



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0046557
(43) 공개일자 2024년04월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7008336
- (22) 출원일자(국제) 2022년08월16일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/112864
- (87) 국제공개번호 WO 2023/020507
국제공개일자 2023년02월23일
- (30) 우선권주장
202110951949.X 2021년08월18일 중국(CN)

- (71) 출원인
하버 바이오메드 (상하이) 컴퍼니 리미티드
중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양 하이-테크 파크 987 카일룬 로드 7층
- (72) 발명자
우 샤오둥
중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양 하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층
왕 용치양
중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양 하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

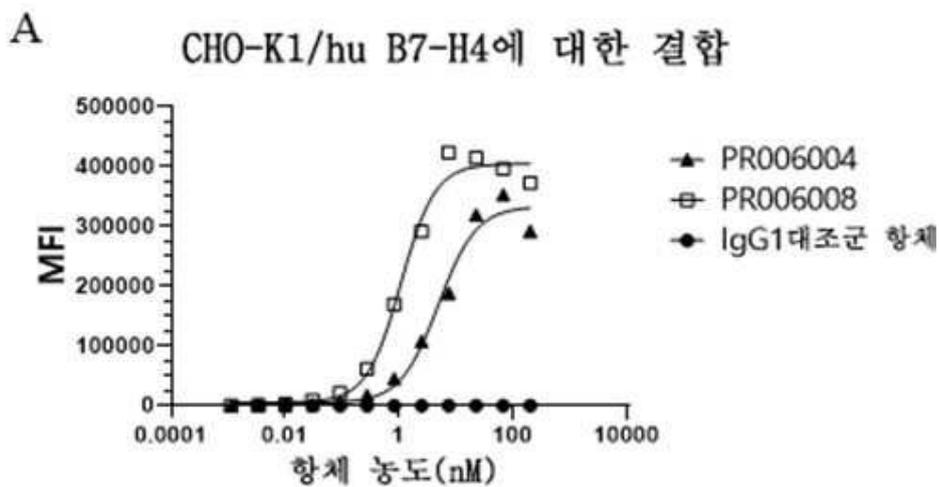
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **항-B7-H4 항체 및 이의 제조 방법과 용도**

(57) 요약

VH를 포함하되, 상기 VH는 하기의 CDR 또는 이의 돌연변이를 포함하고, 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2, 및, 서열번호 24 또는 25의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3; 여기서 상기 돌연변이는 상기 CDR의 아미노산 서열에 3, 2 또는 1개의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 항-B7-H4 항체를 제공한다. 상기 항체는 인간 B7-H4 및 사이노몰구스 원숭이 B7-H4에 결합하는 활성을 갖는다. 상기 항체를 B7-H4×CD3 이중특이성 항체로 제조하는 경우, 이는 여전히 인간 B7-H4 및 사이노몰구스 원숭이 B7-H4와 결합하는 활성을 유지하고, 종양 세포에 대해 비교적 강한 사멸 효과를 가지며, 유도된 IL-6 및 IFN- γ 와 같은 비특이적 사이토카인의 발현이 매우 낮고; 비교적 강한 체내 항종양 활성을 나타낸다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2317/31 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

지아 거즈

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

자오 추추

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

천 페이

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

허 윈

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

룽 이펑

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

딩 이

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

리 허

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

니우 레이

중국 상하이 201203 푸둥 뉴 에이리아 장지양
하이-테크 파크 차이룬 로드 987 7층

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역(VH)을 포함하되,

상기 VH는 하기의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 돌연변이를 포함하며,

서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2, 및, 서열번호 24 또는 25의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3;

여기서, 상기 돌연변이는 상기 CDR의 아미노산 서열에 3, 2 또는 1개의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 갖는

것을 특징으로 하는 항-B7-H4 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CDR2의 돌연변이는 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열에서 G2P, S4G 및 S5R/D/E/T 중 2 또는 1개의 아미노산 치환을 가지며; 상기 CDR2의 아미노산 서열은 바람직하게는 서열번호 11 내지 14, 서열번호 16 내지 18 중 어느 하나로 표시되는

것을 특징으로 하는 항-B7-H4 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 11 및 24로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 5, 12 및 25로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 17 및 24로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 5, 18 및 25로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 13 및 24로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 14 및 24로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 15 및 24로 표시되고; 또는

상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 16 및 24로 표시되는

것을 특징으로 하는 항-B7-H4 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VH의 프레임워크 영역은 인간 VH의 프레임워크 영역이고;

바람직하게는, 상기 VH의 프레임워크 영역은, 아미노산 서열이 서열번호 2로 표시되는 FWR1, 아미노산 서열이 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나로 표시되는 FWR2, 아미노산 서열이 서열번호 20 내지 22 중 어느 하나로 표시되는 FWR3 및 아미노산 서열이 서열번호 26 또는 27로 표시되는 FWR4를 포함하며;

더 바람직하게는, 상기 VH는 서열번호 36 내지 45 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는

것을 특징으로 하는 항-B7-H4 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

전장 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 바람직하게는 scFv, 이중특이성 항체, 다중특이성 항체, 중쇄 항체 또는 단일 도메인 항체이고;

바람직하게는, 상기 항-B7-H4 항체가 중쇄 항체인 경우, 상기 중쇄 항체는 서열번호 48 내지 57 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는

것을 특징으로 하는 항-B7-H4 항체.

청구항 6

단백질 기능 영역 A 및 단백질 기능 영역 B를 포함하되,

상기 단백질 기능 영역 B는 B7-H4를 표적으로 하고, 상기 단백질 기능 영역 A는 비-B7-H4를 표적으로 하고;

하기 a) 또는 b):

a) 상기 단백질 기능 영역 B는 제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체에서 선택되고;

바람직하게는, 상기 이중특이성 항체의 구조는 폴리펩타이드 사슬 1, 폴리펩타이드 사슬 2 및 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하며, 상기 폴리펩타이드 사슬 1은 식: N' -VL_A-CL-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 2는 식: N' -VH_A-CH1-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 3은 식: N' -VH_{B1}-링커-VH_{B2}-힌지 영역-CH2-CH3-C' 또는 식: N' -VH_B-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 여기서, 상기 VL_A 및 VH_A는 각각 상기 단백질 기능 영역 A의 VL 및 VH이고, 상기 VH_{B1} 및 VH_{B2}는 상기 단백질 기능 영역 B의 VH이고, VH_{B1} 및 VH_{B2}는 동일하거나 상이할 수 있으며;

b) 상기 단백질 기능 영역 B는 서열번호 72로 표시되는 HCDR1, 서열번호 74로 표시되는 HCDR2, 서열번호 76으로 표시되는 HCDR3, 서열번호 78로 표시되는 LCDR1, 서열번호 80으로 표시되는 LCDR2, 서열번호 82로 표시되는 LCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 상기 이중특이성 항체의 구조는 폴리펩타이드 사슬 1, 폴리펩타이드 사슬 2 및 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하며, 상기 폴리펩타이드 사슬 1은 식: N' -VL_A-CL-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 2는 식: N' -VH_A-CH1-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 3은 식: N' -VL_B-링커-VH_B-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 여기서, 상기 VL_A 및 VH_A는 각각 상기 단백질 기능 영역 A의 VL 및 VH이고, 상기 VL_B 및 VH_B는 상기 단백질 기능 영역 B의 VL 및 VH임,

에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단백질 기능 영역 A는 항-CD3 항체이고, 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 VH는 아미노산 서열이 서열번호 3으로 표시되는 VH CDR1, 아미노산 서열이 서열번호 10으로 표시되는 VH CDR2 및 아미노산 서열이 서열번호 23으로 표시되는 VH CDR3을 포함하고, 상기 VL은 아미노산 서열이 서열번호 29로 표시되는 VL CDR1, 아미노산 서열이 서열번호 31로 표시되는 VL CDR2 및 아미노산 서열이 서열번호 33으로 표시되는 VL CDR3을 포함하며;

바람직하게는 상기 항-CD3 항체는 아미노산 서열이 서열번호 35로 표시되는 VH 및 아미노산 서열이 서열번호 46으로 표시되는 VL을 포함하고;

더 바람직하게는, 상기 항-CD3 항체는 아미노산 서열이 서열번호 47로 표시되는 중쇄 및 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 경쇄를 포함하는

것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 이중특이성 항체는

아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 60으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 61로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 62로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 63으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 64로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 65로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 69로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 70으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하고;

또는, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 86으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하는

것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 10

제9항에 따른 단리된 핵산을 포함하고,

바람직하게는, 진핵 세포 발현 벡터 및/또는 원핵 세포 발현 벡터를 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 11

제10항에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하고,

바람직하게는, 숙주 세포는 원핵 세포 및/또는 진핵 세포이고, 상기 원핵 세포는 바람직하게는 TG1, B121 세포와 같은 *E. coli* 세포이고, 상기 진핵 세포는 바람직하게는 HEK293 세포 또는 CHO 세포인 형질전환체.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체.

청구항 13

제12항에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하고,

바람직하게는 진핵 세포이고, 바람직하게는 단리된 인간 세포이며; 더 바람직하게는 면역세포인 T 세포, 또는 NK 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 세포.

청구항 14

제11항에 따른 형질전환체를 배양하는 단계, 배양물로부터 항-B7-H4 항체 또는 이중특이성 항체를 수득하는 단계를 포함하는 항-B7-H4 항체 또는 이중특이성 항체의 제조 방법.

청구항 15

항체 부분 및 접합 부분을 포함하되,

상기 항체 부분은 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체 또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 포함하고, 상기 접합 부분은 검출 가능한 마커, 약물, 독소, 사이토카인, 방사성핵종, 효소, 또는 이들의 조합을 포함하며, 상기 항체 부분 및 접합 부분은 화학 결합 또는 링커를 통해 접합하는 항체 약물 접합체.

청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체, 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체, 제12항에 따른 키메라 항원 수용체, 제13항에 따른 유전자 변형된 세포 및/또는 제15항에 따른 항체 약물 접합체를 포함하고,

바람직하게는, 액체 제형, 기체 제형, 고형 제형 및 반고형 제형이고, 및/또는, 경구 투여, 주사 투여, 비강 투여, 경피 투여 또는 점막 투여될 수 있으며;

보다 바람직하게는, 화학치료제, 방사선치료제, 면역억제제 및/또는 세포독성 약물을 포함하는 복합 치료제를 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

암을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물, 키트 및/또는 약물 전달 장치의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항-B7-H4 항체, 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체, 제12항에 따른 키메라 항원 수용체, 제13항에 따른 유전자 변형된 세포, 제15항에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 제16항에 따른 약학 조성물의 용도:

바람직하게는, 상기 암은 폐암, 삼중 음성 유방암과 같은 유방암, 난소암, 자궁내막종, 위암, 소장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 신장암, 방광암, 전립선암, 담관암, 식도암 및 골육종으로 이루어진 군에서 선택된다.

청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체, 제12항에 따른 키메라 항원 수용체, 제13항에 따른 유전자 변형된 세포, 제15항에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 제16항에 따른 약학 조성물; 및 선택적으로, 설명서를 포함하는 키트.

청구항 19

(1) 제16항에 따른 약학 조성물을 필요한 피험자에게 투여하기 위한 주입 모듈, 및 (2) 선택적인 약효 모니터링 모듈을 포함하는 것을 특징으로 하는 약물 전달 장치.

청구항 20

B7-H4를 검출하는 방법으로서,

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 및/또는 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 사용하여 검출하는 단계를 포함하고;

바람직하게는, 상기 방법은 비진단 및/또는 치료를 위한 목적인

것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 생물의약 분야에 관한 것으로, 특히 항-B7-H4 항체 및 이의 제조 방법과 용도에 관한 것이며, 또한 상기 항-B7-H4 항체를 포함하는 이중특이성 항체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유방암, 난소암 및 자궁내막종은 여성에게 흔히 발생하는 악성 종양으로, 여기서 유방암 발병률은 여성암 중 1위를 차지하고 있으며, 2018년 국제암연구소 IARC의 데이터에 따르면 전 세계 여성암 중 유방암 발병률은 24.2%인 것으로 나타났다. 이러한 암의 치료에서 면역 치료 및 표적 치료가 현재 핫이슈이다. 예를 들어 Her2를 표적으로 하는 허셉틴(Herceptin)은 Her2 양성인 유방암에 매우 우수한 효과가 있다. 삼중 음성 유방암(TNBC)의 경우, 상응하는 표적이 없기 때문에 현재 치료 방법이 거의 없으며 주로 화학 요법을 위주로 한다. 2019년 3월 미국 FDA는 PD-L1 억제제인 아테졸리주맙(Atezolizumab)과 알부민 결합형 파클리탁셀을 전이성 삼중 음성 유방암(TNBC)의 치료에 사용되는 것을 승인하였지만, 삼중 음성 유방암에서 PD-L1의 발현이 높지 않다. 난소암 및 자궁내막종의 치료는 주로 수술과 방사선 및 화학요법의 보조 치료를 위주로 하며, 재발성 또는 전이성 종양의 경우, 상기 방법 이외에 다른 가능한 표적으로는 주로 에스트로겐 수용체, HER2, VEGF 및 PD1/PD-L1 등을 포함하지만 치료 효과가 제한적이다.

[0003] B7-H4는 비교적 새로운 B7 패밀리의 구성원으로, 이의 단백질은 정상 조직에서 발현이 매우 제한적이며, 이는 유방관 및 소엽, 나팔관 상피, 자궁내막상피 및 기타 조직과 같은 신체의 일부 관 상피 세포에서만 낮은 수준으로 발현된다. 반대로 B7-H4는 다양한 종양 조직에서 대량으로 발현되며, 예를 들어 유방암에서, 특히 삼중 음성 유방암, 난소암 및 자궁내막종 등 세포에서 거의 절반의 종양이 B7-H4를 높게 발현한다. 발현 프로파일의 측면에서, B7-H4는 특이성이 높은 종양 관련 항원으로 간주될 수 있다. 다른 한편, B7-H4는 새로운 면역 체크포인트 분자로, 체외 실험에서 B7-H4가 알려지지 않은 T 세포 표면 수용체와 상호작용하여 T 세포의 증식, 활성화 및 사이토카인의 생성을 억제하는 것으로 입증되었다 종양 세포는 B7-H4 분자를 높게 발현하고, 또한 종양 미세환경에서 B7-H4 분자를 높게 발현하는 억제성 대식세포를 통해 T 세포의 활성화를 억제함으로써 면역 회피를 구현한다. 종양에서 B7-H4의 발현 프로파일은 PD-L1과 겹치지 않는다. 항체를 통해 B7-H4를 표적으로 하는 치료는 B7-H4 발현 양성 종양을 치료하는 유망한 방법이다.

[0004] 현재 여러 제약회사에서 B7-H4에 대한 단일클론 항체, 또는 약물접합체, 또는 이중특이성 항체를 개발하고 있다. Genentech, BMS, Jounce, Jiangsu Hanson 등은 모두 전임상 개발 중이고, 현재 가장 빠르게 진행되고 있는 것은 FivePrime 및 Nextcure의 항-B7-H4 단일클론 항체로 현재 임상 1상 단계에 있으며, 이의 매커니즘은 주로 ADCC 및 면역 체크포인트를 차단하여 T 세포를 활성화시키는 것이다. 항종양 관련 항원과 항-CD3을 포함하는 이중특이성 항체의 구축을 T 세포 어댑터라고 하며, 종양 관련 항원 의존성이 매우 강한 T 세포의 활성화 및 종양 사멸 효과를 가지며, 일반 단일클론 항체보다 더 강한 효과를 가질 수 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 기존 기술에서 항-B7-H4 항체의 단점을 극복하기 위해 항-B7-H4 항체 및 이의 제조 방법과 용도를 제공하고, 상기 항-B7-H4 항체를 포함하는 이중특이성 항체를 더 제공하는 것이다.

[0006] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제1 양태에 있어서 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항-B7-H4 항체를 제공하고; 여기서,

[0007] 상기 VH는 하기의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 돌연변이를 포함하며: 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2, 및, 서열번호 24 또는 25의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3;

[0008] 여기서 상기 돌연변이는 상기 CDR의 아미노산 서열에 3, 2 또는 1개의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 갖는다.

[0009] 본 출원에서, “3, 2 또는 1개의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환”과 유사한 “아미노산 돌연변이”는 원래의 아미노산 서열과 비교하여 원래의 아미노산 서열의 기초에서 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환이 발생하는 것을 포함하여 변이체의 서열에 아미노산의 돌연변이가 있는 것을 지칭한다. 예시적인 해석으로는 CDR의 돌연변이가 3개, 2개 또는 1개의 아미노산의 돌연변이를 포함할 수 있고, 이러한 CDR 사이는 동일하거나 상이한 수의 아미노산 잔기를 임의로 선택하여 돌연변이를 수행할 수 있으며, 예를 들어 CDR1에 대해 1개의 아미노산의 돌연변이

를 수행하고 CDR2 및 CDR3에 대해 아미노산 돌연변이를 수행하지 않는 것일 수 있다.

- [0010] 본 출원에 있어서, 상기 돌연변이는 현재 당업자에게 공지된 돌연변이를 포함할 수 있으며, 예를 들어 항체의 생산 또는 적용 과정에서 항체에 대해 수행할 수 있는 일부 돌연변이이며, 예를 들어 존재할 수 있는 특히 CDR 영역의 번역 후 수식(Potential post-translational modifications, PTMs)된 부위에 대해 돌연변이를 수행하는 것이고, 항체의 응집, 아스파라긴 탈아미드화 감수성(asparagine deamidation) 부위(NG, NS, NH 등), 아스파라긴산 이성질화(DG, DP) 감수성 부위, N-글리코실화(N-{P}) 감수성 부위 및 산화 감수성 부위 등 관련 돌연변이, 또는 등전점을 낮추는 관련 돌연변이를 포함한다.
- [0011] 바람직하게는, 이는 상기 CDR2의 돌연변이는 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열에서 G2P, S4G 및 S5R/D/E/T 중 2 또는 1개의 아미노산 치환을 가지며; 이의 아미노산 서열은 바람직하게는 서열번호 11 내지 14, 서열번호 16 내지 18 중 어느 하나로 표시된다.
- [0012] 상기 G2P는 일반적으로 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열의 2번 아미노산 G가 P로 돌연변이됨을 지칭하며, S4G, S5R/D/E/T 등과 같은 다른 아미노산 치환도 당업자라면 모두 그 의미를 이해하여야 한다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 항-B7-H4 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고; 여기서, 상기 VH는 하기의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 돌연변이를 포함한다. 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 표시되는 CDR1, 서열번호 11 내지 18의 아미노산 서열로 표시되는 CDR2, 및, 서열번호 24 또는 25의 아미노산 서열로 표시되는 CDR3.
- [0014] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 11 및 24로 표시된다.
- [0015] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 5, 12 및 25로 표시된다.
- [0016] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 17 및 24로 표시된다.
- [0017] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 5, 18 및 25로 표시된다.
- [0018] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 13 및 24로 표시된다.
- [0019] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 14 및 24로 표시된다.
- [0020] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 15 및 24로 표시된다.
- [0021] 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-B7-H4 항체에서 상기 VH에 포함되는 CDR1, CDR2 및 CDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 16 및 24로 표시된다.
- [0022] 바람직하게는, 상기 VH의 프레임워크 영역은 인간 VH의 프레임워크 영역이다. 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 인간 VH의 프레임워크 영역은 아미노산 서열이 서열번호 2로 표시되는 FWR1, 아미노산 서열이 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나로 표시되는 FWR2, 아미노산 서열이 서열번호 20 내지 22 중 어느 하나로 표시되는 FWR3 및 아미노산 서열이 서열번호 26 또는 27로 표시되는 FWR4를 포함한다. 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 VH는 서열번호 36 내지 45 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 돌연변이를 포함하고; 상기 돌연변이는 상기 VH의 아미노산 서열 상에 하나 또는 복수의 아미노산 잔기의 결실, 치환 또는 첨가가 발생하는 것이고, 상기 돌연변이된 아미노산 서열은 상기 VH의 아미노산 서열과 적어도 85%의 서열 동일성을 가지고, 상기 항체와 B7-H4의 결합을 유지하거나 개선하며; 상기 적어도 85%의 서열 동일성은 바람직하게는 적어도 90%의 서열 동일성이고, 더 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성이며, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성이다.
- [0023] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 36으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 38

로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열 번호 39로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 40으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 42로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0024] 본 출원에서, 상기 나열된 CDR의 아미노산 서열은 모두 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된 것이다. 그러나 당업자에게 공지된 바와 같이, 당업계에서 다양한 방법을 통해 항체의 CDR을 정의할 수 있으며, 예를 들어 서열 가변성에 기초한 Kabat 정의 규칙(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)을 참조) 및 구조적 고리 영역의 위치에 기초한 Chothia 정의 규칙(JMol Biol 273:927-48, 1997을 참조)이다. 본 발명의 기술적 해결 수단에 있어서, 또한 Kabat 정의 및 Chothia 정의를 포함하는 Combined 정의 규칙을 사용하여 가변 도메인 서열의 아미노산 잔기를 결정할 수 있다. 그 중 Combined 정의 규칙은 Kabat 정의 및 Chothia 정의의 범위를 결합하고, 이를 기반으로 더 큰 범위를 취하는 것이며, 자세한 내용은 본 출원의 표 1-3을 참조한다. 달리 명시하지 않는 한, 당업자는 주어진 항체 또는 이의 영역(예를 들어 가변 영역)의 용어 “CDR” 및 “상보성 결정 영역”은 본 발명에 서술된 상기 공지된 형태에서의 임의의 하나에 의해 정의된 상보성 결정 영역을 포괄하는 것을 이해하여야 한다. 본 발명에서 보호를 청구하고 있는 범위는 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된 서열이지만, 다른 CDR의 정의 규칙에 따른 상응하는 아미노산 서열도 본 발명의 보호 범위에 포함되어야 한다.

[0025] 따라서, 본 발명에 정의된 특정 CDR 서열로 항체를 한정하는 경우, 상기 항체의 범위는 가변 영역 서열이 상기 특정 CDR 서열을 포함하나 상이한 형태(다른 할당 시스템 규칙 또는 조합)의 적용으로 인해 주장하는 CDR 경계가 본 발명에서 정의된 특정 CDR 경계와 상이한 항체를 포괄한다.

[0026] 바람직하게는, 항-B7-H4 항체는 전장 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 바람직하게는 scFv, 이중특이성 항체, 다중 특이성 항체, 중쇄 항체 또는 단일 도메인 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 능력을 보유(항원에 특이적으로 결합하는 항체의 능력의 일부를 보유할 수 있음)하는 다른 임의의 항체, 또는 상기 항체로부터 제조된 단일클론 항체 또는 다중클론 항체이다.

[0027] 바람직하게는, 상기 항-B7-H4 항체는 중쇄 항체이다. 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 48 내지 57 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 돌연변이를 포함한다. 상기 돌연변이는 상기 아미노산 서열 상에 하나 또는 복수의 아미노산 잔기의 결실, 치환 또는 첨가가 발생하는 것이고, 상기 돌연변이된 아미노산 서열은 상기 아미노산 서열과 적어도 85%의 서열 동일성을 가지고, 상기 항체와 B7-H4의 결합을 유지하거나 개선하며; 상기 적어도 85%의 서열 동일성은 바람직하게는 적어도 90%의 서열 동일성이고; 더 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성이며; 가장 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성이다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 48로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 49로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 51로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 52로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 54로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 중쇄 항체는 서열번호 55로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 본 출원에서, 상기 “Fab 단편”은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄의 CH1 및 가변 영역으로 구성된다. Fab 단편의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 이황화 결합을 형성할 수 없다. “Fc” 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편이다. 2개의 중쇄 단편은 2개 또는 복수의 이황화 결합 및 CH3 도메인의 소수성 작용에 의해 함께 유지된다. 상기 “Fab’ 단편”은 하나의 경쇄, 및 VH 도메인, CH1 도메인 및 CH1과 CH2 도메인 사이를 포함하는 영역을 포함하며, 이에 의해 2개의 Fab’ 단편의 2개의 중쇄 사이에 이황화 결합을 형성하여 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다. 상기 “F(ab')₂ 단편”은 2개의 경쇄 및 CH1과 CH2 도메인 사이의 불변 영역의 일부를 포함하는 2개의 중쇄를 포함하며, 이에 의해 2개의 중쇄 사이에 사슬 간 이황화 결합을 형성한다. 따라서 F(ab')₂

단편은 2개의 중쇄 사이의 이황화 결합을 통해 함께 유지되어 있는 2개의 Fab' 단편으로 구성된다. 상기 용어 “Fv” 는 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 구성되지만 불변 영역이 결합된 항체 단편을 지칭한다.

- [0029] 본 출원에서, 상기 scFv(single chain antibody fragment, 단일 사슬 항체)는 당업계의 통상적인 단일 사슬 항체일 수 있으며, 이는 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및 15 내지 20개 아미노산의 링커 짧은 펩타이드를 포함한다. 그 중 VL 및 VH 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬의 생성을 가능하게 하는 링커를 페어링하여 1가 분자를 형성한다[예를 들어, Bird et al., Science 242:423-426 (1988) 및 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988)을 참조]. 이러한 scFv 분자는 일반적인 구조: NH₂-VL-링커-VH-COOH 또는 NH₂-VH-링커-VL-COOH를 가질 수 있다. 적합한 기존 기술 링커는 반복된 G₄S 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성된다. 예를 들어, 아미노산 서열 (G₄S)₄(즉 서열번호 88) 또는 (G₄S)₃을 갖는 링커를 사용할 수 있으나, 이의 변이체를 사용할 수도 있다.
- [0030] 본 출원에서, 용어 “다중특이성 항체” 는 이의 가장 넓은 의미로 사용되며, 다중 에피토프 특이성을 갖는 항체를 포괄한다. 이러한 다중특이성 항체로는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고 상기 VH-VL 단위가 다중 에피토프 특이성을 갖는 항체; 2개 또는 복수의 VL 및 VH 영역을 가지고 각 VH-VL 단위가 상이한 표적 또는 동일한 표적의 상이한 에피토프와 결합하는 항체; 2개 또는 복수의 단일 가변 영역을 가지고 각 단일 가변 영역이 상이한 표적 또는 동일한 표적의 상이한 에피토프와 결합하는 항체; 전장 항체, 항체 단편, 이중특이성 항체(diabodies), 삼중 항체(triabodies), 공유 결합 또는 비공유 결합으로 함께 연결된 항체 단편 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본 출원에서, 상기 단일클론 항체 또는 mAb 또는 Ab는 단일 클론 세포주에 의해 얻은 단일 항원 에피토프를 표적으로 하는 항체를 지칭하며, 상기 세포주는 진핵, 원핵 또는 과자의 클론 세포주에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 출원에서, 상기 단일 도메인 항체는 “나노 바디” 라고도 하고, 이는 중쇄 항체에서 클로닝된 VHH 구조를 지칭하며 표적 항원에 결합 가능한 가장 작은 단위로 알려져 있다.
- [0033] 본 출원에서, 상기 “중쇄 항체” 는 1개의 중쇄 가변 영역(VHH)과 2개의 통상적인 CH2 및 CH3 도메인만을 포함하는 항체를 지칭하며, HCAb라고도 한다.
- [0034] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제2 양태에 있어서 단백질 기능 영역 A 및 단백질 기능 영역 B를 포함하는 이중특이성 항체를 제공하며; 상기 단백질 기능 영역 A 및 상기 단백질 기능 영역 B는 상이한 항원을 표적으로 하고, 여기서 상기 단백질 기능 영역 B는 B7-H4를 표적으로 하고, 상기 단백질 기능 영역 A는 비-B7-H4를 표적으로 하며; 상기 이중특이성 항체는 하기 a) 또는 b)에서 선택된다.
- [0035] a) 상기 단백질 기능 영역 B는 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체에서 선택되고; 또는 상기 단백질 기능 영역 B는 서열번호 72로 표시되는 HCDR1, 서열번호 74로 표시되는 HCDR2, 서열번호 76으로 표시되는 HCDR3, 서열번호 78로 표시되는 LCDR1, 서열번호 80으로 표시되는 LCDR2, 서열번호 82로 표시되는 LCDR3을 포함한다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 이중특이성 항체의 구조는 폴리펩타이드 사슬 1, 폴리펩타이드 사슬 2 및 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하며, 상기 폴리펩타이드 사슬 1은 식: N' -VL_A-CL-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 2는 식: N' -VH_A-CH1-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 3은 식: N' -VH_{B1}-링커-VH_{B2}-힌지 영역(연결 펩타이드일 수도 있음)-CH2-CH3-C' , 또는 식: N' -VH_B-힌지 영역(연결 펩타이드일 수도 있음)-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 여기서, 상기 VL_A 및 VH_A는 각각 상기 단백질 기능 영역 A의 VL 및 VH이고, 상기 VH_{B1} 및 VH_{B2}는 상기 단백질 기능 영역 B의 VH이며, VH_{B1} 및 VH_{B2}의 서열은 동일하거나 상이할 수 있고, VH_{B1} 및 VH_{B2} 사이는 연결 펩타이드에 의해 연결될 수 있다. 여기서, VH_A 및 VL_A는 각각 단백질 기능 영역 A의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이고, VH_B 및 VL_B는 단백질 기능 영역 B의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이고; CL은 경쇄 불변 영역 도메인이고; CH1, CH2 및 CH3은 각각 중쇄 불변 영역의 제1, 제2 및 제3 도메인이다.
- [0037] b) 상기 단백질 기능 영역 B는 서열번호 72로 표시되는 HCDR1, 서열번호 74로 표시되는 HCDR2, 서열번호 76으로 표시되는 HCDR3, 서열번호 78로 표시되는 LCDR1, 서열번호 80으로 표시되는 LCDR2, 서열번호 82로 표시되는 LCDR3을 포함한다.
- [0038] 바람직하게는, 상기 이중특이성 항체의 구조는 폴리펩타이드 사슬 1, 폴리펩타이드 사슬 2 및 폴리펩타이드 사슬 3을 포함하며, 상기 폴리펩타이드 사슬 1은 식: N' -VL_A-CL-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 2는 식: N' -VH_A-CH1-힌지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 상기 폴리펩타이드 사슬 3은 식: N' -VL_B-링커-VH_B-힌

지 영역-CH2-CH3-C' 로 표시되고; 여기서, 상기 VL_A 및 VH_A는 각각 상기 단백질 기능 영역 A의 VL 및 VH이고, 상기 VL_B 및 VH_B는 상기 단백질 기능 영역 B의 VL 및 VH이다.

[0039] 일부 바람직한 실시예에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-CD3 항체이고, 상기 VH는 아미노산 서열이 서열번호 3으로 표시되는 VH CDR1, 아미노산 서열이 서열번호 10으로 표시되는 VH CDR2 및 아미노산 서열이 서열번호 23으로 표시되는 VH CDR3을 포함하고, 상기 VL은 아미노산 서열이 서열번호 29로 표시되는 VL CDR1, 아미노산 서열이 서열번호 31로 표시되는 VL CDR2 및 아미노산 서열이 서열번호 33으로 표시되는 VL CDR3을 포함한다. 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 아미노산 서열이 서열번호 35로 표시되는 VH 및 아미노산 서열이 서열번호 46으로 표시되는 VL을 포함한다. 어느 한 실시 형태에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 아미노산 서열이 서열번호 47로 표시되는 중쇄 및 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 경쇄를 포함한다.

[0040] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 29, 31 및 33으로 표시되는 아미노산 서열이며; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 3, 10 및 23으로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하며, 각각 서열번호 4, 17 및 24로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 나열된 CDR의 아미노산 서열은 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 29, 31 및 33으로 표시되는 아미노산 서열이며; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 3, 10 및 23으로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하며, 각각 서열번호 5, 18 및 25로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 나열된 CDR의 아미노산 서열은 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 29, 31 및 33으로 표시되는 아미노산 서열이며; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 3, 10 및 23으로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 단백질 기능 영역 B는 제1 중쇄 가변 영역 및 제2 중쇄 가변 영역을 포함하고; 상기 제1 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 4, 17 및 24로 표시되는 아미노산 서열이며; 상기 제2 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 5, 18 및 25로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 나열된 CDR의 아미노산 서열은 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 29, 31 및 33으로 표시되는 아미노산 서열이며; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 3, 10 및 23으로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고; 상기 중쇄 가변 영역 VH는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 72, 74 및 76으로 표시되는 아미노산 서열이며; 상기 경쇄 가변 영역 VL은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 각각 서열번호 78, 80 및 82로 표시되는 아미노산 서열이다. 상기 나열된 CDR의 아미노산 서열은 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된다.

[0041] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역 및 제2 중쇄 가변 영역을 포함하며; 상기 제1 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 제2 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 이의 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 단백질 기능 영역 B는 제1 중쇄 가변 영역 및 제2 중쇄 가변 영역을 포함하며; 상기 제1 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 제2 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 45로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 단백질 기능 영역 A는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고; 이의 경쇄 가변 영역 VL은 서열번호 46으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 이

의 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 35로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 단백질 기능 영역 B는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고; 상기 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 84로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 제2 중쇄 가변 영역 VH는 서열번호 85로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0042] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 60으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0043] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 61로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0044] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 62로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0045] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 63으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0046] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 64로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0047] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 65로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0048] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 69로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0049] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 70으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0050] 어느 한 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 아미노산 서열이 서열번호 58로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 1, 아미노산 서열이 서열번호 59로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 2, 아미노산 서열이 서열번호 86으로 표시되는 폴리펩타이드 사슬 3을 포함한다.
- [0051] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제3 양태에 있어서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0052] 상기 핵산의 제조 방법은 본 분야의 통상적인 제조 방법이며, 바람직하게는 유전자 클로닝 기술을 통해 상기 항체를 코딩하는 핵산 분자를 얻는 단계, 또는 인공적인 전체 서열 합성 방법을 통해 상기 항체를 코딩하는 핵산 분자를 얻는 단계를 포함한다.
- [0053] 상기 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이 폴리뉴클레오티드의 상동체를 제공하기 위해 치환, 결실, 변경, 삽입 또는 증가를 적절하게 도입할 수 있는 것은 당업자에게 알려져 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 상동체는 항체의 활성을 유지하는 범위 내에서 해당 항체 서열을 코딩하는 유전자의 하나 또는 복수의 염기에 대해 치환, 결실 또는 증가를 수행하여 제조될 수 있다.
- [0054] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제4 양태에 있어서, 본 발명의 제3 양태에 따른 단리된 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0055] 상기 재조합 발현 벡터는 당업계의 통상적인 방법으로 얻을 수 있으며, 즉 본 출원에 서술된 핵산 분자를 다양한 발현 벡터에 연결하여 구축한다. 상기 발현 벡터는 상기 핵산 분자를 수용할 수 있는 한 당업계의 통상적인 다양한 벡터이다.

- [0056] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 진핵 세포 발현 벡터 및/또는 원핵 세포 발현 벡터를 포함한다.
- [0057] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제5 양태에 있어서, 본 발명의 제4 양태에 따른 재조합 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.
- [0058] 상기 형질전환체의 제조 방법은 당업계의 통상적인 제조 방법일 수 있으며, 예를 들어 상기 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 형질전환시켜 제조한다. 상기 형질전환체의 숙주 세포는 상기 재조합 발현 벡터가 안정적으로 자가 복제할 수 있고, 운반되는 핵산이 효과적으로 발현될 수 있는 한, 당업계의 통상적인 다양한 숙주 세포이다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 원핵 세포 및/또는 진핵 세포이고, 상기 원핵 세포는 바람직하게는 TG1, B121(단일 사슬 항체 또는 Fab 항체 발현)과 같은 *E. coli* 세포이고, 상기 진핵 세포는 바람직하게는 HEK293 세포 또는 CHO 세포(전장 IgG 항체 발현)이다. 본 발명의 바람직한 재조합 발현 형질전환체는 진술한 재조합 발현 플라스미드를 숙주 세포에 형질전환시켜 얻을 수 있다. 상기 형질전환 방법은 당업계의 통상적인 형질전환 방법이며, 바람직하게는 화학적 형질전환법, 열충격법 또는 전기천공법이다.
- [0059] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제6 양태에 있어서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다.
- [0060] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제7 양태에 있어서, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 세포를 제공한다.
- [0061] 바람직하게는, 상기 유전자 변형된 세포는 진핵 세포이고, 바람직하게는 단리된 인간 세포이고; 더 바람직하게는 면역세포인 T 세포, 또는 NK 세포이다.
- [0062] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제8 양태에 있어서, 항-B7-H4 항체 또는 이중특이성 항체의 제조 방법을 제공하며, 상기 제조 방법은 본 발명의 제5 양태에 따른 형질전환체를 배양하는 단계, 배양물로부터 항-B7-H4 항체 또는 이중특이성 항체를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0063] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제9 양태에 있어서, 항체 부분 및 접합 부분을 포함하는 항체 약물 접합체를 제공하며, 상기 항체 부분은 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체 또는 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체를 포함하고, 상기 접합 부분은 검출 가능한 마커, 약물, 독소, 사이토카인, 방사성핵종, 효소, 또는 이들의 조합을 포함하고, 상기 항체 부분 및 접합 부분은 화학 결합 또는 링커를 통해 접합한다.
- [0064] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제10 양태에 있어서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체, 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제7 양태에 따른 유전자 변형된 세포 및/또는 본 발명의 제9 양태에 따른 항체 약물 접합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0065] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다.
- [0066] 더 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 0.01 내지 99.99%의 상기 단백질 및/또는 상기 항체 약물 접합체, 및 0.01 내지 99.99%의 담체를 포함하며, 상기 백분율은 상기 약학 조성물의 질량 백분율이다.
- [0067] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 바람직하게는 비경구 투여, 주사 투여 또는 경구 투여이다. 상기 주사 투여는 바람직하게는 정맥 주사, 근육 주사, 복강 주사, 피내 주사 또는 피하 주사 등 경로를 포함한다. 상기 약학 조성물은 당업계의 통상적인 다양한 제형이고, 바람직하게는 액체 제형, 기체 제형, 고형 제형 및 반고형 제형의 형태이고, 즉 수용액, 비수성 용액 또는 현탁액일 수 있으며, 더 바람직하게는 정제, 캡슐, 과립제, 주사제 또는 주입제 등이다. 더 바람직하게는, 혈관내, 피하, 복강내 또는 근육내 투여이다. 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 또한 에어로졸 또는 스프레이로 투여할 수 있고, 즉 비강 투여이고; 또는 척수강내, 골수내 또는 심실내 투여이다. 더 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 또한 경구 투여, 주사 투여, 비강 투여, 경피 투여 또는 점막 투여일 수도 있다. 본 발명의 약학 조성물은 필요에 따라 다양한 제형으로 제조될 수 있으며, 환자의 유형, 연령, 체중 및 대체적인 질병 상태, 투여 방법 등 요인을 고려하여 의사가 환자에게 유익한 투여량을 결정하여 투여할 수 있다. 투여 방법은 예를 들어 주사 또는 다른 치료 방법일 수 있다.
- [0068] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량 수준은 진단 또는 치료 결과를 달성하는데 필요한 조성물의 양에 따라 조절될 수 있다. 투여 방법은 단일 주사 또는 다중 주사일 수 있고, 또는 조절할 수도 있다. 선택된 투여량 수준 및 방법은 상기 약학 조성물의 활성 및 안정성(즉, 반감기), 제제, 투여 경로, 다른 약물 또는 치료와의 복합, 검출 및/또는 치료될 질환 또는 질병, 및 치료할 피험자의 건강 상태 및 과거 병력 등을 포함한 다양한 요인을

고려하여 합리적으로 조절될 수 있다.

- [0069] 바람직하게는, 상기 약학 조성물은 복합 요법을 수행하기 위한 복합 치료제를 더 포함할 수 있으며, 상기 복합 치료제는 화학치료제, 방사선치료제, 면역억제제 및/또는 세포독성 약물을 포함한다. 복합 요법의 경우, 상기 항체, 상기 항체 약물 접합체 및/또는 추가의 치료제 또는 진단제는 각각 단일 약제로서, 예상된 치료 또는 진단을 수행하기에 적절한 임의의 기간 범위 내에 사용될 수 있다. 따라서, 이러한 단일 약제는 실질적으로 동시에(즉 단일 제제로 또는 몇 분 또는 몇 시간 내에) 또는 순차적으로 연속으로 투여될 수 있다.
- [0070] 제제, 투여량, 투여 방법 및 측정 가능한 치료 결과에 대한 추가 지침은, Berkow et al., (2000) The Merck Manual of Medical Information(Merck 의료 정보 매뉴얼) 및 Merck&Co.Inc., Whitehouse Station, New Jersey; Ebadi (1998) CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology(임상 약리학 매뉴얼) 등 저작물을 참조한다.
- [0071] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제11 양태에 있어서, 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 약물, 키트 및/또는 약물 전달 장치의 제조에 있어서의, 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체, 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제7 양태에 따른 유전자 변형된 세포, 본 발명의 제9 양태에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 본 발명의 제10 양태에 따른 약학 조성물의 용도를 제공하거나; 암을 치료 및/또는 예방하기 위한 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체, 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제7 양태에 따른 유전자 변형된 세포, 본 발명의 제9 양태에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 본 발명의 제10 양태에 따른 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0072] 바람직하게는, 상기 암은 폐암, 삼중 음성 유방암과 같은 유방암, 난소암, 자궁내막종, 위암, 소장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 신장암, 방광암, 전립선암, 담관암, 식도암 및 골육종 등으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0073] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제12 양태에 있어서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항체, 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제7 양태에 따른 유전자 변형된 세포, 본 발명의 제9 양태에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 본 발명의 제10 양태에 따른 약학 조성물; 및 선택적으로, 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0074] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제13 양태에 있어서, (1) 본 발명의 제10 양태에 따른 약학 조성물을 필요한 피험자에게 투여하기 위한 주입 모듈, 및 (2) 선택적인 약효 모니터링 모듈을 포함하는 약물 전달 장치를 제공한다.
- [0075] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 제14 양태에 있어서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항체 및/또는 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체를 사용하여 검출하는 단계를 포함하는 B7-H4를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0076] 바람직하게는, 상기 방법은 비진단 및/또는 치료를 위한 목적이다. 비진단, 치료를 위한 목적은 예를 들어 실험실에서 시료에 포함된 B7-H4이거나; 연구 개발에서 B7-H4를 약물 스크리닝에 사용하기 전에 해당 B7-H4에 대해 확인하는 것이다.
- [0077] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 필요한 피험자에게 치료 유효량의 본 발명의 제1 양태에 따른 항-B7-H4 항체, 본 발명의 제2 양태에 따른 이중특이성 항체, 본 발명의 제6 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제7 양태에 따른 유전자 변형된 세포, 본 발명의 제9 양태에 따른 항체 약물 접합체 및/또는 본 발명의 제10 양태에 따른 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는 종양을 치료 및/또는 예방하는 방법을 더 제공한다.
- [0078] 본 발명에 서술된 약학 조성물의 치료 유효량은 세포 배양 실험 또는 설치류, 토끼, 개, 돼지 및/또는 영장류와 같은 동물 모델에서 초기에 추정될 수 있다. 동물 모델은 적절한 투여 농도 범위와 경로를 측정하기 위해 사용할 수도 있다. 이어서 인간에게 투여하는 유용한 투여량과 경로를 결정하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 투여 유효량 또는 투여량의 결정과 조절 및 이러한 조절을 수행하는 시기 및 방법에 대한 평가는 당업자에게 공지되어 있다.
- [0079] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 필요한 피험자에게 치료 유효량의 약학 조성물 및 복합 치료제를 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 복합 요법을 더 제공하며; 상기 약학 조성물은 본 발명의 제10 양태에 서술된 바와 같다.

- [0080] 바람직하게는, 상기 복합 치료제는 본 발명의 제10 양태에 서술된 바와 같다.
- [0081] 본 출원에서, 달리 명시되지 않는 한, 본 출원에 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자가 이해하는 통상적인 의미를 가진다. 또한, 본 출원에 사용된 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 면역학 실험실 조작 단계는 모두 해당 분야에서 널리 사용되는 통상적인 단계이다. 동시에, 본 발명을 더 잘 이해하기 위하여, 아래 관련 용어의 정의 및 해석을 제공한다.
- [0082] 본 출원에서, 용어 “가변”은 일반적으로 항체의 가변 도메인의 서열의 특정 부분이 강하게 변경되어 특정 항원에 대한 다양한 특정 항체의 결합 및 특이성을 형성한다는 사실을 지칭한다. 그러나 변이성은 항체의 가변 영역 전체에 균일하게 분포되지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 3개 영역 부분에 집중되어 있으며, 상보성 결정 영역(CDR) 또는 초가변 영역(HVR)으로 불리운다. 가변 도메인에서 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크(FWR)라고 한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FWR 영역을 포함하며, 대부분은 β -시트 구조를 사용하고, 3개의 CDR을 통해 연결되어, 루프 연결을 형성하며, 일부 경우에 따라 β -시트 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬의 CDR은 FWR 영역을 통해 서로 밀접하게 결합하고, 다른 사슬의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위를 형성하며, 불변 영역은 항체와 항원의 결합에 직접적으로 참여하지 않지만, 항체의 항체 의존성 세포 독성에 관여하는 것과 같은 상이한 효과 기능을 나타낸다.
- [0083] 본 출원에 사용된 아미노산에 대한 3문자 코드 및 단일문자 코드는 당업자에게 공지되어 있거나, J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)에 서술된 바와 같다.
- [0084] 본문에 사용된 바와 같이, 용어 “포괄” 또는 “포함”은 조성물 및 방법이 상기 요소를 포함하지만 다른 요소를 배제하는 것이 아니라 문맥의 이해에 따라 “……로 구성되는” 경우도 포함하는 것을 의미한다.
- [0085] 본 출원에서, 상기 HCAb는 인간 면역글로불린 면역 레퍼토리를 보유하는 형질전환 마우스-HarbourHCAb 마우스 (Harbour Antibodies BV, WO 2002/085945 A3)에 의해 생성될 수 있으며, “중쇄”의 완전 인간 항체 (Heavy Chain Only Antibody)만을 포함하고, 상기 항체의 크기는 기존 IgG 항체의 절반에 불과하며, 일반적으로 인간 항체 “중쇄” 가변 도메인 및 마우스 Fc 불변 도메인만 가지고 있다.
- [0086] 본 출원에 사용된 용어 “항체”는 면역글로불린을 포함할 수 있으며, 이는 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄에 의해 사슬 간 이황화 결합을 통해 연결되어 형성된 테트라펩타이드 사슬 구조이다. 면역글로불린 중쇄 불변 영역의 아미노산 구성과 배열 순서가 다르기 때문에 이의 항원성도 다르다. 따라서 면역글로불린은 5가지 유형으로 나눌 수 있거나, 면역글로불린의 아이소타입이라고 하며, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE이고, 이에 상응하는 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ϵ 사슬이다. 동일한 유형의 Ig는 이의 힌지 영역의 아미노산 구성 및 중쇄 이황화 결합의 수 및 위치의 차이에 따라 상이한 하위 유형으로도 나눌 수 있으며, 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 나눌 수 있다. 경쇄는 불변 영역의 차이에 따라 κ 사슬 또는 λ 사슬로 나뉜다. 5가지의 Ig에서 각 유형의 Ig는 모두 κ 사슬 또는 λ 사슬을 가질 수 있다.
- [0087] 본 출원에서, 본 출원에 서술된 항체 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역을 더 포함할 수 있으며, 상기 경쇄 불변 영역은 인간 유래의 κ , λ 사슬 또는 이의 변이체를 포함한다. 본 출원에서, 본 출원에 서술된 항체 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역을 더 포함할 수 있으며, 상기 중쇄 불변 영역은 인간 유래의 IgG1, 2, 3, 4 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0088] 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 “J” 영역을 통해 연결되며, 중쇄는 약 3개 이상의 아미노산의 “D” 영역을 더 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. 항체의 불변 영역은 면역 체계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 체계의 제1 성분(C1q)의 결합을 포함하여 면역글로불린이 숙주 조직 또는 인자와 결합하는 것을 매개할 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄의 N 말단 근처에 있는 약 110개의 아미노산 서열은 변화가 매우 다양하므로 가변 영역(V 영역)이고; C 말단 근처에 있는 나머지 아미노산 서열은 상대적으로 안정적이므로 불변 영역(C 영역)이다. 가변 영역은 3개의 초가변 영역(HVR) 및 4개의 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FWR)을 포함한다. 3개의 초가변 영역은 항체의 특이성을 결정하므로 상보성 결정 영역(CDR)이라고도 한다. 각각의 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 가변 영역(VH)은 3개의 CDR 영역 및 4개의 FWR 영역으로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단으로의 순서는: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4이다. 경쇄의 3개의 CDR 영역은 VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3을 지칭하고; 중쇄의 3개의 CDR 영역은 VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3을 지칭한다.

- [0089] 용어 “인간 유래 항체”는 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 출원의 인간 유래 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어 체외에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 용어 “인간 유래 항체”는 다른 포유동물 중(예를 들어 마우스)의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열을 인간 프레임워크 서열로 이식된 항체를 포함하지 않는다.
- [0090] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 항체와 관련된 용어 “특이성”은 특이성 항원을 식별하지만 시료의 다른 분자를 실질적으로 식별하거나 결합하지 않는 항체를 지칭한다. 예를 들어, 한 종의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 하나 또는 복수의 종의 상기 항원에도 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 중간 교차 반응성 자체는 특이성에 따른 항체의 분류를 변경하지 않는다. 또 다른 한 실시예에 있어서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 항원의 상이한 대립유전자 형태에 결합할 수도 있다. 그러나 이러한 교차 반응성 자체는 특이성에 따른 항체의 분류를 변경하지 않는다. 일부 경우에, 용어 “특이성” 또는 “특이적으로 결합”은 항체, 단백질 또는 펩타이드와 제2 화학 물질의 상호작용을 지칭하는 데 사용될 수 있고, 상기 상호작용은 화학 물질의 특정 구조(예를 들어, 항원 결정 클러스터 또는 에피토프)의 존재에 따라 결정되는 것을 의미하며; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 식별하고 결합한다. 만약 항체가 에피토프 “A”에 대해 특이적인 경우, 표지된 “A” 및 항체를 포함하는 반응에서 에피토프 A를 포함하는 분자(또는 유리된, 표지되지 않은 A)의 존재는 항체에 결합하는 표지된 A의 양을 감소시킨다.
- [0091] 본 출원에서, 용어 “항원 결합 단편”은 항체의 항원 결합 단편 및 항체 유사체를 지칭하며, 일반적으로 적어도 일부 모체 항체(parental antibody)의 항원 결합 영역 또는 가변 영역(예를 들어 하나 또는 복수의 CDR)을 포함한다. 항원 결합 단편은 모체 항체의 적어도 일부 결합 특이성을 유지한다. 일반적으로, 활성을 몰 기준으로 나타내는 경우, 항원 결합 단편은 적어도 10%의 모체 결합 활성을 유지한다. 바람직하게는, 항원 결합 단편은 표적에 대한 모체 항체의 결합 친화도의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 또는 그 이상을 유지한다. 항원 결합 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 선형 항체(linear antibody), 단일 사슬 항체, 나노바디, 단일 도메인 항체 및 다중특이성 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항원 결합 단편은 조작된 항체 변이체일 수 있다. 조작된 항체 변이체는 Holliger 및 Hudson(2005)Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136에 요약되어 있다.
- [0092] 본문에 사용된 용어 “키메라 항원 수용체” 또는 “CAR”(Chimeric antigen receptor)은 항원에 결합할 수 있는 세포의 도메인(세포외 결합 도메인), 힌지 도메인, 막횡단 도메인(막횡단 영역) 및 세포질 신호를 도메인에 전달하는 폴리펩타이드(즉, 세포내 신호전달 도메인)를 포함하는 것을 지칭한다. 힌지 도메인은 세포외 항원 결합 영역에 유연성을 제공하는 부분으로 간주될 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 결정된 신호전달 경로에 의해 2차 전달자를 생성하여 세포 활성을 조절하기 위해 세포 내로 정보를 전달하는 단백질, 또는 이러한 전달자에 대응하여 이펙터 역할을 하는 단백질을 지칭하며, CAR의 세포(예를 들어 CART 세포)의 면역 효과기 기능을 촉진할 수 있는 신호를 생성한다. 세포내 신호 도메인은 세포 전달 도메인을 포함하고, 공동 자극 분자로부터 유래된 공동 자극 세포내 도메인을 더 포함할 수 있다.
- [0093] “동일성”, “돌연변이”는 2개의 폴리뉴클레오티드 서열 사이 또는 2개의 폴리펩티드 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열의 위치가 모두 동일한 염기 또는 아미노산 단량체의 서브 유닛에 의해 점유되는 경우, 예를 들어 2개의 DNA 분자의 모든 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 상기 분자는 해당 위치에서 상동이다. 2개의 서열 사이의 동일성 백분율은 2개의 서열이 공유하는 매칭 또는 상동 위치의 수를 비교 위치의 수로 나누어 ×100의 함수이다. 예를 들어, 서열이 최적으로 비교된 경우, 2개의 서열에서의 10개 위치 중 6개가 매칭되거나 상동이면, 2개의 서열은 60% 상동이다. 일반적으로 2개의 서열에 대한 비교가 가장 큰 동일성 백분율을 얻을 때 비교가 이루어진다.
- [0094] 용어 “폴리펩타이드”, “펩타이드” 및 “단백질”(단일 사슬인 경우)은 본 출원에서 상호 교환하여 사용된다. 용어 “핵산”, “핵산 서열”, “뉴클레오티드 서열” 또는 “폴리뉴클레오티드 서열” 및 “폴리뉴클레오티드”는 상호 교환하여 사용된다.
- [0095] 본문에 사용된 용어 “백터”는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는 데 사용될 수 있는 조성물이다. 당업계에는 많은 백터가 공지되어 있으며, 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 따라서 용어 “백터”는 자가 복제되는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 폴리라이신 화합물, 리포솜 등과 같이 핵산을 세포로 전달하는 것을 촉진하는 비플라스미드 및 비바이러스성 화합물도 포함하는 것으로 해석되어야

한다. 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0096] 본 출원에서 사용된 용어 “세포”, “세포주”는 상호 교환하여 사용할 수 있으며, 이러한 모든 명칭은 모두 자손을 포함한다. 용어 “숙주 세포”는 벡터를 도입하는 데 사용될 수 있는 세포를 지칭하며, 대장균 (*Escherichia coli*) 등과 같은 원핵 세포, 효모 세포 등과 같은 진균 세포, 또는 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포 등과 같은 동물 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0097] 용어 “형질감염”은 외인성 핵산을 진핵 세포에 도입하는 것을 지칭한다. 형질감염은 당업계에 공지된 다양한 수단에 의해 구현될 수 있으며, 인산칼슘-DNA 공침전, DEAE-텍스트란에 의해 매개된 형질감염, 폴리브렌에 의해 매개된 형질감염, 전기천공, 미세주사, 리포솜 융합, 리포펙션, 원형질체 융합, 레트로바이러스 감염 및 바이올리스틱스(biolistics)를 포함한다.

[0098] 용어 “면역세포”는 면역 반응을 유도할 수 있는 세포를 지칭하며, “면역세포” 및 이의 문법 상의 다른 형태는 모든 기원의 면역 세포를 지칭할 수 있다. “면역세포”는, 예를 들어 골수에서 생성된 조혈 줄기 세포(HSC)로부터 파생된 백혈 세포(백혈구), 림프구(T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 골수 유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포)를 포함한다. 용어 “면역세포”는 인간 또는 비인간일 수도 있다. 예를 들어, 면역 세포는 자가 T 세포, 동종 T 세포, 자가 NK 세포, 동종 NK 세포와 같이 혈액에서 유래할 수 있고, EBV 바이러스 감염을 사용하여 제조된 NK 세포주, 배아줄기 세포 및 iPSC로부터 유도 및 분화된 NK 세포 및 NK92 세포주 등과 같이 세포주에서 유래할 수도 있다.

[0099] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 “T 세포”는 흉선에서 성숙되는 림프구의 일종을 지칭한다. T 세포는 세포에 의해 매개되는 면역에서 중요한 역할을 하며 다른 림프구(예를 들어 B 세포)와의 차이점은 세포 표면에 T 세포 수용체가 존재한다는 것이다. “T 세포”는 T 보조 세포(CD4+ 세포), 세포독성 T 세포(CD8+ 세포), 자연 살해 T 세포, T 조절 세포(Tregs) 및 γ - δ T 세포를 포함하여 CD3을 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다. “세포독성 세포”는 세포독성 반응을 매개할 수 있는 CD8+ T 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 호중구를 포함한다. 본문에 사용된 바와 같이, 용어 “NK 세포”는 골수에서 유래하고 선천성 면역 체계에서 중요한 역할을 하는 림프구의 일종을 지칭한다. NK 세포는 세포 표면에 항체 및 주요 조직 적합성 복합체가 없는 경우에도 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포 또는 다른 스트레스를 받는 세포에 대해 신속한 면역 반응을 제공한다.

[0100] “임의의”, “어느 하나”, “선택적으로” 또는 “임의의 하나”는 이후에 설명되는 사항 또는 환경이 발생할 가능성이 있지만 반드시 발생하는 것은 아니며, 해당 설명은 해당 사항 또는 환경이 발생하거나 발생하지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, “1개의 항체 중쇄 가변 영역을 임의로 포함하는” 것은 특정 서열의 항체 중쇄 가변 영역이 존재할 수 있으나 반드시 존재하는 것은 아님을 의미한다. 본 발명에 사용된 “하나” 및 “일종”은 본 발명에서 하나 또는 하나 이상의 문법적 대상을 지칭하는 데 사용된다. 내용이 명백하게 달리 명시하지 않는 한, 용어 “또는”은 본 발명에서 용어 “및/또는”을 의미하며 상호 교환하여 사용된다. “약” 및 “대략”은 일반적으로 측정의 특성 또는 정밀도를 고려하여 측정되는 양의 허용 가능한 오차 정도를 의미한다. 예시적인 오차 정도는 일반적으로 10% 범위 이내이고 더 일반적으로 5% 범위 이내이다. 본 발명에 개시된 방법 및 조성물은 특정 서열, 변이체 서열 또는 이와 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어 서열 지정과 적어도 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상의 동일한 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 핵산을 포함한다. 아미노산 서열의 경우, 용어 “실질적으로 동일한”은 본 발명에서 첫 번째 아미노산 서열을 지칭하기 위해 사용된다.

[0101] 본 발명에 사용된 바와 같이, 용어 “약학적으로 허용 가능한 담체”는 약리학 적 및/또는 생리학적으로 피험자 및 활성 성분과 적합한 담체를 지칭하고, 예를 들어 임의의 적합한 생리학 적 또는 약학적으로 허용 가능한 약물 보조재이며, 당업계에 공지(예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995를 참조)되어 있고, pH 조절제, 부형제, 충전제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 강화제, 희석제, 삼투압을 유지하는 시약, 흡수를 지연시키는 시약, 방부제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 계면활성제는 Tween-80과 같은 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이온 강도 강화제는 염화나트륨을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 방부제는 파라벤, 트리클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등과 같은 다양한 항균 시약 및 항진균 시약을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 삼투압을 유지하는 시약은 당, NaCl 및 이의 유사물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 흡수를 지연시키는 시약은 모노스테아레이트와 젤라틴

을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 희석제는 물, 수성 완충액(예를 들어 완충 식염수), 알코올 및 폴리올(예를 들어 글리세롤) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 방부제는 티오메르살레이트, 2-페녹시에탄올, 파라벤, 트리클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등과 같은 다양한 항균 시약 및 항진균 시약을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 안정제는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가지며, 이는 약물에서의 활성 성분의 원하는 활성을 안정화할 수 있고, 글루타민산나트륨, 젤라틴, SPGA, 당류(예를 들어 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 유당, 텍스트란 또는 포도당), 아미노산(예를 들어 글루탐산, 글리신), 단백질(예를 들어 건조 유청, 알부민 또는 카세인) 또는 이의 분해 산물(예를 들어 락탈알부민 가수분해물) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 약학적으로 허용 가능한 담체는 당업계의 통상적인 담체일 수 있고, 상기 약물 보조제는 당업계의 통상적인 약물 보조제이다.

[0102] 본문에 사용된 바와 같이, 용어 EC₅₀은 절반 최대 효과 농도(concentration for 50% of maximal effect), 즉 50%의 최대 효과를 일으킬 수 있는 농도를 지칭한다.

[0103] 본문에 사용된 바와 같이, 용어 “암”, “암증”, “종양”은 조직병리학적 유형 또는 침습 단계에 상관없이 모든 유형의 암성 성장 또는 종양형성 과정, 전이성 조직 또는 악성 형질전환 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것을 의미한다. 예로는 고형 종양, 혈액암, 연조직 종양 및 전이성 병변을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0104] 상기 각 바람직한 조건은 당업계의 통상적인 지식에 부합하는 기초에서 본 발명의 각각의 바람직한 실시예를 얻기 위하여 임의로 조합될 수 있다.

[0105] 본 발명에서 사용된 시약 및 원료는 모두 시판되고 있다.

[0106] 본 발명의 긍정적인 진보 효과는:

[0107] 1. 본 발명의 항체는 인간 B7-H4 및 사이노몰구스 원숭이 B7-H4에 결합하는 활성을 갖는다. 어느 한 바람직한 실시예에 있어서, 상기 항체는 “중쇄”만을 포함하는 새로운 완전 인간 항체일 수 있고, 이의 크기는 전통적인 IgG 항체의 절반에 불과하며, 경쇄를 포함하지 않는 특징으로 인해 상기 항체는 이중특이성 항체에 사용될 수 있고, 경쇄 불일치 및 이중이량체화 문제를 해결한다.

[0108] 2. 본 발명의 항체를 B7-H4×CD3 이중특이성 항체로 제조하는 경우, 이는 여전히 인간 B7-H4 및 사이노몰구스 원숭이 B7-H4와 결합하는 활성을 유지하고, 종양 세포에 대해 비교적 강한 사멸 효과를 가지며, 유도된 IL-6 및 IFN- γ 와 같은 비특이적 사이토카인의 발현이 매우 낮고; 비교적 강한 체내 항종양 활성을 나타낸다. 어느 한 바람직한 실시예에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 인간 Fc 단편이 구비한 이중특이성 항체 구조를 가지고, Fc와 FcRn의 결합 효과를 유지함으로써 비교적 긴 반감기를 가지며; 동시에 바람직하게는, 돌연변이된(AAA) Fc는 FcRn과의 결합을 감소시킴으로써 FcRn의 가교 효과로 인해 발생하는 비특이성 T 세포의 활성화를 감소시킬 수 있으며; B7-H4 말단은 직렬 VHH 형태일 수 있어, 경쇄 및 중쇄의 불일치를 단순화하고, 또한 동시에 우수한 안정성 및 친수성을 유지하며; 2가 직렬 VHH는 한편으로 B7-H4의 친화성을 증가시키고, 다른 한편으로 B7-H4를 높게 발현하는 종양 세포에 대한 선택성을 증가시키며; 이중특이성 항체에서 CD3 말단의 활성을 최적화하고, 중간 강도의 항-CD3 항체를 사용하여 약효를 보장하는 전체 하에 독성을 감소시킨다.

도면의 간단한 설명

[0109] 도 1a 내지 1e는 FACS에 의해 검출된 세포 수준에서의 항 인간 B7-H4의 HCAb 단일클론 항체의 결합이다.

도 2는 BLI 방법으로 측정된 친화도이다.

도 3a 내지 3c는 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 구조이다.

도 4a 내지 4e는 FACS에 의해 검출된 인간, 사이노몰구스 원숭이 및 마우스 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주에서의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 체외 결합이다.

도 5a 내지 5f는 FACS에 의해 검출된 B7-H4를 내인성으로 발현하는 종양 세포 및 T 세포에서의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 체외 결합이다.

도 6a 내지 6e는 T 세포에 의한 MDA-MB-468 세포의 사멸 결과도이다.

도 7a 내지 7d는 T 세포에 의한 OVCAR-3 세포의 사멸 결과도이다.

도 8a 내지 8c는 T 세포에 의한 DLD-1, MDA-MB-231 세포의 사멸 결과도이다.

도 9a 및 9b는 비특이적 사이토카인 IL-6의 유도 결과도이다.

도 10a 및 10b는 비특이적 사이토카인 TNF- α 의 유도 결과도이다.

도 11a 및 11b는 비특이적 사이토카인 IFN- γ 의 유도 결과도이다.

도 12a 내지 12c는 마우스 종양 모델에 대한 체내 약효 실험이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0110] 이하 실시예를 통해 본 발명을 추가로 설명하지만, 본 발명이 상기 실시예의 범위에 한정되는 것이 아니다. 하기 실시예에서 구체적인 조건을 명시하지 않은 실험 방법은 통상적인 방법 및 조건에 따르거나 제품 설명서에 따라 선택된다.

[0111] 실시예 1. 항-B7-H4 HCAB 항체 분자의 획득

[0112] B7-H4 항원을 사용하여 실험 동물에 대해 면역화하여 B7-H4에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 얻을 수 있으며, 상기 실험 동물은 마우스, 랫트, 토끼, 양, 낙타 등일 수 있다. 일반적으로 수득된 항체 분자는 비인간 유래이다. 비인간 유래 항체를 수득한 후, 면역원성을 감소시키고 약용성을 향상시키기 위해 항체 공학 기술을 사용하여 이러한 분자에 대해 인간화 과정을 수행한다. 그러나 항체를 인간화하는 과정은 기술적으로 복잡하며, 인간화된 분자는 항원에 대한 친화력이 감소하는 경우가 많다. 다른 한편, 유전자 변형 기술의 발전으로 인간 면역글로불린 면역 레퍼토리를 보유하고 내인성 마우스의 면역 레퍼토리가 결여된 유전자 조작 마우스를 배양하는 것이 가능해졌다. 이러한 유전자 변형된 마우스가 생산한 항체는 완전 인간 서열을 가지고 있어 추가적인 인간화 과정이 필요하지 않아 치료용 항체 개발의 효율이 크게 향상되었다. HarbourHCab 마우스 (HarbourAntibodies BV, WO 2002/085945 A3)는 인간 면역글로불린 면역 레퍼토리를 보유하는 유전자 변형된 마우스로, “중쇄”만을 갖는 새로운 항체를 생성할 수 있으며, 상기 항체의 크기는 전통적인 IgG 항체의 절반에 불과하였다. 이의 생성된 항체는 인간의 항체 “중쇄” 가변 도메인 및 마우스의 Fc 불변 도메인만을 가지고 있었다. 경쇄를 포함하지 않는 특징으로 인해, 상기 항체는 경쇄 불일치 및 이종이량체화 문제를 거의 해결하여 기존 항체 플랫폼으로는 달성하기 어려운 제품을 이 기술 플랫폼에서 개발할 수 있게 되었다.

[0113] 1.1 마우스의 면역화

[0114] 인간 B7-H4를 과발현하는 HEK293T 세포(HEK293T/hu B7-H4, Kyinno Biotechnology)를 사용하여 HCAB 마우스를 면역화하고, 각 마우스당 매회 5×10^6 개의 세포를 복강내 주사하여 면역시켰다. 각 면역화 라운드에서, 각 마우스가 투여받는 총 주사 용량은 100 μ L였다. 각 추가 면역화 라운드의 간격은 최소 2주이며, 일반적으로 6 내지 7회 추가 면역화였다. 면역화 시간은 제0, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 96일째이고; 또한 제49, 77일째에 마우스의 혈청 항체 역가를 검출하였다. HCAB 마우스의 비장 B 세포를 분리하기 5일 전에 최종 추가 면역화를 수행하였다.

[0115] 1.2 혈청 역가의 검출

[0116] 특정 시점에서, 마우스의 혈청을 수집하고, ELISA 방법을 사용하여 혈청 내 B7-H4 단백질에 결합하는 항체의 역가를 검출하고, FACS 방법을 사용하여 혈청 내 B7-H4를 과발현하는 세포에 결합하는 항체의 역가를 검출하였다.

[0117] ELISA 방법에 있어서, 1 μ g/mL의 hB7-H4-ECD-his 단백질(Sino Biological, # 10738-H08H)을 ELISA 플레이트(corning, 9018)에 100 μ L/웰로 코팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하고; 2회 헹군 후, 1%의 BSA가 포함된 PBST로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 차단하고; 100 μ L/웰의 구배 희석된 혈청을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하며; 3회 헹군 후, 100 μ L/웰의 1:5000으로 희석된 항-마우스-HRP(Bethyl, Cat# A90-231P)를 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 3회 헹군 후, 100 μ L/웰의 TMB 기질을 가하여 약 10분 동안 배양하고, 50 μ L/웰의 1N HCl을 가하여 발색을 중지시키고, 450nm에서의 흡광도(Molecular Devices, Plus 384)를 판독하였다.

[0118] FACS 방법에 있어서, 구배 희석된 마우스 혈청을 HEK293T/hu B7-H4 세포와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하고; 세포를 2회 세척한 후, 2차 항체인 염소 항-마우스 IgG (H+L)(Jackson, Cat# 115-605-062)를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하고, 2회 세척한 후, 세포를 재현탁하고 유세포분석기(ACEA Novocyte3000)로 검출하였다. HEK293T 세포를 배경 대조군으로 하였다.

[0119] 1.3 파지 디스플레이 기술을 통한 HCAB 단일클론 및 항체 서열의 획득

[0120] a. 과지 라이브러리의 구축

[0121] 실시예 1.1에서 면역화시킨 후의 마우스로부터 비장 세포를 수집하여 비장 B 세포를 분리한 후, 제품 설명서 (ThermoFisher, Cat.No.15596018)를 참조하여 TRIZO1로 RNA를 추출한 후, 제품 설명서(ThermoFisher, Cat.No.11756500)를 참조하여 RT-PCR을 수행하였다. cDNA를 주형으로 사용하여, PCR을 통해 VHH 단편을 증폭시켰다.

[0122] PCR 증폭 체계는 하기 표에 나타낸 바와 같다.

총 RNA-cDNA	1 μ l/1 μ l H ₂ O를 음성 대조군으로 사용함
5xQ5 반응 완충액	10 μ l
2.5mM의 dNTP	4 μ l
정방향 프라이머(10 μ M)	2 μ l
역방향 프라이머(10 μ M)	2 μ l
Q5 DNA 중합효소	0.5 μ l
ddH ₂ O	30.5 μ l
총 체적	50 μ l

[0123]

[0124] PCR 증폭 절차는 하기 표에 나타낸 바와 같다.

98℃	30s	} 30 순환
98℃	10s	
64℃	30s	
72℃	30s	
72℃	10min	

[0125]

[0126] 수득된 연결 생성물을 SS320(Lucigen, Cat.No. 60512-1)으로 형질전환시키고; 그 다음 과지 라이브러리를 제조하였다. 3회의 바이오패닝(단계는 하기에 서술된 바와 같음)을 수행하고 비오틴화된 B7-H4를 사용하여 FACS로 스크리닝을 수행하며, 스크리닝된 모든 후보 물질(hit)을 시퀀싱(단계는 하기에 서술된 바와 같음)을 위해 보내고 특정 클론을 얻었다.

[0127] b. 바이오 패닝(Bio-Panning)

[0128] 과지 라이브러리(1E13 과지 입자)를 스트렙타비딘(SA)이 코팅된 비드(ThermoFisher, Cat. No. 11206)로 비특이적으로 결합된 분자를 제거한 후, 실온에서 SA-Bio-B7-H4 비드(제품 설명서를 참조)와 함께 1시간 동안 배양한 후 1×PBST로 10회 세척하였다. 세척한 후, pH 3.0의 구연산 완충액을 비드 과지 혼합물에 가하여 실온에서 10분 동안 배양한 다음, pH9.0의 Tris-HCl 중화 완충액을 가한 후, 37℃에서 SS320 세포를 감염시키며, 감염 시간은 45분이었다. 그 다음 상기 감염된 세포에 50 μ l 2E12/ml의 M13K07 헬퍼 과지(NEB, Cat. No. N0315S)를 가하고, 마지막으로 신선한 2×YT(100 μ g/ml의 Amp, 50 μ g/ml의 Kan, 1mM의 IPTG를 포함)를 가하고, 30℃에서 밤새 배양하였다. 밤샘 배양물을 원심분리하고, 상청을 수집하고, 20% PEG6000/2.5M NaCl을 상청액(1:5, 체적비)에 가한 후, 4℃, 8000rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 후 수득된 과지 펠렛을 1ml의 1×PBS에 재현탁하였다. 수득된 상청액(과지 입자)을 새로운 튜브에 옮기고, 제2회 패닝을 준비하였다. 제2회 패닝 및 제3회 패닝 과정은 전술한 단계와 동일하였다.

[0129] c. 초기 스크리닝

[0130] 콜로니를 선택하여 YT/Amp 배지(Sangon Biotech, Cat.No.A507016-0250)가 포함된 96웰 플레이트에 넣고, 37°C에서 3시간 동안 성장시켰다. 최종 농도가 1mM이 되도록 IPTG를 가하고, 30°C에서 밤새 유도하였다. 그 다음 상청액을 원심분리하고 침전시킨 후 상청액을 취하여 FACS 실험을 수행하였다. 인간 및 원숭이 B7-H4에 대한 결합이 비교적 우수한 클론을 선별하여 시퀀싱을 수행하였다.

[0131] **1.4 항-B7-H4 H2L2 항체 분자의 획득**

[0132] B7-H4 재조합 단백질 또는 B7-H4를 과발현하는 세포를 사용하여 실험 동물에 대해 면역화하여 B7-H4에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 얻으며, 상기 실험 동물은 마우스, 랫트, 토끼, 양, 낙타 등일 수 있다. 일반적으로 수득된 항체 분자는 비인간 유래이다. 비인간 유래 항체를 수득한 후, 면역원성을 감소시키고 약용성을 향상시키기 위해 항체 공학 기술을 사용하여 이러한 분자에 대해 인간화 과정을 수행한다. 그러나 항체를 인간화하는 과정은 기술적으로 복잡하며, 인간화된 분자는 항원에 대한 친화력이 감소하는 경우가 많다. 다른 한편, 유전자 변형 기술의 발전으로 인간 면역글로불린 면역 레퍼토리를 보유하고 내인성 마우스의 면역 레퍼토리가 결여된 유전자 조작 마우스를 배양하는 것이 가능해졌다. Harbour H2L2 마우스(Harbour Antibodies BV)는 인간 면역글로불린 면역 라이브러리를 보유하고 있는 유전자 변형된 마우스로, 이러한 유전자 변형된 마우스가 생산한 항체는 완전 인간 서열을 가지고 있어 추가적인 인간화 과정이 필요하지 않아 치료용 항체 개발의 효율이 크게 향상되었다.

[0133] 이어서, B 세포 체외 클로닝 기술을 통해 항-B7-H4 항체를 스크리닝하였으며, 구체적으로 하기와 같다.

[0134] 마우스의 비장을 꺼내 분쇄한 후 200메쉬의 필터로 여과하고, 마우스의 메모리 B 세포 분류 키트(Miltenyi, #130-095-838)에 따라 단일 세포 현탁액을 분류하였다. 분류된 세포를 면역형광 염색을 수행하였다.

[0135] 유세포 분류기 S3e에서 B200 양성(BioLegend, #103227), IgM 음성(BioLegend, #406506), B7-H4 특이적 양성 세포(BioLegend, #405207)에 대해 분류하였다. 분류하여 수득된 세포를 96웰 세포 배양 플레이트에 웰당 5개 세포의 밀도로 배양하고, 세포 배양 플레이트에 조사된 EL4 세포를 피더 세포로 사전 플레이팅하였다.

[0136] 14일 동안 배양한 후 배양 상청을 수집하여 ELISA 검출을 수행하고, B7-H4 단백질의 결합 활성이 있는 웰의 경우, 세포를 꺼내 RT-PCR(SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing(#634892), I-5™ 2×High-Fidelity Master Mix(#I5HM-5000)을 수행하였다. 증폭되어 수득된 경쇄, 중쇄를 overlap PCR을 통해 scFv에 스플라이싱하고, *E. coli*에서 발현시키고, 발현 상청에 대해 ELISA 검출을 수행하고, 양성 클론을 시퀀싱하였다.

[0137] **1.5 항-B7-H4 항체의 서열 분석 및 서열 최적화**

[0138] 스크리닝하여 수득된 양성 클론으로 실시예 1.6에 서술된 방법에 따라 재조합 항체 PR006004 및 PR006008을 제조하였다. 본 실시예에 있어서, 면역화된 HarbourHCab 마우스로부터 수득된 항-B7-H4 단일클론 항체 분자의 가변 도메인의 서열은 인간 유래 항체 서열이었다. 표 1-1에 이의 생식계열 유전자 분석 및 번역 후 변형 부위(PTM) 분석을 나열하였다.

[0139] PR006004 및 PR006008은 CDR2에 하나의 가능한 아스파르트이트 이성질체화 부위(DG)를 포함하며, 이러한 잠재적인 번역 후 변형 부위(PTM)의 위험을 감소시키기 위해, 이의 DG를 DS로 돌연변이시켜 각각 새로운 분자 PR007440 및 PR007441(표 1-2)을 수득하였다.

[0140] 추가로, PR006004의 등전점을 낮추기 위해, 항체 서열 분석에 따라 CDR 영역의 염기성 아미노산을 선택하여 무작위 돌연변이를 수행하였다. 그 다음, FACS 결합 실험을 사용하여 스크리닝하고; 스크리닝된 후보 분자를 재발현하고 정제하고 동정하였다. 표 1-2에 항체 PR006004의 서열에 대한 아미노산 돌연변이를 수행하여 수득된 새로운 항체 분자 서열을 나열하였다.

표 1-1 초기 항체

클론 번호	VH 생식계열 V 유전자	VH PTM	재조합 항체	재조합 항체 아형
R7004M1A2	VH3-74*01	DG(HCDR2)	PR006004	IgG1
R7004M6D4	VH3-74*01	DG(HCDR2)	PR006008	IgG1

[0141]

표 1-2 PTM 및 전하 돌연변이

초기 항체	변이체	가변 영역 돌연변이	재조합 항체 아형
PR006004	PR007440	G55S	IgG1
PR006008	PR007441	G55S	IgG1
PR006004	PR007195	V46E, G55S, R56D, A61E	IgG1
PR006004	PR007196	V46E, G55S, R56E	IgG1
PR006004	PR007200	V46E, G55S, R56S	IgG1
PR006004	PR007201	V46E, G55S, R56S, A61E	IgG1
PR006004	PR007202	V46E, G55S, R56T	IgG1
PR006004	PR007203	V46E, G55S, R56T, A61E	IgG1

[0142]

[0143]

1.6 항-B7-H4 완전 인간 재조합 항체의 제조

[0144]

항체 중쇄를 코딩하는 플라스미드를 포유동물 숙주 세포(예를 들어 인간 배아 신장 세포 HEK293)에 형질감염시키고, 통상적인 재조합 단백질 발현 및 정제 기술을 사용하여 정제된 항-B7-H4 재조합 중쇄 항체를 획득할 수 있었다. 구체적으로, HEK293 세포를 FreeStyle™ F17 Expression Medium 배지(Thermo, A1383504)에서 확대 배양하였다. 일시적 형질감염을 시작하기 전에, 세포 농도를 6×10^5 세포/ml로 조절하고, 37°C 8% CO₂ 진탕기에서 24시간 배양하고, 세포 농도는 1.2×10^6 세포/ml였다. 30ml의 배양된 세포를 준비하고, 30 µg의 상기 중쇄를 코딩하는 플라스미드를 1.5ml의 Opti-MEM 혈청 감소 배지(Thermo, 31985088)에 용해시킨 다음, 1.5ml의 Opti-MEM을 120 µl의 1mg/ml PEI(Polysciences, Inc, Cat# 23966-2)에 용해시키고, 5분 동안 방치하였다. PEI를 플라스미드에 천천히 가하고, 실온에서 10분 동안 배양하고, 배양 플라스크를 흔들면서 플라스미드 PEI 혼합 용액을 천천히 적가하고, 37°C 8% CO₂의 진탕기에서 5일 동안 배양하였다. 5일 후 세포 생존율을 관찰하였다. 배양물을 수집하여, 3300G의 회전 속도로 10분 동안 원심분리한 후 상청을 취하고; 그 다음 상청을 고속으로 원심분리하여 불순물을 제거하였다. PBS(pH7.4)로 MabSelect™(GE Healthcare Life Science, Cat#71-5020-91 A E)이 포함된 중력 컬럼(Bio-Rad, #7311550)을 평형화하고, 2 내지 5배의 컬럼 체적으로 행구었다. 상청 시료를 컬럼에 통과시켰다. 5 내지 10배의 컬럼 체적의 PBS로 컬럼을 행구었다. 그 다음 pH3.5의 0.1M 글리신을 사용하여 표적 단백질을 용출한 후, pH 8.0의 Tris-HCl을 사용하여 중성으로 조절하고, 마지막으로 한외여과 튜브(Millipore, UFC901024)로 농축하고 PBS 완충액으로 교환하여 정제된 항-B7-H4 중쇄 항체 용액을 획득하였다.

[0145]

1.7 SEC-HPLC를 사용한 단백질 순도 및 응집체의 분석

[0146]

본 실시예에서 분석형 분자 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 단백질 시료의 순도 및 응집 형태를 분석하였다. 분석형 크로마토그래피 컬럼 TSKgel G3000SWxl(Tosoh Bioscience, #08541, 5 µm, 7.8mm×30cm)을 고압 액체 크로마토그래피 HPLC(Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)에 연결하고, PBS 완충액으로 실온에서 최소 1시간 동안 평형화하였다. 적당량의 단백질 시료(최소 10 µg)를 0.22 µm의 여과막으로 여과한 후 시스템에 주사하고, HPLC 프로그램을 설정하며; PBS 완충액으로 시료를 1.0ml/분의 유속으로 크로마토그래피 컬럼을 통과시키고, 최대 시간은 25분이었다. HPLC는 시료 내 상이한 분자의 크기 구성 요소의 머무름 시간을 보고하는 분석 보고서를 생성하였다.

[0147]

1.8 HPLC-HIC를 사용한 단백질 순도 및 소수성 분석

[0148]

분석형 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 사용하여 단백질 시료의 순도 및 소수성을 분석하였다. 분석형 크로마토그래피 컬럼 TSKgel Butyl-NPR(Tosoh Bioscience, 14947, 4.6mm×3.5cm)을 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)(모델: Agilent Technologies, Agilent 1260 Infinity II)에 연결하고, PBS 완충액으로 실온에서 최소 1시간 동안 평형화하였다. 설정 방법은 16분 이내에 100% 이동상 A(20mM의 히스티딘, 1.8M의 황산암모늄, pH

6.0)에서 100% 이동상 B(20mM의 히스티딘, pH 6.0)까지의 선형 구배, 유속은 0.7ml/min으로 설정하고, 단백질 시료 농도는 1mg/ml이고, 주입 체적은 20 μ l이고, 검출 파장은 280nm이었다. 수집 후 ChemStation 소프트웨어를 사용하여 크로마토그램에 대해 적분하고 관련 데이터를 계산하고, 시료 내 상이한 분자의 크기 구성 요소의 머무름 시간을 보고하는 분석 보고서를 생성하였다.

[0149] **1.9 DSF 또는 Uncle를 사용한 단백질 분자의 열안정성 측정**

[0150] 시차주사형광법(Differential Scanning Fluorimetry, DSF)은 단백질의 열안정성을 측정하기 위해 일반적으로 사용되는 고처리량 방법이다. 이는 실시간 형광 정량 PCR 기기를 사용하여 중첩되지 않은 단백질 분자에 결합된 염료의 형광 강도의 변화를 모니터링하여 단백질의 변성 과정을 반영함으로써 단백질 분자의 열안정성을 반영하였다. 본 실시예는 DSF 방법을 사용하여 단백질 분자의 열변성 온도(T_m)를 측정하였다. 10 μ g의 단백질을 96-웰 PCR 플레이트(Thermo, #AB-0700/W)에 가하고, 이어서 2 μ l의 100 \times 희석된 염료 SYPROTM(Invitrogen, #2008138)을 가한 후, 완충액을 가하여 최종 체적이 웰당 40 μ l이 되도록 하였다. PCR 플레이트를 밀봉하고, 실시간 형광 정량 PCR 기기(Bio-Rad CFX96 PCR System)에 배치하고, 먼저 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 배양한 후, 0.2 $^{\circ}$ C/0.2분의 구배로 25 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C로 천천히 승온시키고, 실험이 끝나면 온도를 25 $^{\circ}$ C로 낮추었다. FRET 스캐닝 모드를 사용하고 Bio-Rad CFX Maestro 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하고 시료의 T_m 를 계산하였다.

[0151] Uncle(Unchained Labs)은 다기능 원스톱 단백질의 안정성 분석 플랫폼으로, 완전 형광, 정적 광산란(SLS) 및 동적 광산란(DLS) 검출 방법을 통해 단백질의 안정성을 나타낸다. 동일한 균의 시료는 용융 온도(T_m), 응집 온도(Tag θ) 및 입자 크기(diameter) 등 매개변수를 동시에 획득할 수 있다. 본 실시예에서, Uncle의 “ T_m & Tag θ with optional DLS” 애플리케이션을 선택하여 작업을 수행하고, 9 μ L의 시료를 취하여 Uni 튜브에 가하고, 0.3 $^{\circ}$ C/분의 구배로 25 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C까지 천천히 승온되도록 설정하였다. 회당 5초씩 4회 수집하여 초기 및 최종 DLS 측정하였다. 실험이 끝난 후, Uncle 분석 소프트웨어는 무게 중심 평균값(BCM) 공식으로 각 시료의 T_m 값을 계산하였다.

[0152] 수득된 항체의 발현 정보와 물리화학적 특성은 표 1-3과 같다.

표 1-3 항체의 발현 및 물리화학적 특성

항체	I 단계 정제 후 수율(mg/L)	SEC-HPLC 순도(%)	HIC-HPLC 머무름 시간(min)	대응되는 황산암모늄 농도(M)	T _{m1} (°C)	T _m 측정 방법	PI
PR006004	40.31	98.74	17.127	0.66	61.4	DSF	8.82
PR006008	51.7	100	16.193	0.78	59.4	DSF	7.69
PR007440	123.5	95.756					8.82
PR007441	16.4	100					7.69
PR007195	21.29	72.71	17.625	0.6	45.6	DSF	6.93
PR007196	60.82	97.45					7.2
PR007200	45.93	97.68	17.81	0.58	59.4	DSF	7.59
PR007201	43.47	92.1	17.662	0.6	52	DSF	7.2
PR007202	44.67	96.79	17.844	0.58	59.2	DSF	7.59
PR007203	50.53	90.74	17.65	0.6	52	DSF	7.2
PR007354	150	89.19					9.23
PR007355	202.9	95.93					9.11
PR006391	94.5	100	17.397	0.64	54.6	Uncle	9.34
PR006407	62.5	98.8	16.834	0.71	47.6	Uncle	9.14
PR006840	59.9	98.97					9.25
PR007077	33	93.984	17.9	0.59	57	Uncle	9.34
PR007078	34	68.496	17.3	0.65	56.1	Uncle	9.14
PR007168	43.8	99.077					9.25
PR005885	108.4	99.18	17.39	0.64	57	DSF	9.26

[0153]

[0154] 1.10 항-B7-H4 항체 서열 및 넘버링

[0155]

본 발명에서, 나열된 CDR의 아미노산 서열은 모두 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된다. 그러나 당업자에게 공지된 바와 같이, 당업계에서 다양한 방법을 통해 항체의 CDR을 정의할 수 있으며, 예를 들어 서열 가변성에 기초한 Kabat 정의 규칙(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)을 참조) 및 구조적 고리 영역의 위치에 기초한 Chothia 정의 규칙(JMol Biol 273:927-48, 1997을 참조)이다. 본 발명의 기술적 해결 수단에는 있어서, 또한 Kabat 정의 및 Chothia 정의를 포함하는 Combined 정의 규칙을 사용하여 가변 도메인 서열의 아미노산 잔기를 결정할 수 있다. 그 중 Combined 정의 규칙은 Kabat 정의 및 Chothia 정의의 범위를 결합하고, 이를 기반으로 더 큰 범위를 취하는 것이며, 자세한 내용은 표 4를 참조한다. 달리 명시하지 않는 한, 당업자는 주어진 항체 또는 이의 영역(예를 들어 가변 영역)의 용어 “CDR” 및 “상보성 결정 영역”은 본 발명에 서술된 상기 공지된 형태에서의 임의의 하나에 의해 정의된 상보성 결정 영역을 포괄하는 것을 이해하여야 한다. 본 발명에서 보호를 청구하고 있는 범위는 Chothia 정의 규칙에 따라 표시된 서열이지만, 다른 CDR의 정의 규칙에 따른 상응하는 아미노산 서열도 본 발명의 보호 범위에 포함되어야 한다.

표 1-4 본 출원의 항체 CDR 의 정의 방법

	Kabat	Chothia	Combined
HCDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
HCDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
HCDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

[0156]

[0157]

여기서, Haa-Hbb는 항체 중쇄의 N 말단에서 시작하여 aa 번(Chothia 넘버링 규칙)부터bb 번(Chothia 넘버링 규칙)까지의 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 예를 들어, H26 내지 H35는 항체 중쇄의 N 말단에서 시작하여 Chothia 넘버링 규칙에 따라 26 번부터 35 번까지의 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. 당업자는 Chothia로 CDR 을 넘버링할 때 일부 위치에 삽입 부위가 있는 경우가 있음을 알아야 한다(<http://bioinf.org.uk/abs/>를 참조할 수 있음).

[0158]

표 1-5, 표 1-6, 표 1-7 및 표 1-8은 본 발명의 항-B7-H4 항체의 서열에 상응하는 서열 번호를 나열하였다.

표 1-5

항체 번호	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	SEQ	아미노산 서열	SEQ	아미노산 서열	SEQ	아미노산 서열
PR006004	4	GFAFSNY	11	SGDGRS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR006008	5	GFTFTDF	12	SPDGSS	25	FSTGWHRIEYFQH
PR007440	4	GFAFSNY	17	SGDSRS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007441	5	GFTFTDF	18	SPDSSS	25	FSTGWHRIEYFQH
PR007195	4	GFAFSNY	13	SGDSDS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007196	4	GFAFSNY	14	SGDSES	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007200	4	GFAFSNY	15	SGDSSS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007201	4	GFAFSNY	15	SGDSSS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007202	4	GFAFSNY	16	SGDSTS	24	DRFGDDYYYGMNV
PR007203	4	GFAFSNY	16	SGDSTS	24	DRFGDDYYYGMNV

[0159]

표 1-6

항체 번호	중쇄	VH		FWR	FWR	FWR	FWR
		SEQ	아미노산 서열	1	2	3	4
PR00 6004	48	36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGRVWISRISGDGRSTSYADSVKGRF TISRDNAKNMVYLQMNLR AEDTAVYYCARDRFG DDYYGMNVWGQGT TTVTVSS	2	7	20	27
PR00 6008	49	37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWM HWVRQVPGKGREWVSRISPDGSSSTSYEDSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTG WHRIEYFQHWGQGT LTVTVSS	2	8	21	26
PR00 7440	56	44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGRVWISRISGDSRSTSYADSVKGRFT ISRDNAKNMVYLQMNLR AEDTAVYYCARDRFGD DYYGMNVWGQGT TTVTVSS	2	7	20	27
PR00 7441	57	45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWM HWVRQVPGKGREWVSRISPDSSSTSYEDSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTG WHRIEYFQHWGQGT LTVTVSS	2	8	21	26
PR00 7195	50	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGSDSDSTSYEDSVKGRFT ISRDNAKNMVYLQMNLR AEDTAVYYCARDRFGD DYYGMNVWGQGT TTVTVSS	2	9	22	27

[0160]

PR00 7196	51	39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGDSESTSYADSVKGRFT ISRDNAKNMVYQLMNNLRAEDTAVYYCARDRFGD DYYYGMNVWGQGTTVTVSS	2	9	20	27
PR00 7200	52	40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGDSSSTSYADSVKGRFT ISRDNAKNMVYQLMNNLRAEDTAVYYCARDRFGD DYYYGMNVWGQGTTVTVSS	2	9	20	27
PR00 7201	53	41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGDSSSTSYEDSVKGRFT ISRDNAKNMVYQLMNNLRAEDTAVYYCARDRFGD DYYYGMNVWGQGTTVTVSS	2	9	22	27
PR00 7202	54	42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGDSTSTSYADSVKGRFT ISRDNAKNMVYQLMNNLRAEDTAVYYCARDRFGD DYYYGMNVWGQGTTVTVSS	2	9	20	27
PR00 7203	55	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWM HVARQVPGKGREWISRISGDSTSTSYEDSVKGRFT ISRDNAKNMVYQLMNNLRAEDTAVYYCARDRFGD DYYYGMNVWGQGTTVTVSS	2	9	22	27

[0161]

표 1-7

항제	중쇄	
번호	SEQ	아미노산 서열
PR00 6004	48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSNYWMHVARQVPGKGRVWISRISGDGRST
		SYADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ
		GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
		VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
		KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
		TQKSLSLSPGK
PR00 6008	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHWRQVPGKGREVWSRISPDGSS
		TSYEDSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQ
		GTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
		VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
		KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
		TQKSLSLSPGK
PR00 7440	56	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSNYWMHVARQVPGKGRVWISRISGDSRST
		SYADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ
		GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
		VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
		KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
		TQKSLSLSPGK

[0162]

<p>PR00 7441</p>	<p>57</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHWVRQVPGKGREWVSRISPDSSS TSYEDSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQ GTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
<p>PR00 7195</p>	<p>50</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGSDSST SYEDSVKGRFTISRDNANKNMVYLQMNLRRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
<p>PR00 7196</p>	<p>51</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGDSSEST SYADSVKGRFTISRDNANKNMVYLQMNLRRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
<p>PR00 7200</p>	<p>52</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGDSST SYADSVKGRFTISRDNANKNMVYLQMNLRRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</p>

[0163]

		<p>KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
PR00 7201	53	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPFSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGDSST SYEDSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
PR00 7202	54	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPFSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGDSTST SYADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
PR00 7203	55	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAPFSNYWMHVARQVPGKGREWISRISGDSTST SYEDSVKGRFTISRDNAMVYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRFGDDYYGMINVWGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>

[0164]

표 1-8 항-B7-H4 항체 PR003366의 서열에 상응하는 서열 및 서열번호

LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
78	80	82	72	74	76
RASQSVSSNLA	GASTRAT	QQYKN WPFT	EDTFS SY	APIFG T	GGPYF DY
HC		VL		VH	
87		85		84	
EIVMTQSPASLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARVSGGGSGTEFTLTISLQSS EDFAVYYCQQYKNWPFTFGPGTKLEIKGGGGSGGGGSG GGGGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSMRVSKASEDTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGTAPIFGTTNYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGPYFDYW GGGTLVTVSSGGGASEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK		EIVMTQSPASLS VSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPA RVSGGGSGTEFT LTISSLQSEDFAV YYCQQYKNWPF TFGPGTKLEIK		QVQLVQSGAEV KKPGSSMRVSK ASEDTFSSYAIS WVRQAPGQGLE WMGGTAPIFGT TNYAQKFQGRV TITADKSTSTAY MELSSLRSEDTA VYYCARGGPYFD YWGQGTLLVTVS S	

[0165]

[0166]

[0167]

실시예 2. FACS에 의한 세포 수준에서의 항 인간 B7-H4의 HCAb 단일클론 항체의 결합 능력의 검출

본 실시예는 인간 B7-H4에 대한 항 인간 B7-H4의 HCAb 단일클론 항체의 체외 결합 활성을 연구하기 위해, 인간 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/huB7-H4, Harbour BioMed), HEK293 세포주(HEK293/huB7-H4, Harbour BioMed), 사이노몰구스 원숭이 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/cynoB7-H4, Harbour BioMed), 마우스 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/mB7-H4, Harbour BioMed) 및 B7-H4를 내인성으로 과발현하는 MDA-MB-468 유방암 세포를 사용하여 세포 수준에서의 항체 결합 실험을 수행하였다. 요약하면, 세포를 소화시키고 2% FBS를 포함한 PBS에 재현탁하고, 세포 밀도를 각각 1×10^6 세포/mL로 조절하였다. 100 μ L 세포/웰로 96웰 V 바닥 플레이트(Corning, Cat#: 3894)에 접종하고, 이어서 최종 농도의 2배인 3배 농도로 구배 희석된 시험 항체를 100 μ L/웰씩 가하였다. 세포를 4°C에 방치하고, 빛을 차단하고 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 100 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS를 가하여 세포를 2회 헹구고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 그 다음 100 μ L/웰의 형광 2차 항체(Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson, Cat#:109-545-06, 1:500 희석)를 가하고, 4°C에서 빛을 차단하고 60분 동안 배양하였다. 100 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS로 세포를 2회 세척하고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 마지막으로, 200 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS로 세포를 재현탁하고, ACEA Novocyte3000을 사용하여 형광 발광 신호 값을 판독하였다.

[0168]

세포 표면의 인간 B7-H4에 대한 항체의 결합 결과는 표 2-1, 2-2, 2-3, 도 1a 내지 1e에 나타난 바와 같다. 결과에 따르면 PR006004 및 PR006008은 인간, 사이노몰구스 원숭이 B7-H4 및 종양 세포 MDA-MB-468에 대해 비교적 우수한 결합을 가지고, 그 중 PR006008은 더 강한 세포 결합을 가지며, 마우스 B7-H4와 교차 반응을 나타내었다. 인간 B7-H4에 대한 PR006004의 등전점 저하 돌연변이 항체의 결합은 PR006004 자체에 비교하여 약간 감소되었으며, 그 중 PR007196의 결합 능력이 가장 약하였다. PR006004 및 PR006008의 번역 후 변형 부위(PTM) 돌

연변이체 PR007440 및 PR007441의 결합 활성은 모체와 비교하여 유의한 변화가 없었다.

표 2-1

CHOK1/hu B7-H4		
항체	최대 MFI	EC50(nM)
PR006004	333458	4.863
PR006008	404722	1.072

[0169]

표 2-2

CHOK1/hu B7-H4		
항체	최대 MFI	EC50(nM)
PR006004	1632510	2.755
PR007195	1584634	5.65
PR007196	971497	3.717
PR007200	1477298	5.393
PR007201	1460146	5.496
PR007202	1508724	5.582
PR007203	1527268	5.405

[0170]

표 2-3

항체	MDA-MB-468		CHO-K1/cyno B7-H4		CHO-K1/m B7-H4	
	최대 MFI	EC50(nM)	최대 MFI	EC50(nM)	최대 MFI	EC50(nM)
PR006004	182805	5.186	1573933	1.651	~	~
PR007440	184529	9.178	1588512	3.056	~	~
PR006008	149316	0.1616	1250247	0.432	399485	0.4026
PR007441	148378	0.2439	1260379	0.7209	400110	0.6168

[0171]

[0172] **실시예 3. BLI 방법을 사용한 친화도 측정**

[0173] 10×동역학 완충액(ForteBio, #18-1105)을 1×로 희석하여, 친화도 시험 및 항원, 항체의 희석에 사용하였다. 생물막 간섭(BLI) 기술을 통해, Octet Red 96e(ForteBio) 분자 상호작용 분석기를 사용하여 항원과 항체 사이의 결합 동역학을 분석하였다.

[0174] 항원 및 항체의 친화도를 측정할 때, 센서의 회전 속도는 1000회전/분이다. 먼저 일렬로 놓인 AHC 센서(ForteBio, #18-5060)를 시험 완충액에서 10분 동안 평형화한 후, AHC 센서를 사용하여 B7-H4 항체를 포획하고,

포획 높이는 0.7nm이며; AHC 센서를 완충액에서 120초 동안 평형화시킨 후 2배 구배 희석된 인간 또는 원숭이 B7-H4(농도 100-3.75nM 및 0nM)와 180초 동안 결합하고 300초 동안 해리시켰다. 마지막으로 AHC 센서를 10mM의 글리신-염산 pH 1.5 용액에 담구어 재생하여, 센서에 결합된 단백질을 용출시켰다.

[0175] Octet Data Analysis 소프트웨어(Fortebio, 버전 11.0)를 사용하여 데이터를 분석할 때, 0nM을 대조군 웰로 하고, 참조 신호를 빼고(reference subtraction), "1:1 Global fitting" 방법을 선택하여 데이터 피팅을 수행하고, 항원 및 항원 결합 단백질의 결합의 동역학 매개변수를 계산하여 $k_{on}(1/Ms)$ 값, $k_{dis}(1/s)$ 값 및 $K_D(M)$ 값 (표 3, 도 2를 참조)을 획득하였으며, 결과에 따르면, PR006004 및 PR006008은 모두 단백질 수준에서 비교적 우수한 친화도를 가지며, 그 중 PR006004는 PR006008보다 단백질 수준에서 약간 더 높은 친화도를 가지는 것으로 나타났다. 아미노산 돌연변이를 통해 항체의 TM 값이 증가된 후, PR007077, PR007078을 이의 상응하는 모 항체 PR006391, PR006407과 비교하여 B7-H4에 대한 친화도 측면에 있어서 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다.

표 3

	Ab	Conc.(nM)	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R^2
human B7-H4	PR006004	60-3.75	1.89E-09	2.10E+05	3.96E-04	0.9965
	PR006008	60-3.75	3.65E-09	3.12E+05	1.14E-03	0.9983
	PR006391	100-6.25	3.75E-09	9.04E+04	3.39E-04	0.9983
	PR006407	100-6.25	8.40E-09	1.50E+05	1.26E-03	0.999
	PR007077	100-6.25	5.43E-09	1.09E+05	5.94E-04	0.9752
	PR007078	100-6.25	1.03E-08	1.49E+05	1.54E-03	0.9965
	PR007168	100-6.25	1.69E-10	1.83E+05	3.09E-05	0.9974
cyno B7-H4	PR007077	100-6.25	4.74E-08	1.72E+05	8.16E-03	0.9821
	PR007078	100-6.25	6.78E-09	2.19E+05	1.49E-03	0.9966
	PR007168	60-3.75	3.01E-10	2.94E+05	8.87E-05	0.9972

[0176]

[0177] **실시예 4. B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 구조 및 설계**

[0178] B7-H4×CD3 이중특이성 항체는 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있으며, 그 중 일단은 종양 세포 표면에 특이적으로 발현되는 B7-H4를 식별할 수 있고, 다른 일단은 T 세포의 CD3 분자에 결합할 수 있었다. B7-H4×CD3 이중항체 분자가 종양 세포 표면에 결합한 후, 종양 세포 근처의 T 세포를 모집하고 활성화하여 종양 세포를 사멸할 수 있다.

[0179] 본 실시예는 실시예 1에서 획득된 항-B7-H4 항체 및 항-CD3 항체 PR003886(특허출원 W02021/063330에서 유래, 서열은 표 4-1에 나열됨)을 사용하여 B7-H4×CD3 이중특이성 항체를 제조하였다. 상기 이중특이성 항체는 도 3a 내지 3c에 도시된 구조를 가졌다. 상기 구조는: 아미노 말단에서 카르복시 말단까지이고 VL_A-CL을 포함하는 폴리펩타이드 사슬 1 또는 제1 폴리펩타이드 사슬; 아미노 말단에서 카르복시 말단까지이고 VH_A-CH1-h-CH2-CH3을 포함하는 폴리펩타이드 사슬-2 또는 제2 폴리펩타이드 사슬; 아미노 말단에서 카르복시 말단까지이고 VH_B-L-VH_B-h-CH2-CH3 또는 VH_B-h-CH2-CH3을 포함하는 폴리펩타이드 사슬-3 또는 제3 폴리펩타이드 사슬의 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하였다. 여기서, VH_A 및 VL_A는 각각 항체 A의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이고, VH_B는 중쇄 항체 B의 중쇄 가변 영역이고; CL은 경쇄 불변 영역 도메인이고; CH1, CH2 및 CH3은 각각 중쇄 불변 영역의 제1, 제2 및 제3 도메인이고; L은 연결 펩타이드이고, h는 IgG 항체의 힌지 영역 또는 파생 서열이었다.

[0180] 표 4-2의 B7-H4×CD3 이중 항체 분자 RP007354, PR007355는 동일한 분자 구조를 가지며, 폴리펩타이드 사슬 1 및 폴리펩타이드 사슬-2는 CD3을 표적으로 하는 Fab 부분을 구성하고, 폴리펩타이드 사슬-3은 B7-H4를 표적으로

하는 1개의 VH 부분(VH_B)을 포함한다.

- [0181] 표 4-2의 다른 B7-H4×CD3 이중 항체 분자(PR006391, PR006407, PR006840, PR007077, PR007078, PR007168)는 모두 동일한 분자 구조를 가지며, 폴리펩타이드 사슬 1 및 폴리펩타이드 사슬-2는 CD3을 표적으로 하는 Fab 부분을 구성하고, 폴리펩타이드 사슬-3은 B7-H4를 표적으로 하는 2개의 VH 부분(VH_B)을 포함한다. 그 중, 2개의 VH_B의 서열은 동일하거나 상이할 수 있으며, 2개의 VH_B 사이는 연결 펩타이드 GS_15(서열번호 66)를 통해 연결되었다. 또한, PR005885는 “1+1” Fab-Fc-scFv 비대칭 구조 분자로서, 구조는 3개의 단백질 사슬에 관련되며, 이는 각각 상응하는 항-B7-H4 항체의 scFv 폴리펩타이드 사슬, 및 상기 항-CD3 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다.
- [0182] Fc γ 수용체 결합으로 인한 가교 및 효과기 기능이 저하되는 것을 방지하기 위해, 폴리펩타이드 사슬-2 및 폴리펩타이드 사슬-3의 중쇄 불변 영역에 “AA” 이중 돌연변이체(L234A 및 L235A) 또는 “AAA” 삼중 돌연변이체(L234A, L235A 및 G237A)를 도입하였다. 또한, 상동성 중쇄 이합체의 생성을 감소시키기 위해, 2개 중쇄의 불변 영역에 각각 상이한 아미노산 돌연변이를 도입하여 “knob-hole” 돌연변이 및 변형된 이황화 결합을 보유하도록 하였다. CD3을 표적으로 하는 폴리펩타이드 사슬-2에 돌연변이 T366W 및 S354C를 도입하고; 동시에 B7-H4를 표적으로 하는 폴리펩타이드 사슬-3에 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 도입하였다. 폴리펩타이드 사슬-2의 Fc 불변 영역 서열은 서열번호 68로 표시되는 서열이고, 폴리펩타이드 사슬-3의 Fc 불변 영역 서열은 서열번호 67로 표시되는 서열이었다. 추가로, 항체 분자의 열안정성을 향상시키기 위해, 특허 WO2012100343A1에 따라 항-B7-H4의 VH 도메인에 하나의 추가적인 이황화 결합을 도입하고; 구체적으로, 항-B7-H4의 VH 도메인 중 Kabat 번호가 49 및 69인 2개의 아미노산이 Cys로 변화되어 이황화 결합을 형성하도록 하며; 즉, 각각 돌연변이 S49C 및 I70C를 도입하였다. 표 4-2는 본 발명의 B7-H4×CD3 이중 항체 분자 및 이의 CD3 말단의 모(parent) 단일클론 항체 및 B7-H4 말단의 모 단일클론 항체를 나열하며; 표 4-3은 본 발명의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 폴리펩타이드 사슬 서열에 해당하는 서열번호를 나열하였다.
- [0183] 실시예 1.5에 서술된 방법을 사용하여, 3개의 폴리펩타이드 사슬을 코딩하는 발현 벡터를 포유 동물의 숙주 세포로 공동 형질감염시켜 재조합 발현을 수행하여 정제된 항체 단백질 분자를 수득하였다.
- [0184] 이의 안정성은 T_m이고, 용해도는 HIC이며, 1단계의 정제 후 부산물 분석 등 데이터는 표 1-3에 나타낸 바와 같다.

표 4-1 본 발명에 사용된 항-CD3 항체 PR003886 의 서열에 상응하는 서열 번호의 나열

VL	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
46	35	29	31	33	3	10	23
QAVVTQEPSLT VSPGGTVTLTC RSSTGAVTTSNY ANWVQKPGQA PRGLIGGTNKRA PWTPARFSGSL GDKAALTLGA QPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGG TKLTVL	EVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAA SGFTFSTYAMN WVRQASGKGLE WVGRIRSKYNNY ATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAY LQMNSLKTEDT AVYYCTRHGNT GNSYVSWFAYW GQGTLVTVS S	RSSTGA VTTSNY AN	GTNKR AP	ALWYS NLWV	GFTFS TY	RSKYN NYA	HGNFG NSYVS WFAY
경쇄		중쇄					
58		47					
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLDKAAL TLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVF GGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ ASGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNTGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL						
YAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK						

[0185]

[0186]

표 4-2 본 발명의 B7-H4×CD3 이중 항체 분자 및 이의 모 단일클론 항체의 나열

이중 항체 분자	CD3 항체	B7-H4 항체
PR007354	PR003886	1 가 PR007440
PR007355	PR003886	1 가 PR007441
PR006391	PR003886	2 가 PR007440
PR006407	PR003886	2 가 PR007441
PR006840	PR003886	PR007440 및 PR007441
PR007077	PR003886	2 가 PR007440, 추가(S49C,I70C)
PR007078	PR003886	2 가 PR007441, 추가(S49C,I70C)
PR007168	PR003886	PR007440 및 PR007441, 각각 추가됨(S49C,I70C)
PR005885	PR003886	PR003366

[0187]

표 4-3 본 발명의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 폴리펩타이드 사슬 서열에 상응하는 서열 번호의 나열

항체 번호	폴리펩타이드 사슬 1	폴리펩타이드 사슬-2	폴리펩타이드 사슬-3
PRO 063 91	QAVV	EVQLVE	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMHWARQVPGK
	TQEP	SGGGLV	GRVWISRISGDSRSTSYADSVKGRFTISRDNAMVYLMNNLR
	SLTVS	QPGGSL	AEDTAVYYCARDRFDDYYGMNVWGQGT'TVTVSSGGGGSGG
	PGGT	KLSCAA	GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMH
	VTLT	SGFTFS	WARQVPGKGRVWISRISGDSRSTSYADSVKGRFTISRDNAMV
	5 CRSST	5 TYAMN	6 YLQMNLR AEDTAVYYCARDRFDDYYGMNVWGQGT'TVTVS
	8 GAVT	9 WVRQA	0 SASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
	TSNY	SGKGLE	EVT'CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
	ANWV	WVGRIR	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
QQKP	SKYNN	REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP	
GQAP	YATYY	ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE	
RGLIG	ADSVK	ALHNHYTQKSLSLSPGK	
PRO 064 07	GTNK	DRFTIS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHWVVRQVPGK
	RAPW	RDDSK	GREWVSRISPDSSSTSYEDSVKGRFTISRDNAMVYLMHGLR
	TPAR	NTAYL	AEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGT'LVTVSSGGGGSGGG
	5 FSGSL	5 QMNSL	6 GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHW
	8 LGDK	9 KTEDT	1 VRQVPGKGREWVSRISPDSSSTSYEDSVKGRFTISRDNAMVYLMHGLR
	AALT	AVYYC	QMHGLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGT'LVTVSSAS
	LLGA	TRHGN	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
	QPED	FGNSYV	TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
EAEYF	SWFAY	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE	

[0188]

		CALW	WGQGT	PQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
		YSNL	LVTVSS	NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
		WVFG	ASTKG	HNHYTQKSLSLSPGK
PRO 068 40	5 8	GGTK	PSVFPL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMHVARQVPGK
		LTVL	APSSKS	GRVWISRISGDSRSTSYADSVKGRFTISRDNAMVYLQMNLR
		GQPK	TSGGT	AEDTAVYYCARDRFDDYYGMINVWGQGT'TVTVSSGGGGSGG
		AAPS	AALGCL	GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMH
		VTLF	VKDYFP	WVRQVPGKGREWVSRISPDSSSTSYEDSVKGRFTISRDNAMNTV
		PPSSE	EPVTVS	6 YLQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGT'LVTVSS
		ELQA	WNSGA	2 ASEPSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
		NKAT	LTSGV	VTTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
		LVCLI	HTFPA	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
		SDFYP	VLQSSG	EPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
		GAVT	LYSLSS	NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
		VAWK	VVTVP	LHNHYTQKSLSLSPGK
PRO 070 77	5 8	ADSSP	SSSLGT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMHVARQVPGK
		VKAG	QTYICN	GRVWICRISGDSRSTSYADSVKGRFTCSRDNAMVYLQMNLR
		VETT	VNHKP	AEDTAVYYCARDRFDDYYGMINVWGQGT'TVTVSSGGGGSGG
		TPSK	SNTKV	GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMH
		QSNN	DKKVE	6 WARQVPGKGRVWICRISGDSRSTSYADSVKGRFTCSRDNAMNM
		KYAA	PKSCDK	3 VYLQMNLRRAEDTAVYYCARDRFDDYYGMINVWGQGT'TVTV
		SSYLS	THTCP	SSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT
		LTPE	PCPAPE	PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
		QWKS	AAGAPS	TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
		HRSYS	VFLFPP	PREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ

[0189]

		CQVT	KPKDT	PENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH			
		HEGS	LMSRT	EALHNHYTQKSLSLSPGK			
PRO 070 78	5 8	TVEK	PEVTC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHWVRQVPGK			
		TVAP	VVVDV	GREWVCRISPDSSSTSYEDSVKGRFTCSRDNAKNTVYLQMHGLR			
		TECS	SHEDPE	AEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGLVTVSSGGGGSGGG			
			VKFNW	GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMHW			
			YVDGV	VRQVPGKGREWVCRISPDSSSTSYEDSVKGRFTCSRDNAKNTVY			
			EVHNA	LQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGLVTVSSA			
				9	KTKPRE	4	SEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
					EQYNS		TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
					TYRVVS		VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
					VLTVL		PQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
			HQDWL		NYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEAL		
			NGKEY		HNHYTQKSLSLSPGK		
PRO 071 68	5 8		KCKVS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMHWARQVPGK			
			NKALP	GRVWICRISGDSRSTSYADSVKGRFTCSRDNAKNMVYLQMNLR			
			APIEKTI	AEDTAVYYCARDRFGDDYYGMNVWGQTTVTVSSGGGGSGG			
			SKAKG	GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFWMH			
			QPREPQ	6	WVRQVPGKGREWVCRISPDSSSTSYEDSVKGRFTCSRDNAKNT		
			VYTLPP	5	VYLQMHGLRAEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGLVTVS		
			CREEM		SASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP		
			TKNQV		EVTCCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST		
			SLWCL		YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP		
			VKGFYP		REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP		

[0190]

			SDIAVE	ENNYKTTTPVLSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE		
			WESNG	ALHNHYTQKSLSLSPGK		
PRO 073 54	5 8	5 9	QPENN	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSNYWMHWARQVPGK		
			YKTTTP	GRVWICRISGDSRSTSYADSVKGRFTCSRDNAKNMVYLQMNLR		
			VLDSDG	AEDTAVYYCARDRFGDDYYGGMNVWGQGT'TVTVSSASEPKSSD		
			SFFLYS	KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKD'TLMISRTPEVTCVVVD		
			6	6	KLTVD	VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
			9	9	KSRWQ	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP
			9	9	QGNVF	PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
			SCSVM	VLSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK		
			HEALH	SLSLSPGK		
PRO 073 55	5 8	5 9	NHYTQ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT'FTDFWMHWVRQVPGK		
			KSLSLS	GREWVCRISPDSSSTSYEDSVKGRFTCSRDNAKNTVYLQMHGLR		
			PGK	AEDTAVYYCTRFSTGWHRIEYFQHWGQGT'LVTVSSASEPKSSD		
			7	7	KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKD'TLMISRTPEVTCVVVD	
			0	0	VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	
			0	0	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP	
			0	0	PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP	
			VLSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK			
			SLSLSPGK			
PRO 058 85	5 8	5 9	8	EIVMTQSPASLSPGERATLSCRASQVSSNLAWYQQKPGQAP'		
			8	8	RLLIYGASTRATGIPARVSGGGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ	
			6	6	YKNWPF'TFPGTKLEIKGGGGSGGGGGGGGGGGSGVQLVQ	
			6	6	SGAEVKKPGSSMRVSKASEDTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG	
			6	6	GTAPIFGTTNYAQKFQGRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV	
			6	6		

				YYCARGGPYFDYWGQGT'LVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPE
				AAGAPSVFLFPPKPKD'TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
				WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
				YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQ
				VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDSGSFFL
				VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0191]

[0192]

[0193]

실시에 5.FACS에 의한 인간, 사이노물구스 원숭이 및 마우스 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주에서의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 체외 결합의 검출

[0194]

본 실시예는 체외에서 인간, 시노물구스 원숭이 및 마우스 B7-H4에 결합하는 B7-H4의 CD3 이중특이성 항체의 활성을 연구하기 위한 것이다. 인간 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/huB7-H4, Harbour BioMed), 사이노물구스 원숭이 B7-H4를 과발현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/cynoB7-H4, Harbour BioMed), 마우스 B7-H4를 과발

현하는 CHO-K1 세포주(CHO-K1/mB7-H4, Harbour BioMed)를 사용하여 세포 수준에서의 항체 결합 실험을 수행하였다. 요약하면, 세포를 소화시키고 2% FBS를 포함한 PBS에 재현탁하고, 세포 밀도를 각각 1×10^6 세포/mL로 조절하였다. 100 μ L 세포/웰로 96웰 V 바닥 플레이트(Corning, Cat#: 3894)에 접종하고, 이어서 최종 농도의 2배인 3배 농도로 구매 희석된 100 μ L/웰의 시험 항체를 가하였다. 세포를 4°C에 방치하고, 빛을 차단하고 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 100 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS를 가하여 세포를 2회 행구고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 그 다음 100 μ L/웰의 형광 2차 항체(Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson, Cat#:109-545-06, 1:500 희석)를 가하고, 4°C에서 빛을 차단하고 60분 동안 배양하였다. 100 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS로 세포를 2회 세척하고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 마지막으로, 200 μ L/웰의 사전 냉각된 PBS로 세포를 재현탁하고, ACEA Novocyte3000을 사용하여 형광 발광 신호 값을 판독하였다.

[0195]

세포 표면의 인간 B7-H4, 사이노몰구스 원숭이 B7-H4 및 마우스 B7-H4에 결합하는 항체의 요약은 표 5, 도 4a 내지 4e에 나타내었다. 결과에 따르면, 이중 항체 분자 PR006391, PR006407 및 PR005885는 인간, 사이노몰구스 원숭이 B7-H4와의 결합이 모두 비교적 우수하며; 그 중, 이중 항체 분자 PR006407은 PR006391과 비교하여 인간, 사이노몰구스 원숭이 B7-H4와 더 강한 결합을 가지고, 이런 결합 추세는 이의 모(parent) B7-H4 분자 PR006008, PR006004의 결합 능력과 일치한 반면, PR005885는 더 높은 최대 MFI 값을 가지는 것으로 나타났다. PR006407은 마우스 B7-H4와 교차 반응을 가지고, PR006391은 마우스 B7-H4와 결합하지 않으며, PR005885는 마우스 B7-H4와 비교적 약한 교차 반응을 나타내었다. 다른 항체 PR007354, PR007355, PR007077, PR007078, PR007168의 결합 추세도 이의 모 B7-H4 분자 PR006008, PR006004의 결합 능력과 일치하였다. 그 중 PR007355 및 PR007078은 마우스 B7-H4와 교차 반응을 나타내었다.

표 5

항체	CHO-K1/hu B7-H4		CHO-K1/cyno B7-H4		CHO-K1/m B7-H4	
	최대 MFI	EC50(nM)	최대 MFI	EC50(nM)	최대 MFI	EC50(nM)
PR006391	1892379	3.541	1668460	3.79	~	~
PR006407	2017672	0.5232	1882190	0.7934	905150	0.7021
PR007354			1381455	161.3	~	~
PR007355			1241666	0.8321	319200	3.332
PR007077			947650	8.587	~	~
PR007078			1032094	1.044	301560	14.58
PR007168			1180925	1.266	~	~
PR005885	3173877	4.785	2889346	5.919	904379	37.00

[0196]

실시예 6. FACS에 의한 B7-H4를 내인성으로 발현하는 종양 세포 및 T 세포에서의 B7-H4×CD3 이중특이성 항체의 결합의 검출

[0197]

B7-H4를 내인성으로 발현하는 종양 세포 또는 CD3을 발현하는 1차 T 세포를 사용하여 세포 수준에서의 항체 결합 실험을 수행하였다. 2% BSA가 포함된 PBS로 MDA-MB-468 세포 또는 인간 T 세포를 재현탁하였다. 세포 밀도를 각각 1×10^6 세포/mL로 조절하였다. 100 μ L 세포/웰로 96웰 V 바닥 플레이트(Corning, #3894)에 접종하고, 이어서 최종 농도의 2배인 3배 농도로 구매 희석된 시험 항체를 100 μ L/웰씩 가하였다. 세포를 4°C에 방치하고, 빛을 차단하고 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 100 μ L/웰의 사전 냉각된 2% BSA가 포함된 PBS를 가하여 세포를 2회 행구고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 그 다음 100 μ L/웰의 형광 2차 항체(Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson, # 109-545-098, 1:500 희석)를 가하고, 4°C에서 빛을 차단하고 1시간 동안 배양하였다. 100 μ L/웰의 사전 냉각된 2% BSA가 포함된 PBS로 세포를 2회 세척하고, 500g, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청을 버렸다. 마지막으로, 200 μ L/웰의

[0198]

사전 냉각된 2% BSA가 포함된 PBS로 세포를 재현탁하고, ACEA Novocyte3000 유세포 분석기를 사용하여 형광 발광 신호 값을 판독하였다.

[0199] 결과는 표 6-1, 6-2, 6-3, 도 5a 내지 5f에 나타낸 바와 같다. 결과에 따르면, 이러한 이중 항체 분자는 모두 MDA-MB-468과 비교적 우수한 결합 능력을 나타내며, 그 중 이중 항체 분자 PR006407은 PR006391과 비교하여 MDA-MB-468과의 결합이 더 강하고, 결과는 CHO-K1/hu B7-H4의 결합 추세와 일치하는 반면; PR006840은 더 높은 최대 MFI를 가지는 것으로 나타났다. 아미노산 돌연변이를 통해 항체의 Tm 값이 증가한 이후, PR007077, PR007078, PR007168은 이의 모 PR006391, PR006407, PR006840과 비교하여 MDA-MB-468과의 결합 능력이 일치함을 유지하였다. 1가 B7-H4의 이중 항체 분자 RP007354, PR007355와 2가 B7-H4의 이중 항체 분자 PR007077, PR007078는 결합에 있어서 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. MDA-MB-468에 대한 PR005885의 결합 곡선은 PR006391과 유사하였다. 항 CD3 말단은 친화도가 비교적 약한 항 CD3을 사용하기 때문에, 이러한 항체는 T 세포와의 결합이 모두 비교적 약하며, 그 중 PR007354는 다른 항체와 비교하여 T 세포와의 결합이 약간 강화되었다.

표 6-1

항체	MDA-MB-468	
	최대 MFI	EC50(nM)
PR006391	257406	19.13
PR007077	279380	28.23
PR006407	185290	0.7753
PR007078	178616	0.9973
PR006840	356834	3.758
PR007168	346731	3.246

[0200]

표 6-2

항체	MDA-MB-468	
	최대 MFI	EC50(nM)
PR007354	305519	30.03
PR007355	186462	0.4732
PR007077	274432	28.83
PR007078	158199	0.7463
PR007168	336461	3.225

[0201]

표 6-3

MDA-MB-468		
항체	최대 MFI	EC50(nM)
PR005885	412128	92.59
PR006391	235559	15.75
PR006407	195969	0.59

[0202]

[0203]

실시예 7. T 세포 사멸 실험

[0204]

본 실험은 인간 1차 T 세포를 이펙터 세포로 사용하고, B7-H4를 높게 발현하는 세포 MDA-MB-468, B7-H4를 낮게 발현하는 세포 OVCAR-3, B7-H4를 매우 낮게 발현하는 세포 DLD-1 또는 완전 음성인 세포 MDA-MB-231을 표적 세포로 사용하였다. ACEA 회사의 RTCA 기기를 사용하여 표적 세포의 전도도를 검출하여 사멸 효과를 반영하였다. 96웰 플레이트 e-plate를 먼저 50 µl의 완전 배지로 평형화하였다. 표적 세포를 소화시키고, 10% 소 태아 혈청이 포함된 RPM1640 완전 배지에 재현탁하고, 4×10⁵/mL로 희석하고, 50 µl/웰을 e-plate 96 플레이트에 플레이팅하고, 즉 2×10⁴/웰이며, 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날 밀테니 T 세포 분리 키트(Miltenyi, # 130-096-535)를 사용하여 설명서의 방법에 따라 1차 T 세포를 분리하였다. 각 웰에 2×10⁵의 T 세포가 포함된 신선한 50 µl의 배양 용액을 가하고, 이어서 50 µl의 4× 농도로 구배 희석된 항체를 가하고, 항체의 최고 최종 농도는 10nM이며, 각 항체는 총 8개의 농도를 이중으로 설정하였다. 실시간으로 표적 세포의 전도도를 검출하며, 일반적으로 24시간 시점의 데이터를 취하여 표적 세포 사멸 효율=(1-시료/블랭크 대조군)×100%를 계산하였다. 24시간 후 상청을 수집하고, ELISA 방법을 통해 IFN-γ의 농도를 검출하였다. ELISA 검출 방법은 IFN gamma Human Uncoated ELISA Kit(Thermo, #88-7316-77) 키트의 사용 설명서를 참조하였다.

[0205]

결과는 도 6a 내지 6e, 도 7a 내지 7d 및 도 8a 내지 8c에 도시된 바와 같다. 결과에 따르면, 모든 이중 항체 분자는 모두 B7-H4를 발현하는 종양 세포에 대해 유의한 사멸 효과가 있는 것으로 나타났다. 그 중, 동일하게 B7-H4에 대해 2가 이중 항체 분자 PR007077, PR007078은 1가 이중 항체 분자 PR007354, PR007355와 비교하여 유의하게 향상된 사멸 효과를 나타내었다. 이중 항체 분자 PR006407은 PR006391과 비교하여, B7-H4를 높게 발현하는 MDA-MB-468 세포 또는 B7-H4를 중간 발현하는 OVCAR-3 세포에서 비교적 높은 사멸 효과를 가지고, 사이토카인 IFN-gamma를 비교적 낮게 발현하며; B7-H4를 발현하지 않는 MDA-MB-231 세포에서 사멸 효과가 없는 것으로 나타났다. 유사하게, 아미노산 돌연변이를 통해 TM 값을 증가시킨 이후의 이중 항체 분자 PR007078은 PR007077과 비교하여 MDA-MB-468 및 OVCAR-3 세포에서 비교적 높은 사멸 효과를 가지고, 사이토카인 IFN-gamma를 비교적 낮게 발현하며; B7-H4를 매우 낮게 발현하는 DLD-1 세포에서 사멸 효과가 없는 것으로 나타났다. PR006840 이중 항체는 비교적 강한 사멸 효과 및 사이토카인의 분비를 동시에 가지는 것으로 나타났다.

[0206]

실시예 8. 비특이적 사이토카인의 유도 실험

[0207]

본 실험은 표적 세포가 존재하지 않는 상태에서 이중 항체 분자가 PBMC를 유도하여 비특이적 사이토카인을 생성하는 경우를 검출하여, 약물의 안전성을 초보적으로 판단할 수 있었다. 인간 PBMC를 10% 소 태아 혈청이 포함된 RPM1640 완전 배지에 재현탁하고, 2×10⁶/mL로 희석하고, 100 µl/웰을 96웰 플레이트(Corning, 3599)에 2×10⁵/웰로 플레이팅하고, 100µl의 2× 항체를 가하고, 37°C에서 밤새 배양하였다. 24시간 후 상청을 수집하고, ELISA 방법을 통해 IL-6, TNF-α, IFN-γ의 농도를 검출하였다. ELISA 검출 방법은 TNF-α human Uncoated ELISA Kit(Thermo, #88-7346-88) 키트, IL-6 human Uncoated ELISA Kit(Thermo, #88-7066-88) 키트, IFN gamma Human Uncoated ELISA Kit(Thermo, #88-7316-77) 키트의 사용 설명서를 참조하였다.

[0208]

결과는 도 9a와 9b, 도 10a와 10b, 및 도 11a와 b에 도시된 바와 같다. 결과에 따르면, 이중 항체 분자 PR007077, PR007078, PR007168에 유도된 IL-6 및 IFN-γ의 발현이 매우 낮지만, 소정의 TNF-α의 발현이 있는 것으로 나타났다. 상이한 공여자의 반응성의 차이가 비교적 컸다. PR005885는 다른 분자와 비교하여 사이토카인의 발현이 가장 낮으며, 이는 사이토카인 폭풍의 위험이 비교적 낮을 수 있음을 시사하였다.

[0209] 실시예 9. NCG 마우스에 구축된 인간 PBMC 면역 체계의 종양 모델의 체내 약효 실험

[0210] OVCAR-3 모델에서, 세포를 접종한 당일 각 NCG 마우스에 5×10^6 의 OVCAR3 종양 세포를 피하 접종하고, 세포를 PBS 및 마트리젤(1:1) 혼합 용액(0.1mL/마리)에 재현탁하고, 피하 접종하였다. 마우스의 평균 종양 체적이 110mm^3 에 도달하였을 때 군을 나누며, 18마리의 마우스를 3개 군으로 나누어, 각 마우스에 5×10^6 의 인간 PBMC를 정맥 접종하고, 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS에 재현탁하였다. 다음날부터 투여를 시작하고, 투여 주기는 주 1회이며, 총 3회 정맥 투여로 투여하였다. 투여를 시작한 후, 체중 및 종양 체적을 주 2회 측정하고, 종양 체적의 계산 방법은 종양 부피(mm^3) = $0.5 \times$ 종양의 긴 직경 \times 종양의 짧은 직경²이었다. 투여 후 23일째에 실험 관찰을 종료한 후, 모든 마우스를 안락사시켰다.

[0211] 결과는 도 12a에 도시된 바와 같다. 투여 후 23일째에 용매 대조군 마우스의 평균 종양 체적은 1612mm^3 였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR006391(0.2mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 1054mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.04임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 34.6%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR006407(0.2mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 770mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.01임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 52.2%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR005885(0.2mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 681mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.001임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 57.77%였다.

[0212] MDA-MB-468 모델에서, 세포를 접종한 당일 각 NCG 마우스에 5×10^6 의 MDA-MB-468 종양 세포를 피하 접종하고, 세포를 PBS 및 마트리젤(1:1) 혼합 용액(0.1mL/마리)에 재현탁하고, 피하 접종하였다. 마우스의 평균 종양 체적이 150mm^3 에 도달하였을 때 군을 나누며, 42마리의 마우스를 7개 군으로 나누어, 각 마우스에 5×10^6 의 인간 PBMC를 정맥 접종하고, 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS에 재현탁하였다. 다음날부터 투여를 시작하고, 투여 주기는 주 1회이며, 총 4회 정맥 투여로 투여하였다. 투여를 시작한 후, 체중 및 종양 체적을 주 2회 측정하고, 종양 체적의 계산 방법은 종양 부피(mm^3) = $0.5 \times$ 종양의 긴 직경 \times 종양의 짧은 직경²이었다. 투여 후 23일째에 실험 관찰을 종료한 후, 모든 마우스를 안락사시켰다.

[0213] 결과는 도 12b에 도시된 바와 같다. 투여 후 23일째에 용매 대조군 마우스의 평균 종양 체적은 893mm^3 였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007077(0.1mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 507mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.01임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 43.16%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007077(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 343mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.0009임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 61.6%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007078(0.1mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 464mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.0067임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 47.9%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007078(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 390mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.0022임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 56.2%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007168(0.1mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 446mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.0092임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 50.1%였다. 투여 후 23일째에 시험약 PR007168(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 275mm^3 이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.0009임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 69.2%였다.

[0214] CT26-B7-H4 모델에서, 세포를 접종한 당일 각 BALB/c-hCD3EDG knock in 마우스에 5×10^5 의 CT26-B7-H4 종양 세포를 피하 접종하고, 세포를 PBS(0.1mL/마리)에 재현탁하여, 피하 접종하였다. 마우스의 평균 종양 체적이 84mm^3 에 도달하였을 때 군을 나누고, 24마리의 마우스를 4개 군으로 나누며, 군을 나누는 당일로부터 투여를 시작하고, 투여 주기는 주 1회이며, 총 3회 정맥 투여로 투여하였다. 투여를 시작한 후, 체중 및 종양 체적을 주 2회 측정하고, 종양 체적의 계산 방법은 종양 부피(mm^3) = $0.5 \times$ 종양의 긴 직경 \times 종양의 짧은 직경²이었다. 투여 후 20일째에 실험 관찰을 종료한 후, 모든 마우스를 안락사시켰다.

[0215] 결과는 도 12c에 도시된 바와 같고, 투여 후 20일째에 용매 대조군 마우스의 평균 종양 체적은 2043mm³였다. 투여 후 20일째에 시험약 PR007077(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 1007mm³이고, 용매 대조군과 비교하여 차이가 유의(p 값은 0.024임)하며, 종양 억제율 TGI(%)는 50.4%였다. 투여 후 20일째에 시험약 PR007078(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 1069mm³이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.031임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 45.5%였다. 투여 후 20일째에 시험약 PR007168(0.5mg/kg) 치료군의 평균 종양 체적은 1155mm³이고, 용매 대조군과 비교하여 유의한 차이(p 값은 0.05임)가 있으며, 종양 억제율 TGI(%)는 39.9%였다.

[0216] **실시예 10. BALB/c 누드 마우스 체내에서의 약동학**

[0217] 체중이 18 내지 22g인 암컷 BALB/c 누드 마우스 6마리를 선택하여, 2.5mg/kg의 투여량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 약물을 투여하며; 하나의 3마리 군은 투여 전 및 투여 후 5분, 24시간(1일), 4일째, 및 10일째에 전혈을 채취하고, 다른 하나의 3마리 군은 투여 전 및 투여 후 5시간, 2일째, 7일째, 및 14일째에 전혈을 채취하였다. 전혈을 30분 동안 방치하여 응고시킨 후, 4℃에서 2,000rpm으로 5분 동안 원심분리하고 분리된 혈청 시료를 분석할 때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다. 본 실시예는 ELISA 방법을 사용하여 마우스 혈청 내 약물 농도를 정량적으로 측정하였다. ELISA Fc 말단 중합 검출 방법은, 96웰 플레이트에 코팅된 염소 항 인간 Fc 다중클론 항체를 통해 마우스 혈청 내 인간 Fc가 포함된 융합 단백질을 포획한 후, HRP 표지된 염소 항 인간 Fc 2차 항체를 가하여 검출하였다. ELISA B7-H4 말단 결합 검출 방법은, 96웰 플레이트에 코팅된 재조합 인간 B7-H4 단백질(Sino Biological, 10738-H08H)을 통해 마우스 혈청 내 B7-H4×CD3 이중 항체를 포획한 후, HRP 표지된 염소 항 인간 Fc 2차 항체를 가하여 검출하였다.

[0218] Phoenix WinNonlin 소프트웨어 버전 8.2를 사용하여, 비구획 모델(NCA)을 선택하여 혈중 약물 농도 데이터에 대해 분석하여 이의 약동학을 평가하였으며, 결과는 하기 표 7에 나타낸 바와 같다.

[0219] 결과에 따르면, Fc 말단 중합 검출 방법에서, 이전 14일의 데이터로부터 계산하여, 마우스 체내에서 PR006407의 반감기는 약 6일이고, 마우스 체내에서 PR007078의 반감기는 약 8일인 것으로 나타났다. 그러나 B7-H4 말단 결합 검출 방법에서, 이전 14일의 데이터로부터 계산하여, 마우스 체내에서 PR006407의 반감기는 약 1일에 불과한 반면, 마우스 체내에서 PR007078의 반감기는 약 12일인 것으로 나타났다. 이는 열안정성 변형을 거쳐 이황화 결합이 도입된 항체가 마우스 체내에서 항체의 안정성을 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

표 7 PR006407 및 열안정성 변형을 거쳐 이황화 결합이 도입된 상용하는 항체 PR007078의

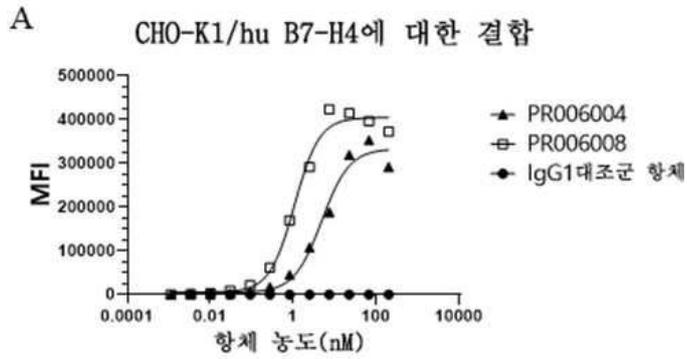
약동학적 매개변수

PK 매개변수	PR006407		PR007078	
	총 항체	B7-H4 가 결합된 항체	총 항체	B7-H4 가 결합된 항체
CL(mL/hr/kg)	2.15	4.2	1.5	2.27
Vss(mL/kg)	290	92.1	236	508
Terminal t1/2 (hr)	144	24.5	183	278
AUClast(hr*µg/mL)	1010	592	1393	846
AUCINF(hr*µg/mL)	1161	595	1665	1103
MRTINF(hr)	135	21.9	157	224
C0(µg/mL)	41.8	43.8	37.4	31.4
AUCINF_Free B7-H4/Total assay(%)		51.3		66.2

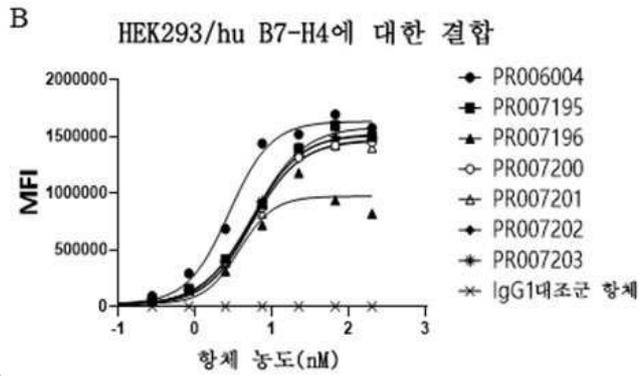
[0220]

도면

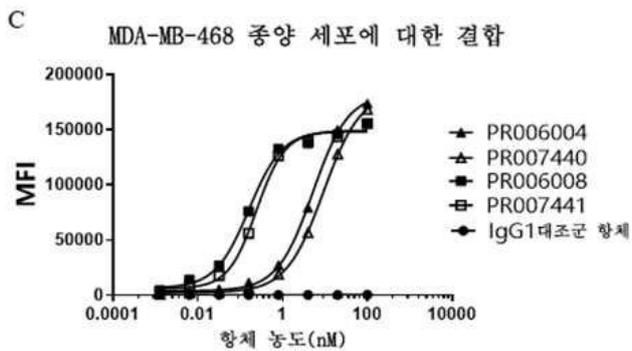
도면1a



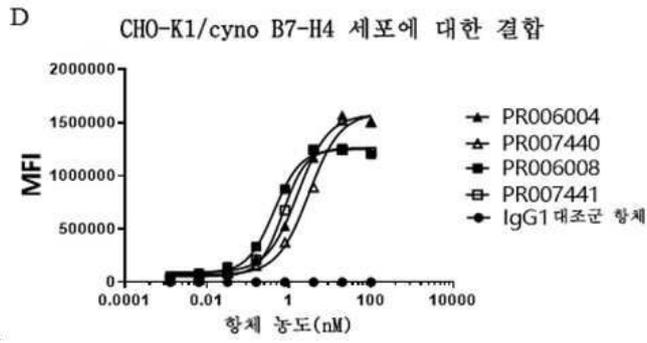
도면1b



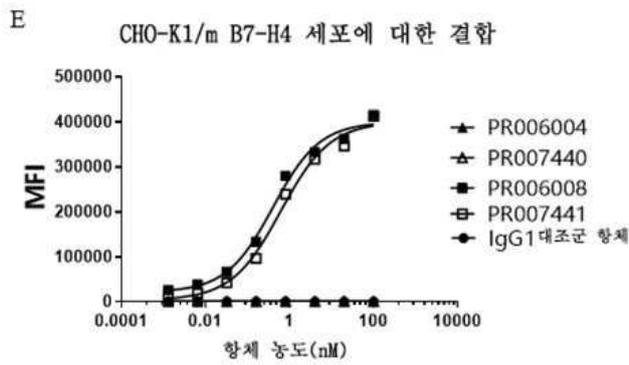
도면1c



도면1d



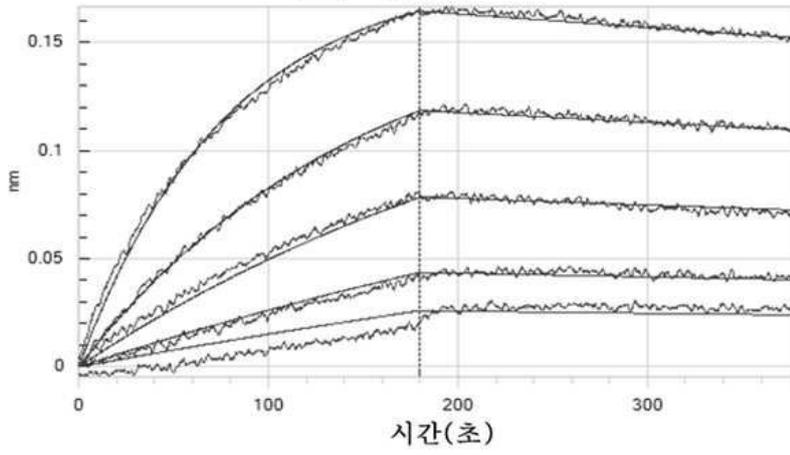
도면1e



도면2

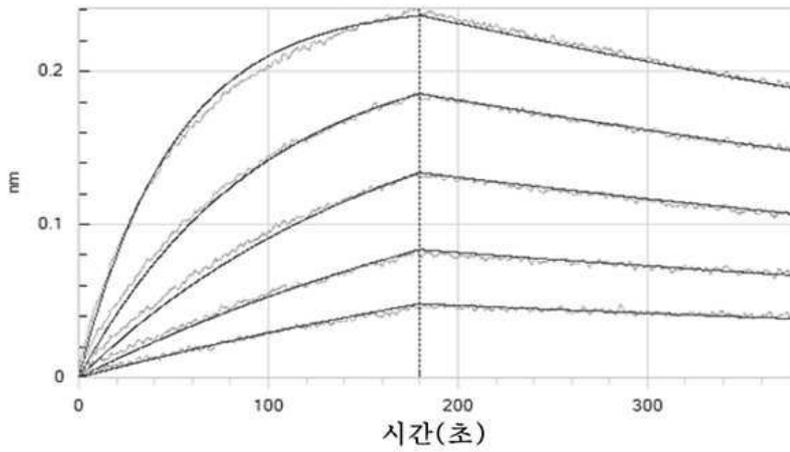
PR006004

로딩 시료 ID: PR006004



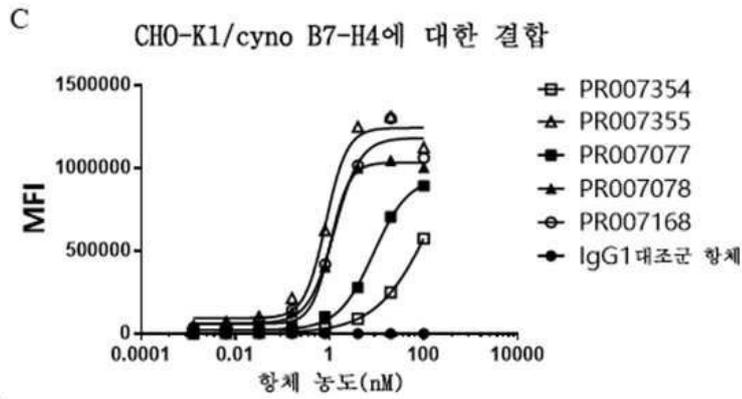
PR006008

로딩 시료 ID: PR006008

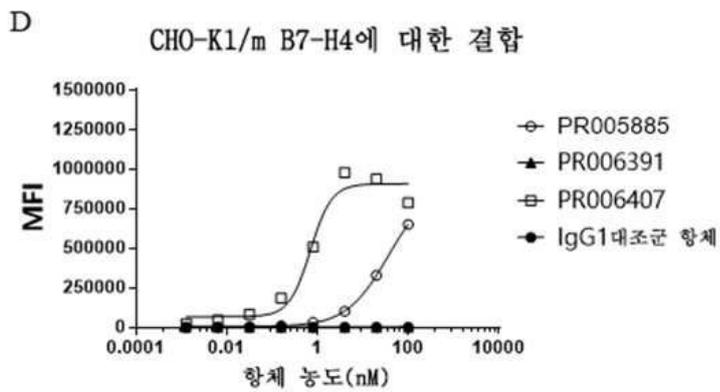


Ab	Conc. (nM)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R ²
PR006004	60-3.75	1.89E-09	2.10E+05	3.96E-04	0.9965
PR006008	60-3.75	3.65E-09	3.12E+05	1.14E-03	0.9983

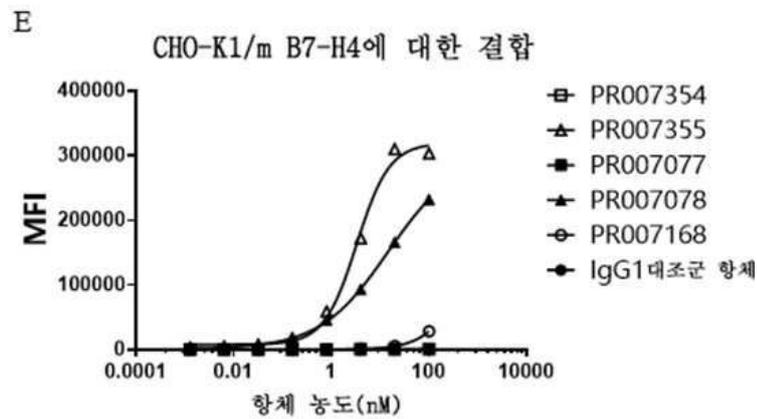
도면4c



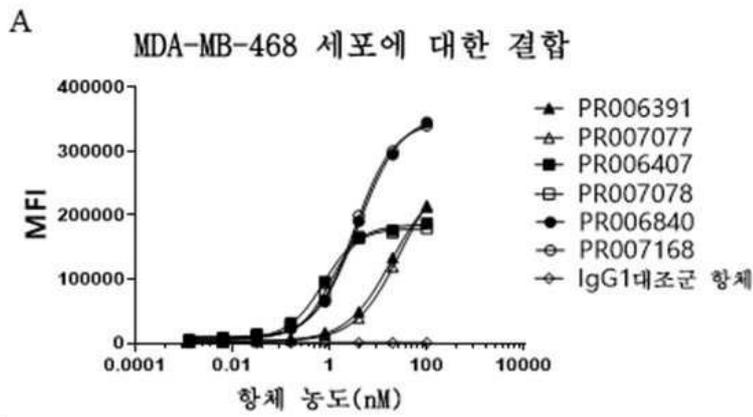
도면4d



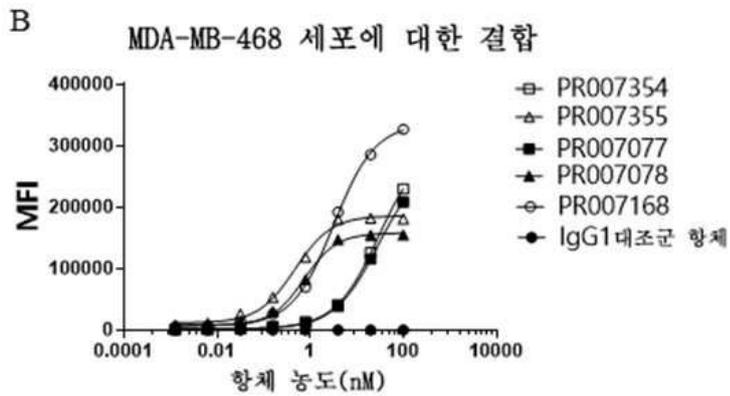
도면4e



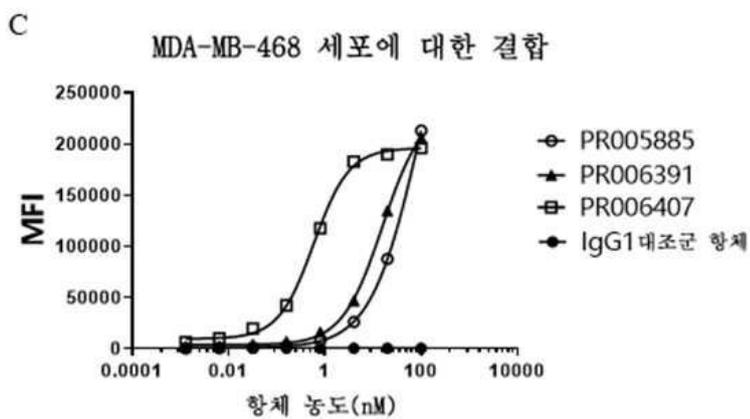
도면5a



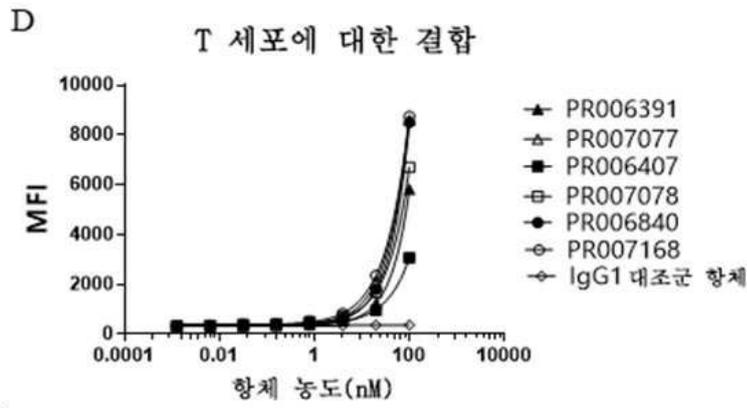
도면5b



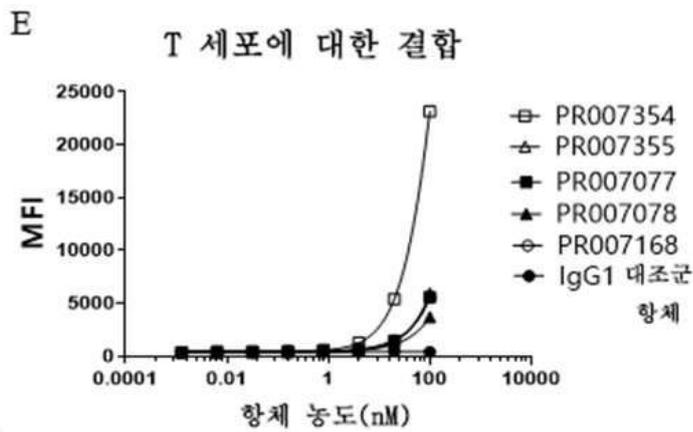
도면5c



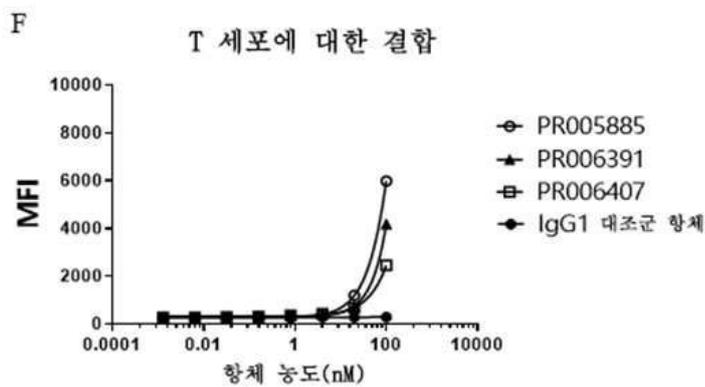
도면5d



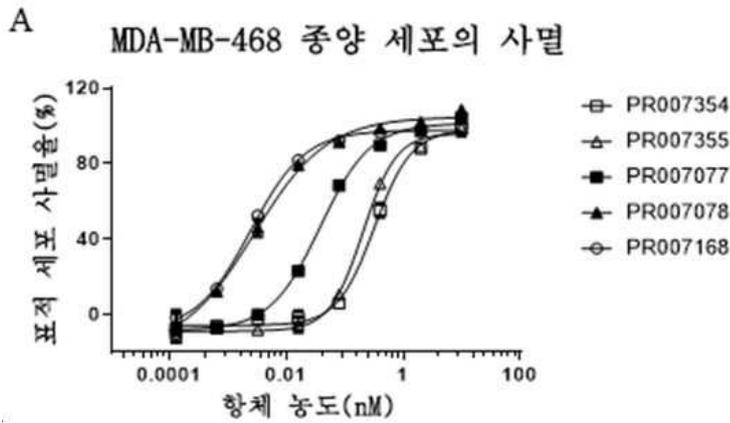
도면5e



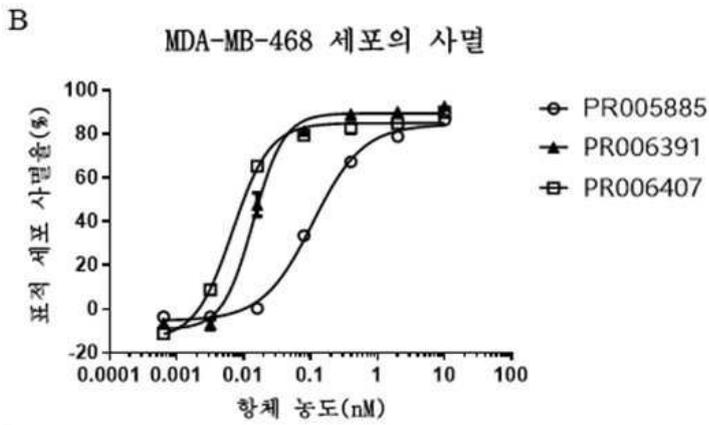
도면5f



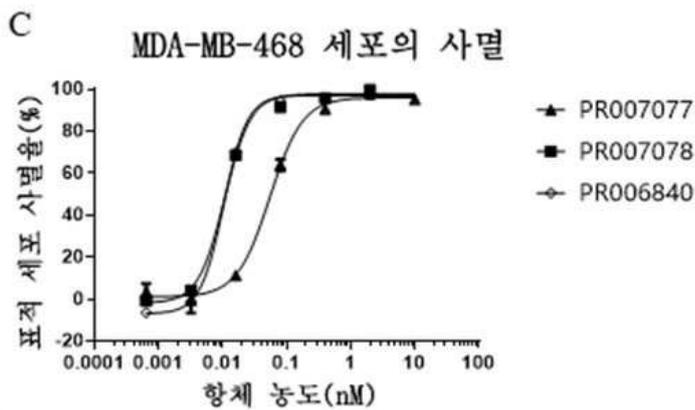
도면6a



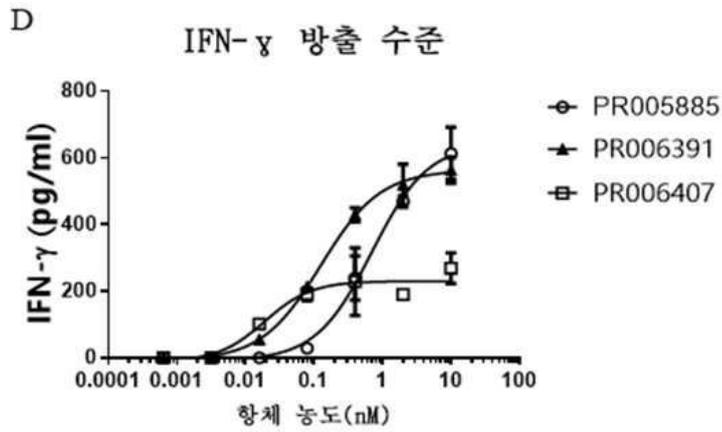
도면6b



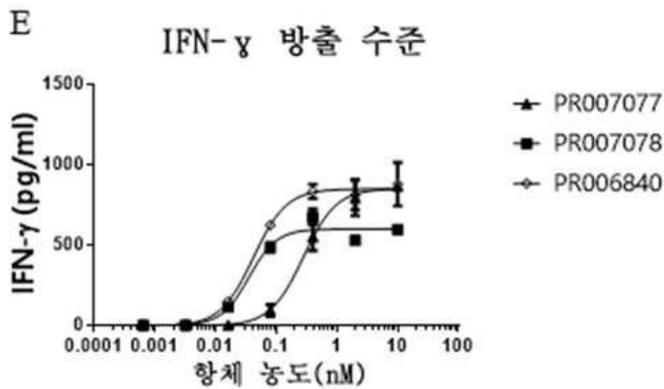
도면6c



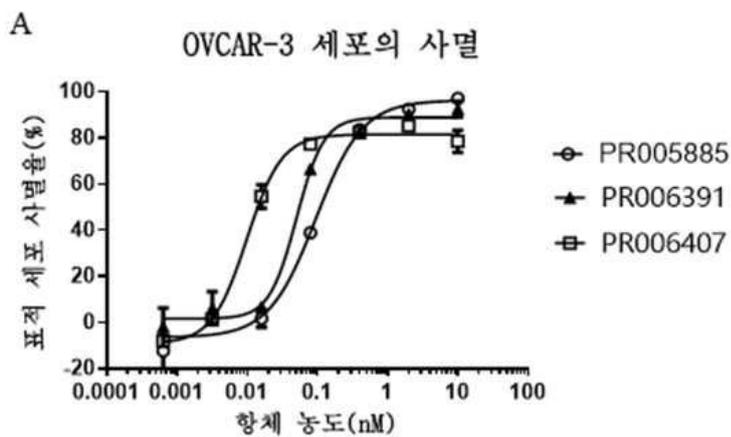
도면6d



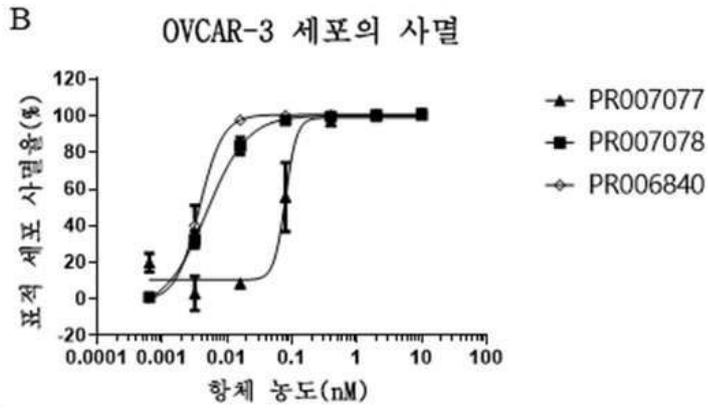
도면6e



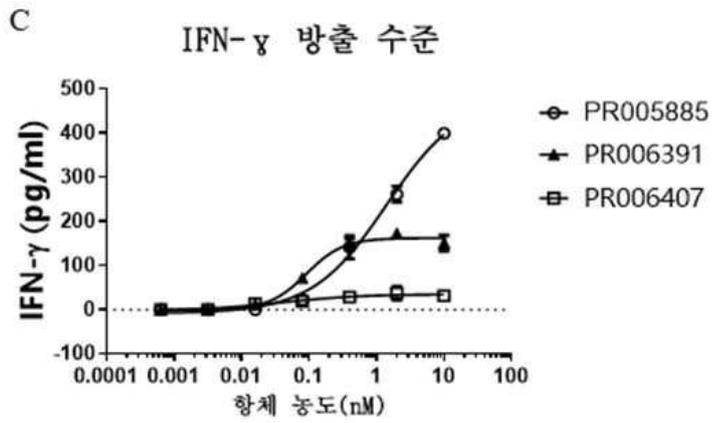
도면7a



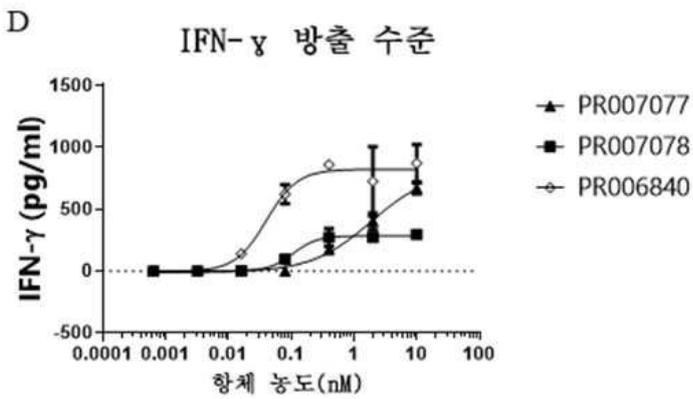
도면7b



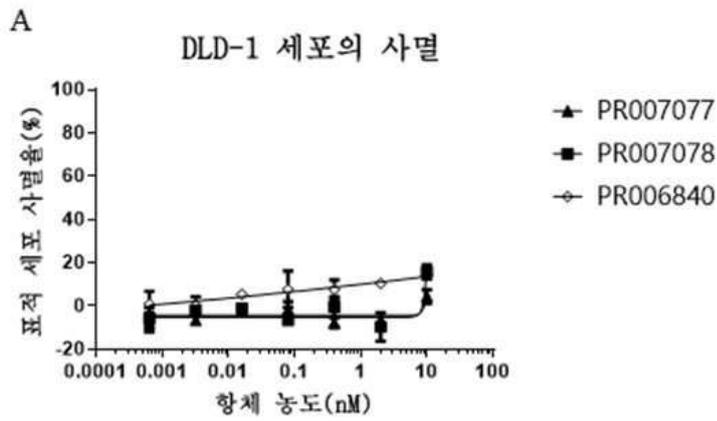
도면7c



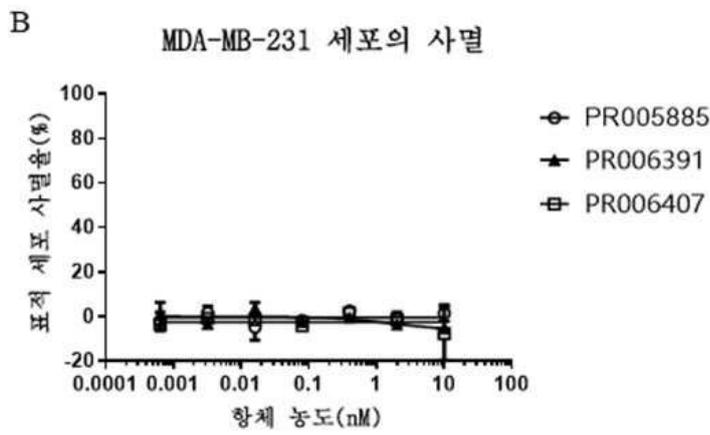
도면7d



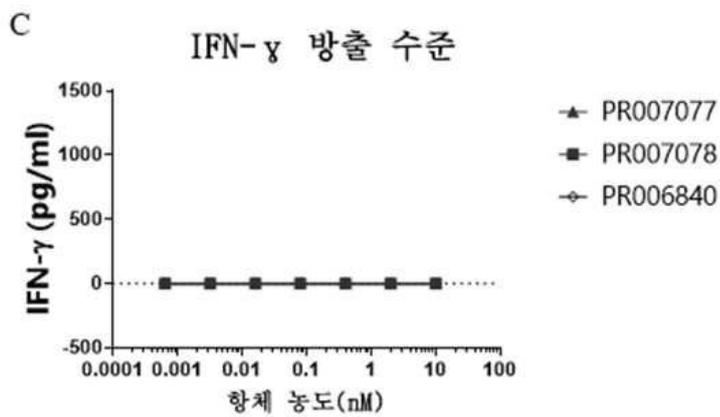
도면8a



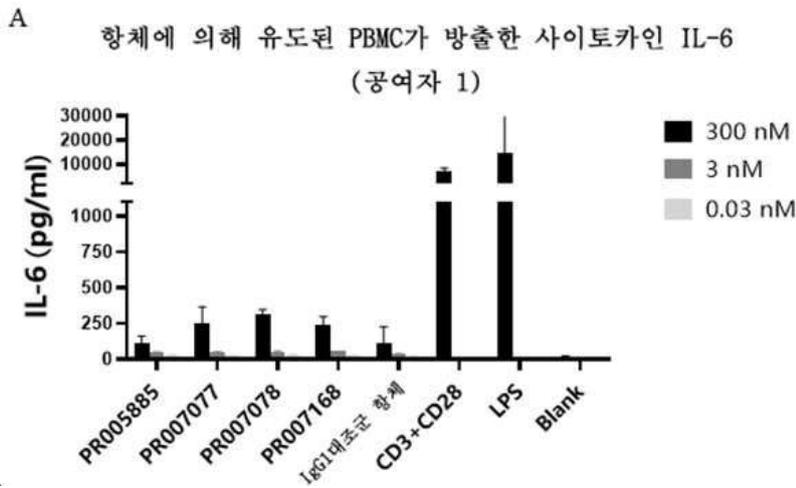
도면8b



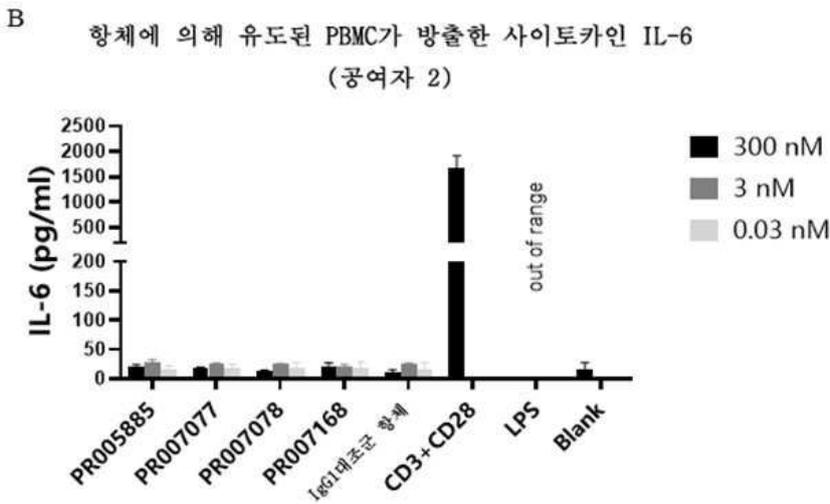
도면8c



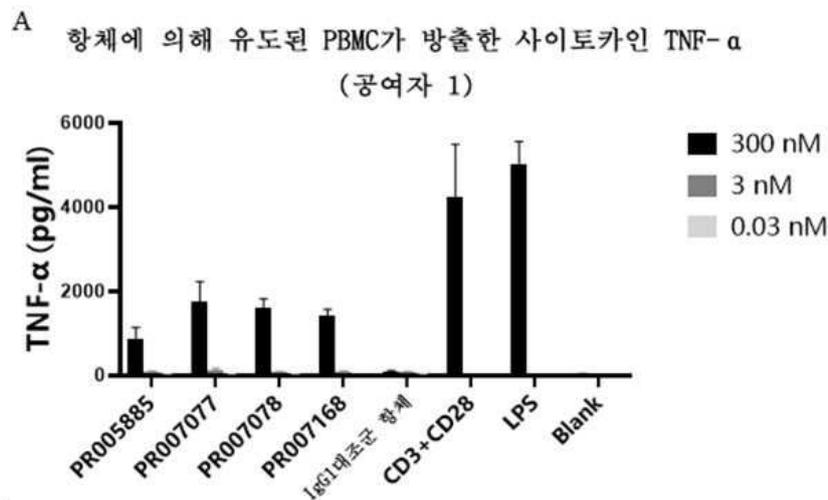
도면9a



도면9b

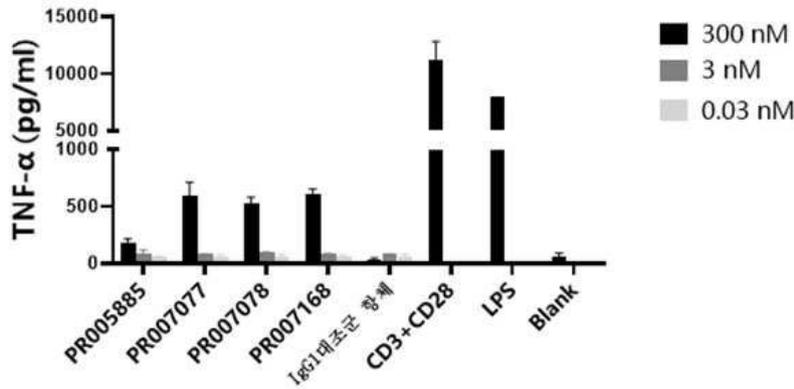


도면10a



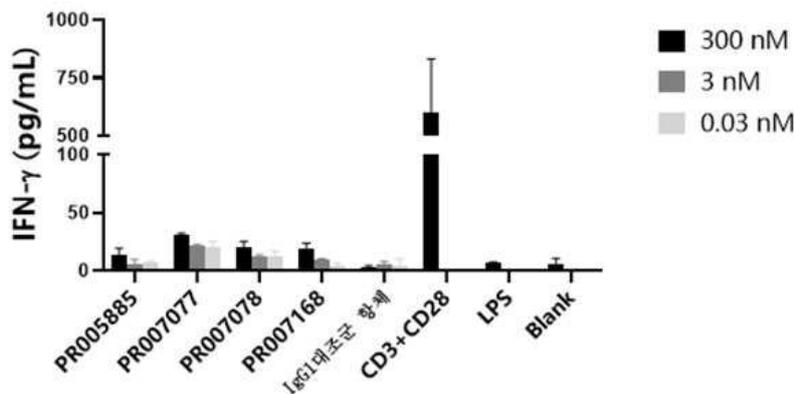
도면10b

B 항체에 의해 유도된 PBMC가 방출한 사이토카인 TNF- α
(공여자 2)



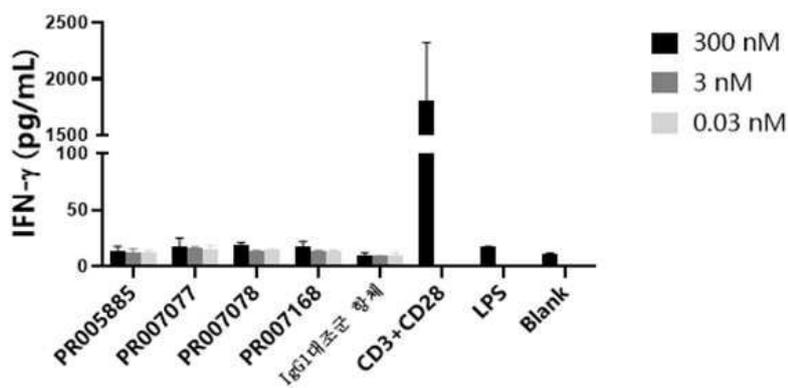
도면11a

A 항체에 의해 유도된 PBMC가 방출한 사이토카인 IFN- γ
(공여자 1)

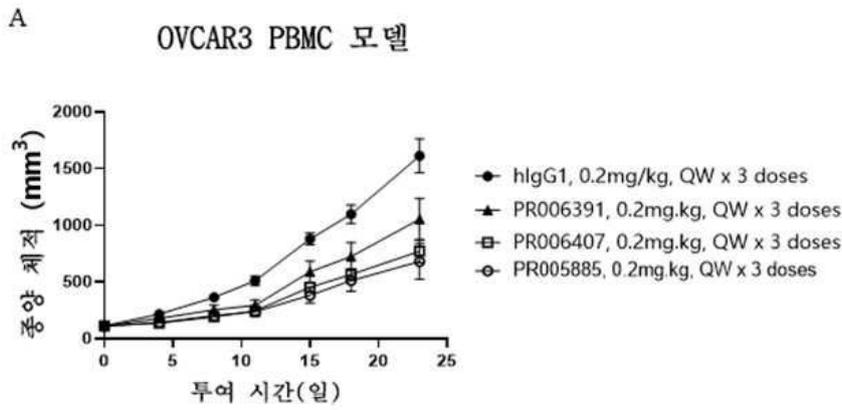


도면11b

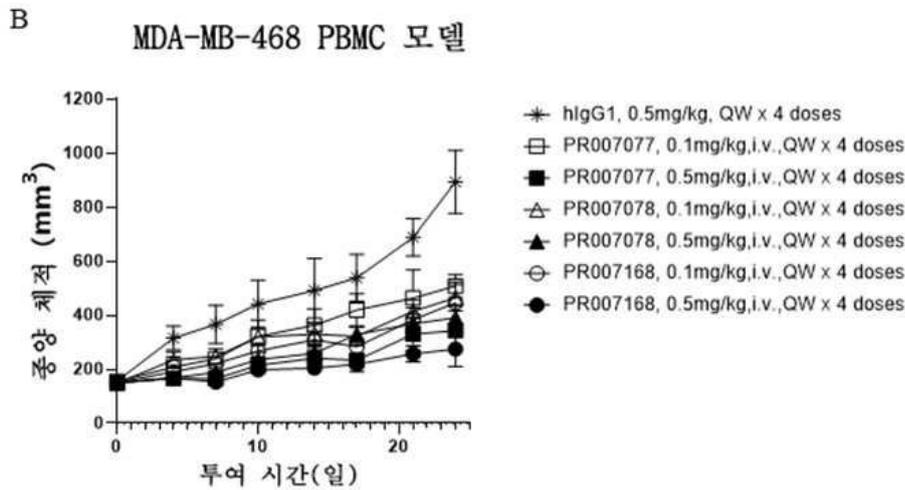
B 항체에 의해 유도된 PBMC가 방출한 사이토카인 IFN- γ
(공여자 2)



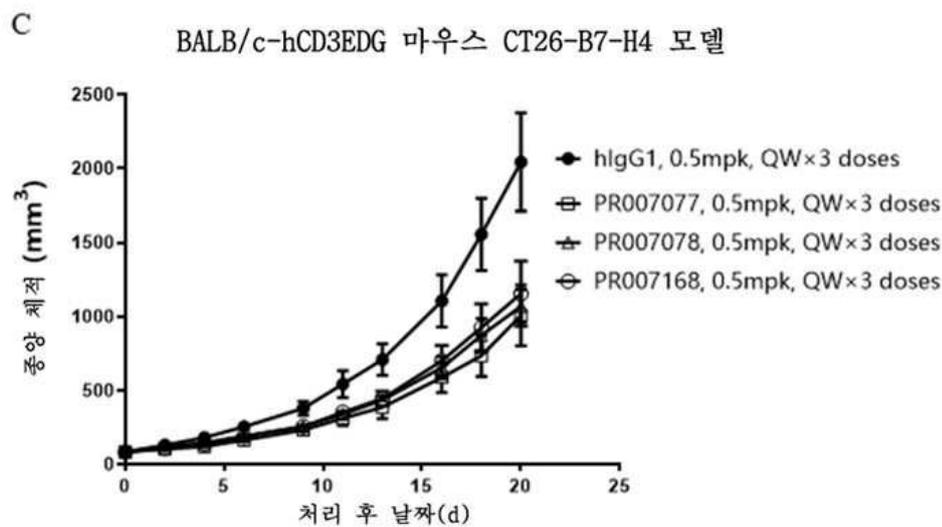
도면12a



도면12b



도면12c



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.