합할 수 있다. 융합 후, LAMP는 T 세포의 세포 표면에 일시적으로 발현되고, 분비성 리소솜은 과립 내용물을 탈과립화한다.

[0432] 방법: 단기간 활성화된 $\gamma \delta$ T 세포를 2 mM L-글루타민, 25 mM HEPES, 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 10% 소태아 혈청이 보충된 RPMI 1640 배지에서 정기적인 조건 (5% CO₂, 가습된, 37°C) 하에 배양하였다. 12.5 U/mL IL-2가 보충된 $\gamma \delta$ T 세포를 배지, 300nM 브로모히드린 피로포스페이트, 상이한 농도의 구축물 또는 대조군 구축물 AV#75와 함께 96-웰 미세역가 플레이트 (눈크(Nunc), 독일 비스바덴)에서 6시간 동안 배양하였다. CD107-검정의 경우, 0.5 μ g/mL PE-라벨링된 항-CD107a mAb 클론 H4A3 (바이올레전드(Biolegend)) 및 0.5 μ g/mL PE-라벨링된 항-CD107b mAb 클론 H4B4 (바이올레전드) 또는 적절한 이소타입 대조군을 96-웰 미세역가 플레이트에 직접 첨가한 반면, 3 μ M 분비 억제제 모넨신을 세포를 배양한 후 3시간 후에 첨가하였다. 추가 3시간 후, $\gamma \delta$ T 세포를 세척하고, PerCP-라벨링된 항-CD45 mAb (클론 2D1, BD 바이오사이언시스), AlexaF700-라벨링된 항-CD3 mAb (클론 SK7, 바이올레전드), BV510-라벨링된 항-CD8 mAb (클론 SK1, BD 바이오사이언시스), PE-Cy7-라벨링된 항-TCR $\gamma \delta$ mAb (클론 11F2, BD 바이오사이언시스) 및 APC-Vio770-라벨링된 항-V δ 2 (클론 REA 771, 밀테니(Miltenyi))로 염색하고, 세척하고, 사이투스™ 그린 사멸 세포 염색 (1:4000, 씨모 사이언티픽, # S34860)으로 PBS에서 계속하고, 20분 후 유동 세포계측법 (LSR Fortessa, BD 바이오사이언시스)에 의해 세포를 분석하였다. 4명의 상이한 공여자의 $\gamma \delta$ T 세포에 대한 결과는 도 9에 표시되어 있다.

표 6: 인건화 EY#47의 CDR 서열 (CDRH/CDRL 세트)

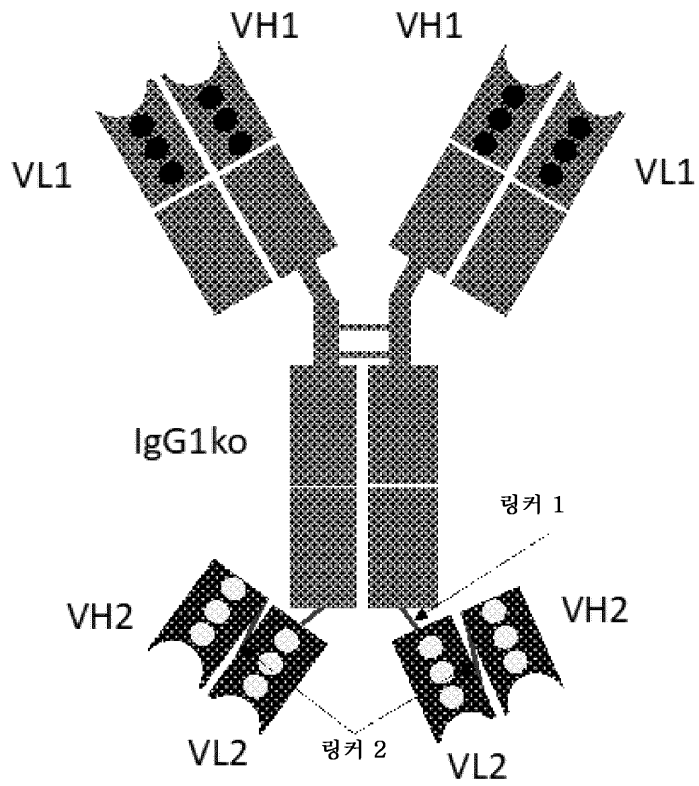
No.	CDRH1	SEQ	CDRH2	SEQ	CDRH3	SEQ	CDRL1	SEQ	CDRL2	SEQ	CDRL3	SEQ
EV#47 부린	RYVLY	2,43	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4,45	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
2	RYVMY	67	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
3	RYVMY	67	EINPSNGGTFACKFQG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
4	RYVLY	59	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
5	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
6	RYVLY	59	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
7	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQINILWLIS	6	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
8	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
9	RYVMY	67	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
10	RYVMY	67	EINPSNGGTFACKFQG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
11	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
12	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
13	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
14	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISSWLIS	121	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
15	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
16	RYVMY	67	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
17	RYVMY	67	EINPSNGGTFACKFQG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
18	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
19	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
20	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
21	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNLHT	7	QGHSPYPT	8
22	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
23	RYVMY	67	EINPSNGGTFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
24	RYVMY	67	EINPSNGGTFACKFQG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
25	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
26	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
27	RYVLY	2	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8
28	RYVMY	105	EINPSNGGTFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQSVSWLIS	133	RASNRHT	138	QGHSPYPT	8

표 7: 인간화 EYB#52의 CDR 서열 (CDRH/CDRL 세트)

No.	CDRH1	SEQ	CDRH2	SEQ	CDRH3	SEQ	CDRL1	SEQ	CDRL2	SEQ	CDRL3	SEQ
29/#52 부원	RYVLY		EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4,53	HASQININWVLS		RASNLHT	7	QGHSPYT	8
30	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
31	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNAQKFGG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
32	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
33	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
34	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
35	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	HASQININWVLS	75	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
36	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
37	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
38	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNAQKFGG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
39	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
40	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
41	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
42	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	140	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
43	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
44	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
45	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNAQKFGG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
46	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
47	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
48	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
49	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNLHT	7	QGHSPYT	8
50	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
51	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNEKFKS	44	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
52	RYVMY	67	EINPSNGGTINFNAQKFGG	68	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
53	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
54	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	72	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
55	RYVLY	2	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8
56	RYVMY	105	EINPSNGGTINFNEKFKS	110	EDDYDGTIPDAMDY	4	RASQGISVWVLS	141	RASNRHT	138	QGHSPYT	8

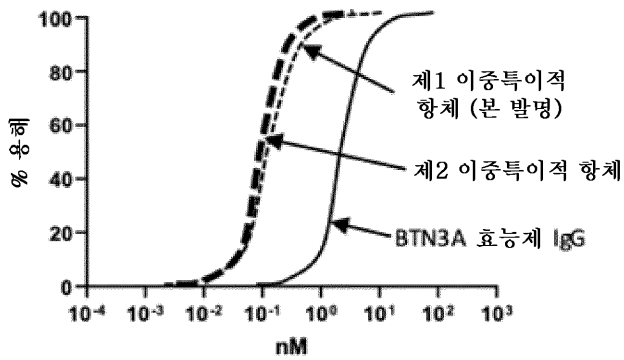
도면

도면1a

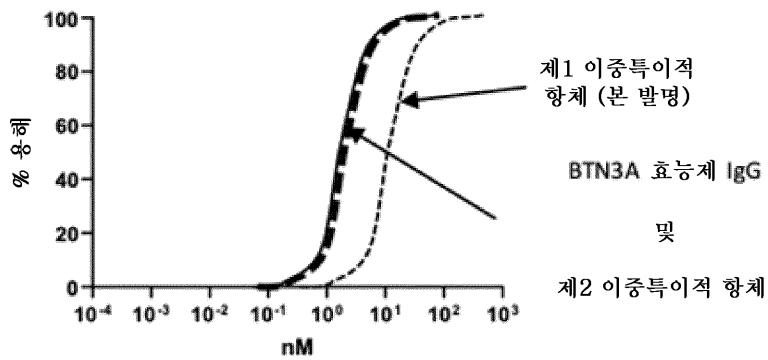


도면1b

종양 항원 양성 세포

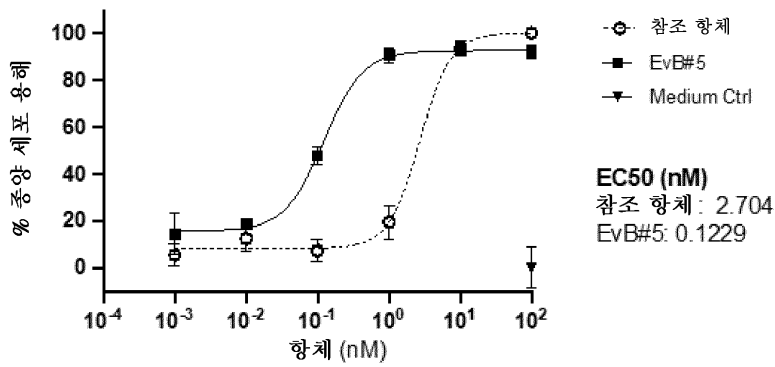


종양 항원 음성 세포

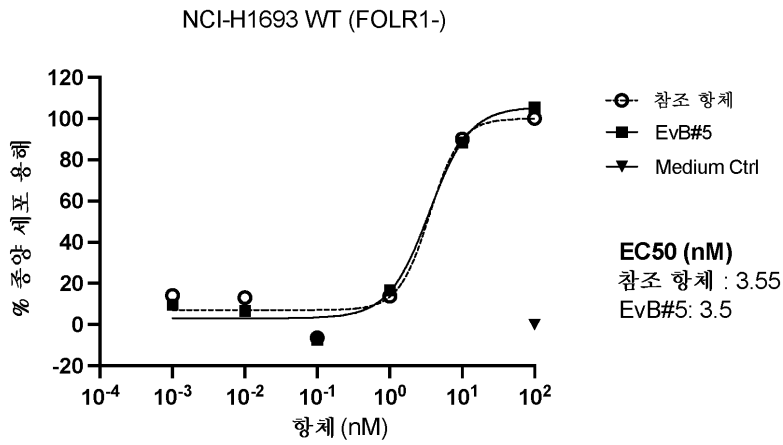


도면2a

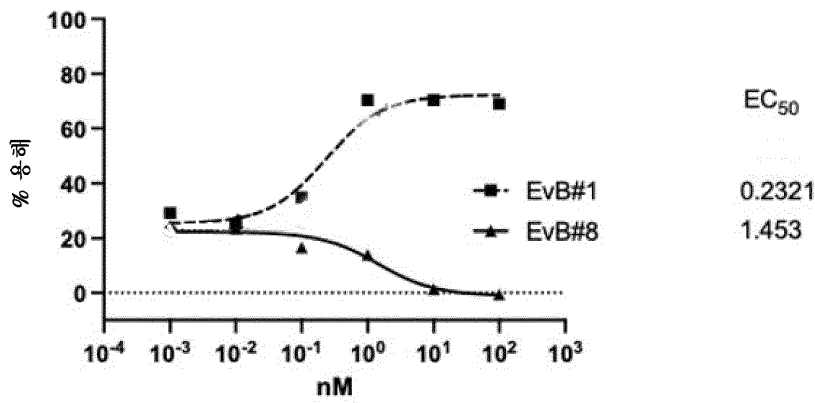
Ovcar-3 (FOLR1+)



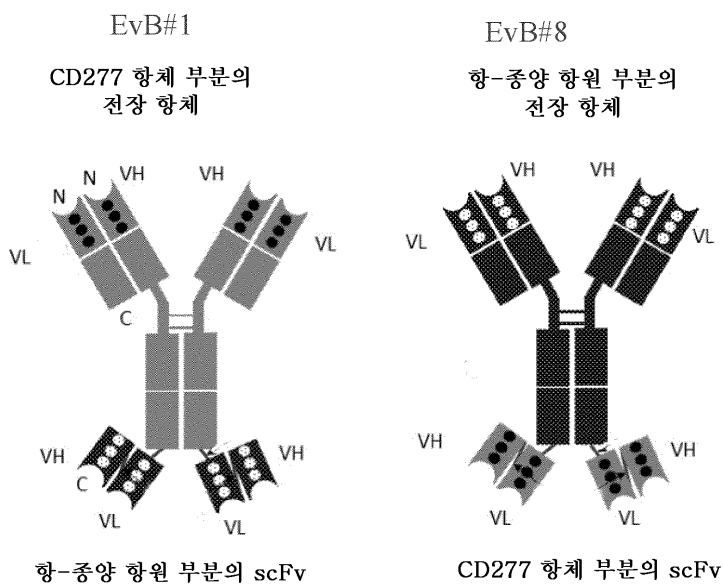
도면2b



도면2c

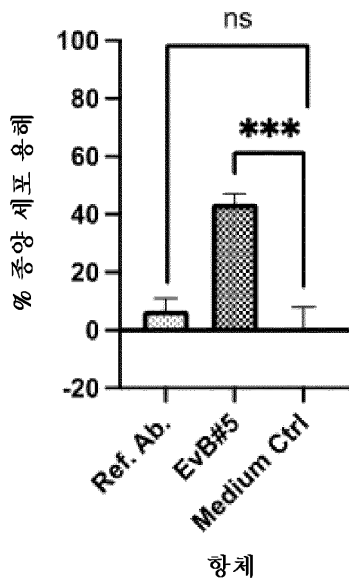


도면2d



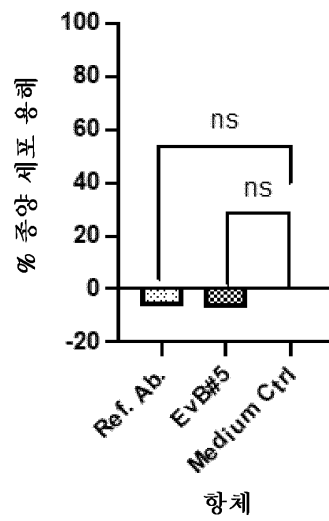
도면3a

Ovcar-3 세포 (FOLR1+)에
대한 0.1 nM 항체

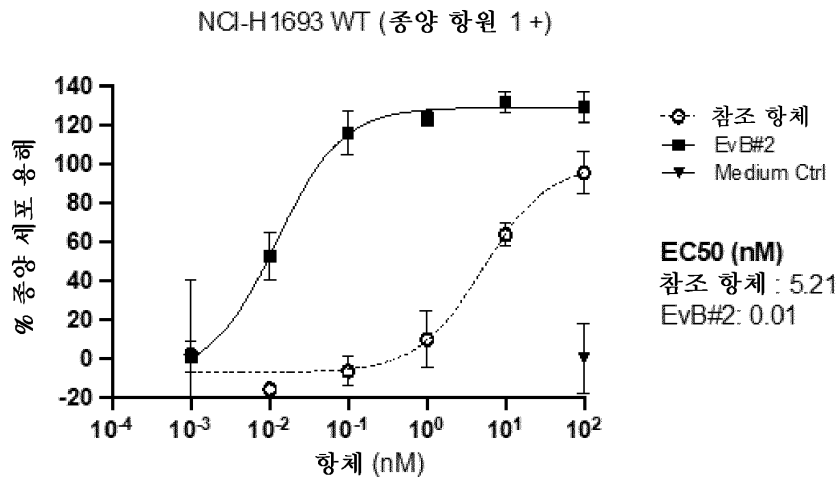


도면3b

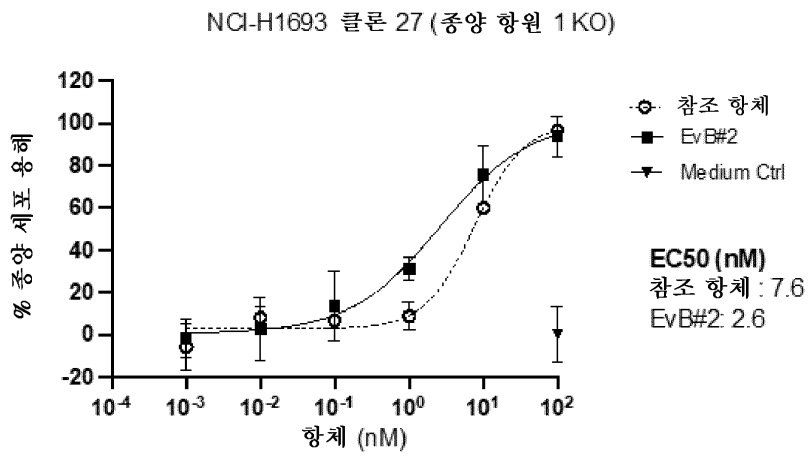
NCI-H1693 세포 (FOLR1-)에
대한 0.1 nM 항체



도면4a

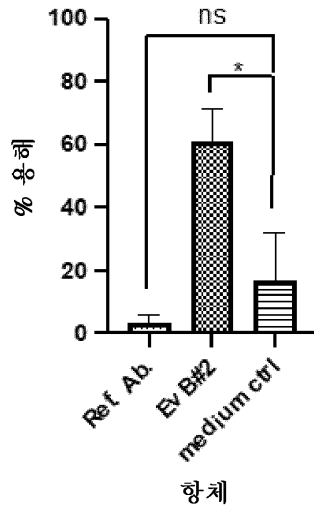


도면4b

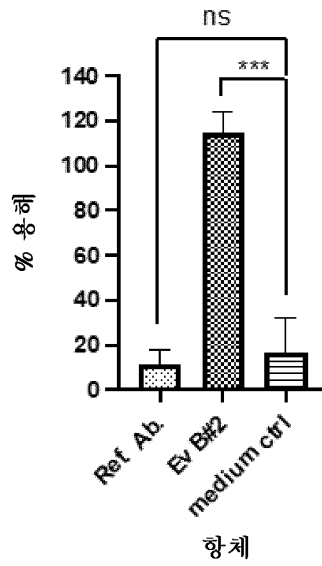


도면5a

NCI-H1693 sgNT 세포에
대한 0.01 nM 항체

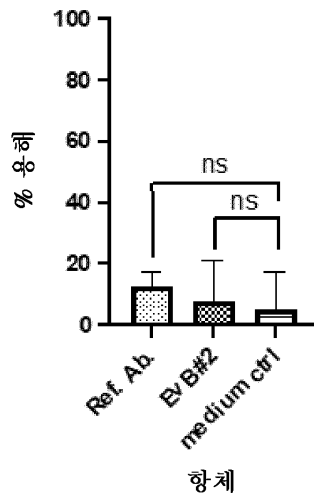


NCI-H1693 sgNT 세포에
대한 0.1 nM 항체

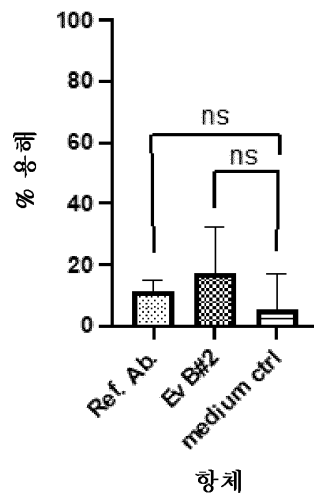


도면5b

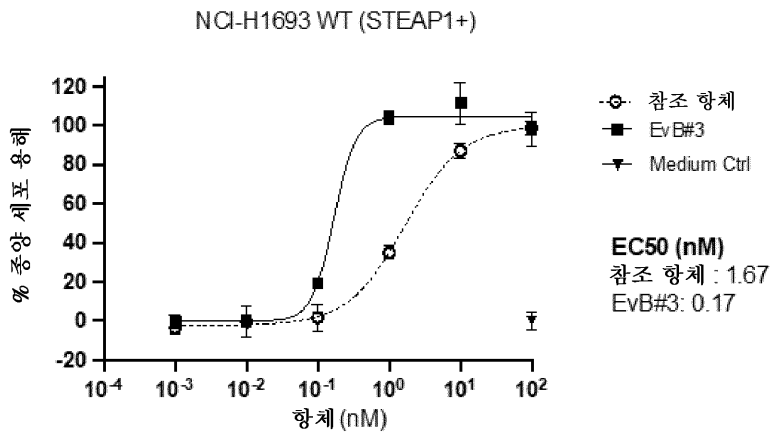
NCI-H1693 ko 세포에
대한 0.01 nM 항체



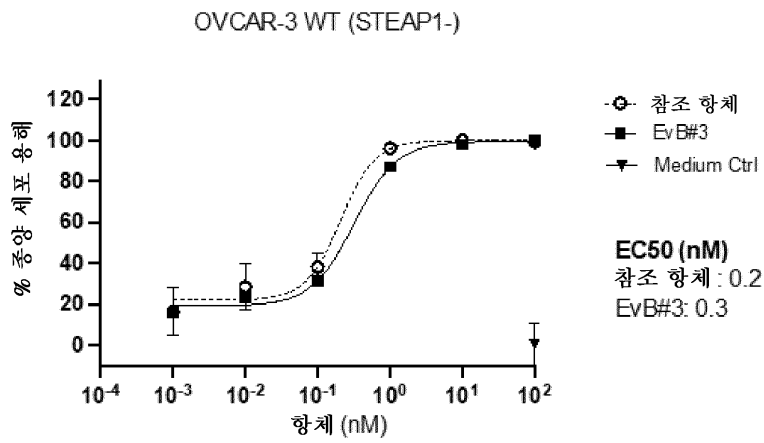
NCI-H1693 ko 세포에
대한 0.1 nM 항체



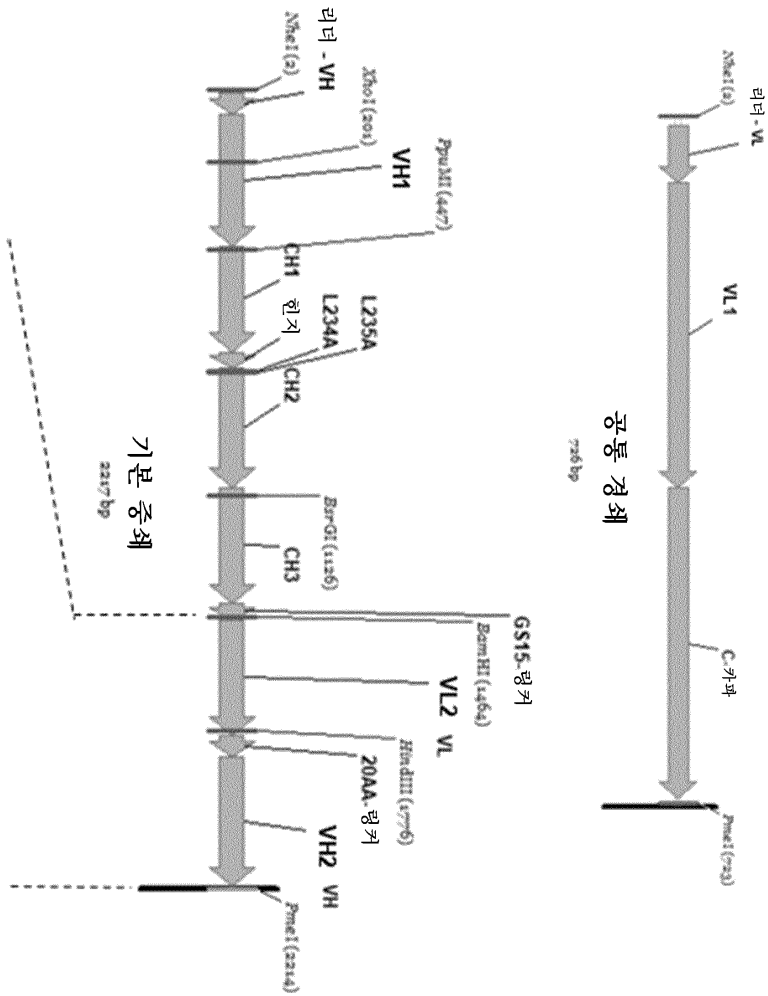
도면6a



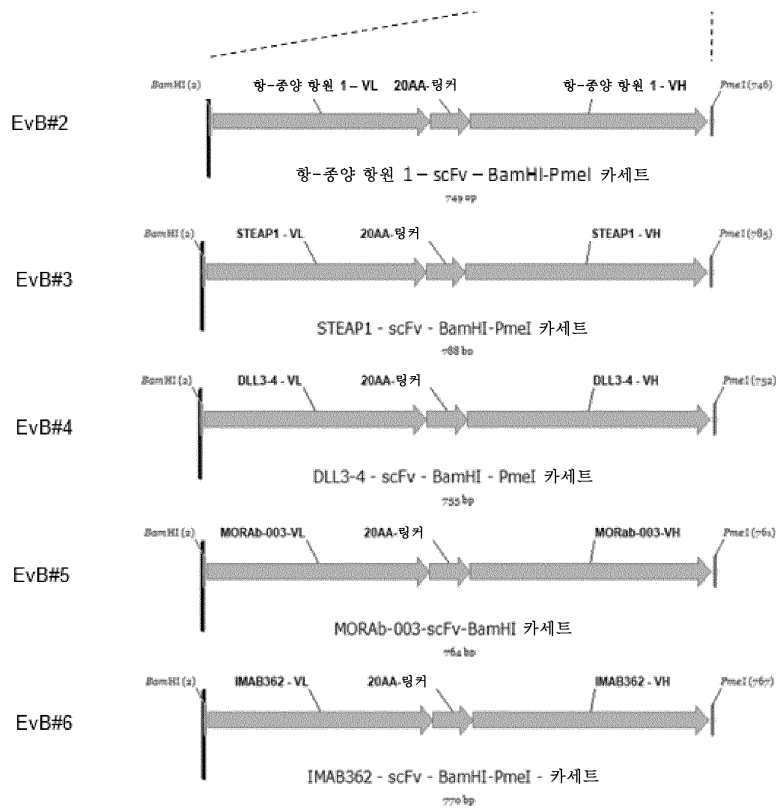
도면6b



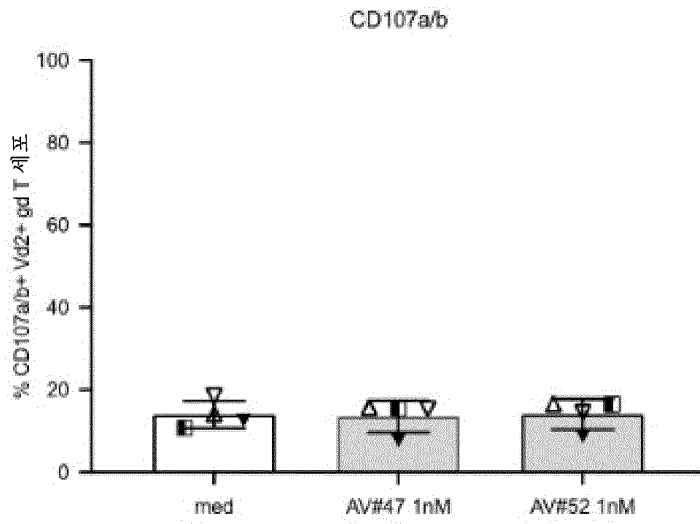
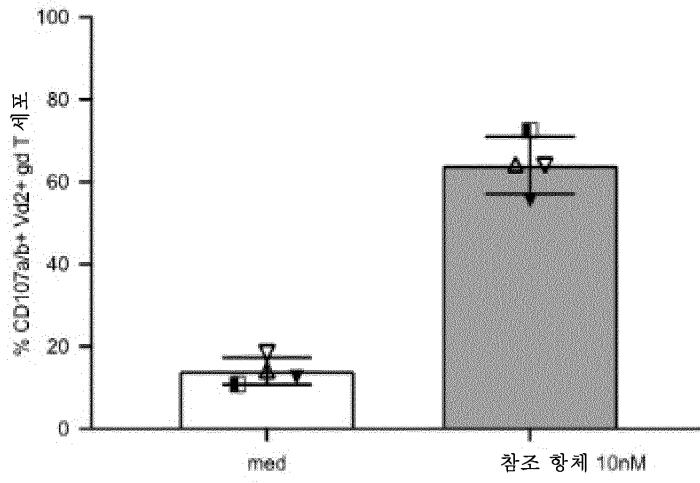
도면7a



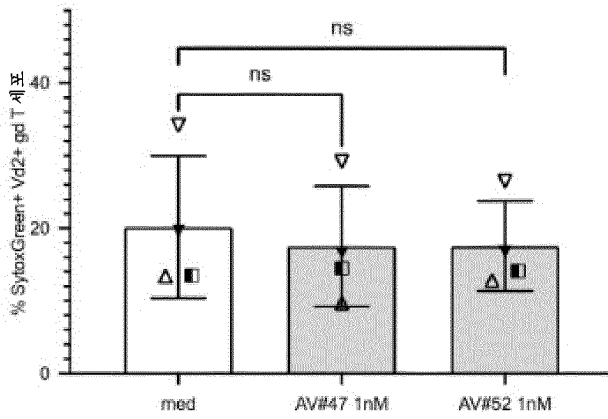
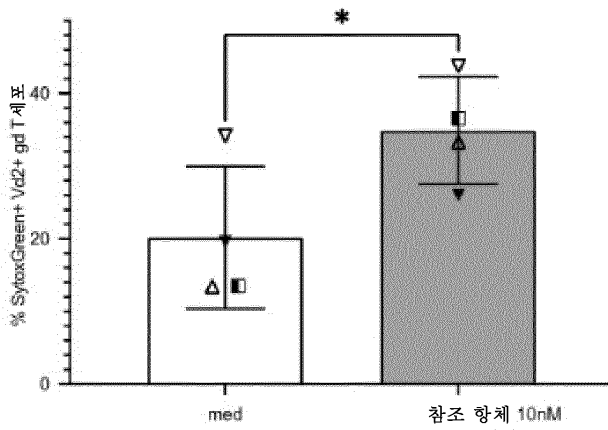
도면 7b



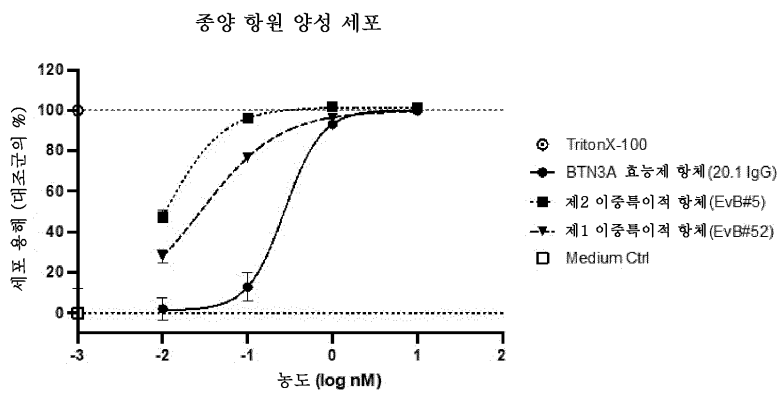
도면8a



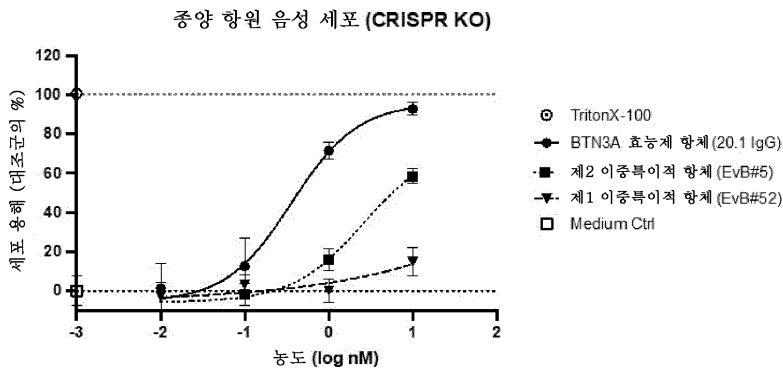
도면8b



도면9a



도면9b



서 열 목 록 (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.