

명세서

발명의 명칭

항-메소텔린 항체, 항-CD3 항체 또는 항-EGFR 항체를 포함하는 융합 단백질
5 및 이를 포함하는 이중 특이적 또는 삼중 특이적 항체 및 이의 용도

기술분야

본 발명은 항-메소텔린 항체, 항-CD3 항체 또는 항-EGFR 항체를 포함하는
융합 단백질 및 메소텔린 및 CD3에 특이적인 이중 특이적 항체 및 메소텔린, CD3 및
EGFR에 특이적인 삼중 특이적 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

10 배경기술

항암치료에 있어서 단클론 항체는 최초의 암 면역요법으로서, 고형암뿐만
아니라 혈액암에서도 우수한 효과를 보이고 있지만 여전히 한계점이 제시되고 있다.
이와 관련하여, 항체의 Fc 영역에 공학 기술을 도입하여 ADCC(antibody-dependent
cytotoxicity)의 효과를 높여주거나, 이중 혹은 삼중 특이적인 항체를 개발하여
15 한가지 항체로 다양한 타겟에 접근할 수 있는 기술이 도입되고 있다.

이중 특이적 항체는 두 가지의 서로 다른 항체에 동시 결합할 수 있는
항체로서, T 세포 등의 면역 세포가 암 세포와 같은 특정 타겟 세포에 대해서만
독성을 나타내고 그 외의 정상 세포들에 대해서는 독성을 나타내지 않게 조작할 수
있다. 이러한 이중 특이적 항체는 암 치료 효과를 극대화하면서도 부작용을
20 최소화할 수 있어서 여러 이중 특이적 항체 포맷이 개발되고 있으며, T 세포 매개된
면역치료에 대한 이들의 적합성이 보고되고 있다.

하지만, 이중 항체를 제조하는 과정에서 공발현(co-expression)시, 상이한
특이성을 가지는 항체의 중쇄와 경쇄의 미스페어링(mispairing)으로 인하여 다수의
비-기능성 부생성물을 초래한다는 문제점이 있다. 따라서, 이러한 문제점을
25 해결하여 원하는 다중 특이적인 항체 구축물을 임상적으로 충분한 양 및 순도로
제조하기 위한 기술의 개발이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

기존 이중 특이적 항체의 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명자는 항체의 중쇄와 경쇄를 링커로 연결하여 단일 사슬로 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 이중 특이적 또는 삼중 특이적 항체를 개발하여, 미스페어링의 문제를 해결함과 동시에 종양 세포의 높은 사멸 효과를 확인하고 본
5 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명은 항-메소텔린 항체, 항-CD3 항체 또는 항-EGFR 항체를 포함하는 융합 단백질 및 이를 포함하는 이중 특이적 또는 삼중 특이적 항체 및 이를 이용한 암 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

10 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체 및 CD3에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 단일 사슬인 제1 융합 단백질을 제공한다.

본 발명의 다른 측면은, 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 단일 사슬인 제2 융합 단백질을 제공한다.

15 본 발명의 또 다른 측면은, EGFR에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 단일 사슬인 제3 융합 단백질을 제공한다

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 제1 융합 단백질과 상기 제2 융합 단백질을 포함하는 이중 특이적 항체를 제공한다.

20 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 제1 융합 단백질과 제3 융합 단백질을 포함하는 삼중 특이적 항체를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합 단백질, 상기 이중 특이적 항체 또는 상기 삼중 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

25 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 융합 단백질, 상기 이중 특이적 항체 또는 상기 삼중 특이적 항체의 용도를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 암 치료용 약학적 조성물을 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 융합 단백질 및 이를 포함하는 이중 특이적 항체 또는 삼중 특이적 항체는 높은 수율 및 순도로 제조할 수 있으며, 종양의 사멸 및 성장 억제 효과가 우수하므로 암 치료에 있어서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

5 도 1은 항-MSLN/항-CD3 이중 특이적 항체(이하, HMI323/HMI323-A15)의 예시적인 모식도이다.

 도 2는 항-EGFR/항-MSLN/항-CD3 삼중 특이적 항체(이하, Cetuximab/HMI323-A15)의 예시적인 모식도이다.

 도 3은 HMI323/HMI323-A15의 크기 배제 크로마토그래피를 수행한 결과이다.

10 도 4는 HMI323/HMI323-A15의 SDS-PAGE를 수행한 결과이다.

 도 5는 Cetuximab/HMI323-A15의 크기 배제 크로마토그래피를 수행한 결과이다.

 도 6은 Cetuximab/HMI323-A15의 SDS-PAGE를 수행한 결과이다.

15 도 7은 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15와 H226 암 세포주의 결합력을 FACS(Fluorescence activated cell sorter)로 측정한 결과이다.

 도 8은 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15와 AsPC-1 암 세포주의 결합력을 FACS로 측정한 결과이다.

 도 9는 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15의 Jurkat 세포주의 결합력을 FACS로 측정한 결과이다.

20 도 10은 PBMC와 H226 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 24시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

 도 11은 PBMC와 AsPC-1 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 24시간
25 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

 도 12는 PBMC와 H226 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 13은 PBMC와 AsPC-1 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

5 도 14는 PBMC와 H226 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 20 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 15는 PBMC와 AsPC-1 암 세포주가 PBMC : 타겟 세포 = 20 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

10 도 16은 T 세포와 H226 암 세포주가 T 세포 : 타겟 세포 = 5 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 24시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 17은 T 세포와 H226 암 세포주가 T 세포 : 타겟 세포 = 5 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간
15 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 18은 T 세포와 H226 암 세포주가 T 세포 : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 24시간 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 19는 T 세포와 H226 암 세포주가 T 세포 : 타겟 세포 = 10 : 1의 비율로 혼합된 곳에 HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15를 처리하고 48시간
20 경과한 후의 세포 사멸 결과이다.

도 20은 H226 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인한 결과이다.

도 21은 H226 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 및
25 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인 하기 위하여, 대조군 대비 종양 억제 효과(%)를 비교한 결과이다.

도 22는 H226 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 및 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인 하기 위하여, 종양 조직의 면역 T세포

침투를 확인한 결과이다.

도 23은 AsPC-1 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 및 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인 하기 위하여, 종양 크기(mm³)를 비교한 결과이다.

5 도 24는 AsPC-1 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 및 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인 하기 위하여, 대조군 대비 종양 억제 효과(%)를 비교한 결과이다.

도 25는 AsPC-1 xenograft NOG 마우스 모델에서 HMI323/HMI323-A15 및 Cetuximab/HMI323-A15의 항암 효과를 확인 하기 위하여, 종양 조직의 면역 T세포
10 침투를 확인한 결과이다.

도 26은 마우스 혈청 내에서 Cetuximab/HMI323-A15의 약물동력학(PK)을 분석한 결과이다.

도 27은 마우스 혈청 내에서 HMI323/HMI323-A15의 약물동력학(PK)을 분석한 결과이다.

15 발명의 실시를 위한 최선의 형태

본 발명은 일 측면에서, 하기 구조식 1의 융합 단백질로서,

[구조식 1]

N' -A-B-L1-C-D-L2-E-F-L3-G-H-L4-I-C'

상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,

20 상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,

상기 A는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 25의 경쇄 CDR1, 서열번호 26의 경쇄 CDR2 및 서열번호 27의 경쇄 CDR3를 포함하고,

상기 B는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

25 상기 C는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 29의 중쇄 CDR2 및 서열번호 30의 중쇄 CDR3를 포함하고,

상기 D는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,

상기 E는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 31의 경쇄 CDR1, 서열번호 32의 경쇄 CDR2 및 서열번호 33의 경쇄 CDR3를 포함하고, 상기 F는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 G는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 34의 중쇄 CDR1, 서열번호 35의 중쇄 CDR2 및 서열번호 36의 중쇄 CDR3를 포함하고, 상기 H는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며, 상기 I는 Fc 영역 또는 이의 변이체이고, 상기 L1, L2, L3 및 L4는 각각 펩타이드 링커인 제1 융합 단백질에 관한 것이다.

본 발명에 있어서, 상기 L1, L2, L3 및 L4는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L1 및 L3는 각각 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L2는 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L4는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L4는 항체의 힌지 영역인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 A는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서, 서열번호 7의 아미노산 서열 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 B는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 불변 부위로서, 서열번호 46의 아미노산 서열 또는 서열번호 46의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 C는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서, 서열번호 9의 아미노산 서열 또는 서열번호 9의 아미노산 서열과

95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 D는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1
5 영역으로서, 서열번호 47의 아미노산 서열 또는 서열번호 47의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 E는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서, 서열번호 13의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열과 95%
10 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 F는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 불변 부위로서, 서열번호 46의 아미노산 서열 또는 서열번호 46의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는
15 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 G는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 서열번호 15의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 H는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역으로서, 서열번호 47의 아미노산 서열 또는 서열번호 47의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 I는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체의 Fc 영역 또는 이의 변이체로서, 서열번호 48의 아미노산 서열 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 I는 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 즉, 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역에 놓 구조를

형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Y119C, K130E 및 K179W로 치환되거나, 홀 구조를 형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Q117R, S124C, D169V 및 F175T로 치환될 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제1 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열
5 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상, 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명은 일 측면에서, 하기 구조식 2의 융합 단백질로서,

[구조식 2]

N' -A-B-L1-C-D-L5-J-C'

10 상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,

상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,

상기 A는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 25의 경쇄 CDR1, 서열번호 26의 경쇄 CDR2 및 서열번호 27의 경쇄 CDR3를 포함하고,

15 상기 B는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 C는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 29의 중쇄 CDR2 및 서열번호 30의 중쇄 CDR3를 포함하고,

상기 D는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,

20 상기 J는 Fc 영역 또는 이의 단편이고,

상기 L1 및 L5는 각각 펩타이드 링커인 제2 융합 단백질에 관한 것이다.

본 발명에 있어서, 상기 L1 및 L5는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L1은 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진
25 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L5는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L5는 항체의 힌지 영역인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제2 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열 또는 서열번호 3의 아미노산 서열과 90% 이상, 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.

상기 J는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체의 Fc 영역 또는 이의 변이체로서,
 5 서열번호 48의 아미노산 서열 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 J는 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 즉, 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역에 늑 구조를 형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Y119C, K130E 및 K179W로 치환되거나, 홀
 10 구조를 형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Q117R, S124C, D169V 및 F175T로 치환될 수 있다.

본 발명은 일 측면에서, 하기 구조식 3의 융합 단백질로서,

[구조식 3]

N' -K-M-L6-N-O-L7-P-C'

15 상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,

상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,

상기 K는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 37의 경쇄 CDR1, 서열번호 38의 경쇄 CDR2 및 서열번호 39의 경쇄 CDR3를 포함하고, 상기 M은 항체의 경쇄 불변 부위이며,

20 상기 N은 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 40의 중쇄 CDR1, 서열번호 41의 중쇄 CDR2 및 서열번호 42의 중쇄 CDR3를 포함하고, 상기 O는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,

상기 P는 Fc 영역 또는 이의 단편이고,

상기 L6 및 L7는 각각 펩타이드 링커인 제3 융합 단백질에 관한 것이다.

25 본 발명에 있어서, 상기 L6 및 L7는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L6는 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L7는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 L7은 항체의 힌지 영역인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제3 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 K는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서, 서열번호 17의 아미노산 서열 또는 서열번호 17의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 M은 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 불변 부위로서, 서열번호 46의 아미노산 서열 또는 서열번호 46의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 N은 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서, 서열번호 19의 아미노산 서열 또는 서열번호 19의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 O는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체, 바람직하게는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역으로서, 서열번호 47의 아미노산 서열 또는 서열번호 47의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

상기 J는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체의 Fc 영역 또는 이의 변이체로서, 서열번호 48의 아미노산 서열 또는 서열번호 48의 아미노산 서열과 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 I는 IgG, IgA, IgM, IgD 또는 IgE 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역의 아미노산 일부가 치환된 것일 수 있다. 즉, 항체의 중쇄 불변 영역 중 CH3 영역에 높 구조를 형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Y119C, K130E 및

K179W로 치환되거나, 홀 구조를 형성하기 위하여 서열번호 48의 아미노산 서열에서 Q117R, S124C, D169V 및 F175T로 치환될 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제3 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열 또는 서열번호 5의 아미노산 서열과 90% 이상, 95% 이상, 바람직하게는 99% 이상의
5 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어, "메소텔린(Mesothelin, MSLN)"은 동물, 바람직하게는 인체 및 원숭이 내에 존재하는 MSLN 야생형, 이의 변이체, 이소타입(isotype) 및 상동체(paralog)를 포함하는 의미이다. 또한, 용어 "인간 MSLN"은 인간 유래의 MSLN를 의미한다. 메소텔린은 정상 중피 세포에 존재하고
10 중피종, 난소 선암 및 췌장 선암을 비롯한 몇 가지 인간 종양에서 과발현되는 40 kDa의 세포 표면 당단백질이다. 메소텔린은 인터루킨-3의 존재 하에서 거핵구 콜로니 형성 활성을 발휘하는 것으로 밝혀졌다. 메소텔린은 중피와 같은, 정상 성인 조직에 낮은 수준으로 존재하지만 중피종, 난소암, 췌장암, 자궁경부, 머리와 목, 외음, 폐 및 식도의 편평 세포 암종, 폐 선암종, 자궁 내막 암종, 이상성 활막
15 육종, 결합 조직형성 소원형세포 종양, 및 위 선암을 비롯한 매우 다양한 인간 종양에서 비정상적으로 과발현되는 종양 분화 항원이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "CD3"는 동물, 바람직하게는 인체 및 원숭이 내에 존재하는 CD3 야생형, 이의 변이체, 이소타입(isotype) 및 상동체(paralog)를 포함하는 의미이다. 또한, 용어 "인간 CD3"는 인간 유래의 CD3를 의미한다. CD3는 T
20 세포 표면에 존재하는 항원 분자로서 T 세포 항원 수용체와 결합하여 신호전달계로서 작용하여 T 세포를 활성화시키는 역할을 한다.

본 명세서에서 사용된 용어, "EGFR"은 표피 성장 인자 수용체(Epidermal growth factor receptor)인 막 단백질을 의미하며, ErbB-1 또는 HER1로도 불린다. 또한, 용어 "인간 EGFR"은 인간 유래의 EGFR을 의미한다.

본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 특정 항원과 면역학적 반응성을 가지는 면역글로불린(Ig) 분자로서, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할의 단백질 분자를 의미하고, 전체 항체(whole antibody) 및 항체 단편(antibody fragment) 모두 포괄하는 개념이다.
25

본 명세서에서 사용된 용어, "중쇄"는 항원에 대한 특이성을 부여하기에 충분한 가변 부위(VH) 및 3개의 불변 부위인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체 길이의 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "경쇄"는 항원에 대한 특이성을 부여하기에
5 충분한 가변 부위(VL) 및 불변 부위(CL)를 포함하는 전체 길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "CDR"은 항체의 중쇄 가변 부위(VH)와 경쇄 가변 부위(VL)의 일부인 상보성 결정 영역(complementarity determining region)을 의미한다.

10 본 명세서에서 사용된 용어, "Fc"는 면역글로불린의 C 말단 영역이고 중쇄 불변 부위 중에서 CH2 및 CH3만으로 구성된 기능상의 구성 단위의 하나를 의미한다. Fc는 항원을 결합할 능력은 없으나 보체와의 결합성 등을 나타내며, 아미노산 서열이 일정하다.

본 명세서에서 사용된 용어, "힌지 영역(hinge region)"은 중쇄의 CH1과 CH2
15 사이에 존재하는 펩타이드를 의미한다. 힌지 영역은 2개의 중쇄 사슬을 이황화결합으로 연결하는 시스테인 잔기가 1개 이상 존재하고, 유연성이 큰 구조를 하고 있다.

본 발명에 있어서, 상기 힌지 영역은 1 내지 3개의 시스테인 잔기, 예를 들어 1개, 2개 또는 3개의 시스테인 잔기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

20 또한, 본 발명은 상기 기재된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

본 발명에 있어서, 상기 제1 융합 단백질을 암호화하는 DNA는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열과 80%, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는
25 염기서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제2 융합 단백질을 암호화하는 DNA는 서열번호 4의 염기서열 또는 서열번호 4의 염기서열과 80%, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는

염기서열로 이루어질 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제3 융합 단백질을 암호화하는 DNA는 서열번호 6의 염기서열 또는 서열번호 6의 염기서열과 80%, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 가지는
5 염기서열로 이루어질 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 기재된 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 도입하여 트랜스펙션된 숙주세포에 관한 것이다.

10 또한, 본 발명은 상기 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는, 상기 융합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 다른 측면에서, 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 포함하는 이중 특이적 항체에 관한 것이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "이중 특이적 항체"는 하나의 항체에서 두 개의
15 상이한 항원을 인식하도록 조작된 항체를 의미한다.

본 발명의 이중 특이적 항체는 항-MSLN 항체와 항-CD3 항체를 동시에 포함하고 있으므로, MSLN 발현 암 세포 및 T 세포에 특이적으로 결합하여 면역세포의 활성화 유도를 통하여 MSLN 발현 암 세포의 증식을 억제하거나 사멸시킬 수 있다.

20 본 발명에 있어서, 상기 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질의 결합을 통하여 하나의 항체, 즉 이중 특이적 항체를 제공하기 위해, 각각의 항체는 중쇄 불변 영역의 일부 아미노산 잔기가 치환된 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 상기 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질의 Fc 영역은 이황화결합 또는 낚-인투-홀 구조, 바람직하게는 낚-인투-홀 구조를 통해 상호 결합되어 이중 특이적 항체를
25 형성할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 용어, "낚-인투-홀(knob-into-hole) 구조"는 각기 다른 2개의 Ig 중쇄의 CH3 영역에 돌연변이를 유발하여 하나의 Ig 중쇄 CH3 영역에는 낚(knob) 구조를 유도하고, 다른 하나의 Ig 중쇄 CH3 영역에는 홀(hole)

구조를 유도하여 이들 간의 이형이합체(heterodimer)를 형성하도록 하는 구조를 의미한다.

통상적으로 상기 knob 구조를 형성하는 아미노산 잔기는 측쇄의 크기가 큰 소수성 잔기에서 측쇄가 작은 소수성 아미노산으로 치환되고, hole 구조를 형성하는 아미노산 잔기는 측쇄의 크기가 작은 소수성 아미노산 잔기에서 측쇄가 큰 소수성 아미노산 잔기로 치환되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이와 같이 각각의 항체가 knob 구조와 hole 구조를 형성하도록 유도하면, 동형이합체(homodimer) 형성에 비해 이형이합체가 더욱 잘 형성될 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 이중 특이적 항체는 상기 제1 융합 단백질의 I에 knob 변형을 포함하고, 상기 제2 융합 단백질의 J에 hole 변형을 포함하거나; 또는 상기 제1 융합 단백질의 I에 hole 변형을 포함하고, 상기 제2 융합 단백질의 J에 knob 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 이중 특이적 항체는 2+1 IgG 형태이며, 항-MSLN 또는 항-CD3의 Fab 단편을 구성하는 중쇄와 경쇄를 링커로 연결시켜 각각의 단일 사슬로 발현하고, 단일 사슬인 항-MSLN 및 항-CD3의 Fab 단편을 펩타이드 링커로 연결하여, 상기 이중 특이적 항체가 두 개의 단일 사슬로 구성되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 제1 융합 단백질 및 상기 제3 융합 단백질을 포함하는 삼중 특이적 항체에 관한 것이다.

본 명세서에서 사용된 용어, "삼중 특이적 항체"는 하나의 항체에서 세 개의 상이한 항원을 인식하도록 조작된 항체를 의미한다.

본 발명의 삼중 특이적 항체는 항-EGFR, 항-MSLN 항체 및 항-CD3 항체를 동시에 포함하고 있으므로, EGFR 또는 MSLN 발현 암 세포 및 T 세포에 특이적으로 결합하여 면역세포의 활성화 유도를 통하여 EGFR 또는 MSLN 발현 암 세포의 증식을 억제하거나 사멸시킬 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 제1 융합 단백질 및 제3 융합 단백질의 결합을 통하여 하나의 항체, 즉 삼중 특이적 항체를 제공하기 위해, 각각의 항체는 중쇄 불변 영역의 일부 아미노산 잔기가 치환된 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 상기

제1 융합 단백질 및 제3 융합 단백질의 Fc 영역은 이황화결합 또는 힙-인트루-홀 구조, 바람직하게는 힙-인트루-홀 구조를 통해 상호 결합되어 삼중 특이적 항체를 형성할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 삼중 특이적 항체는 상기 제1 융합 단백질의 I에 힙 변형을 포함하고, 상기 제3 융합 단백질의 P에 홀 변형을 포함하거나; 또는 상기 제1 융합 단백질의 I에 홀 변형을 포함하고, 상기 제3 융합 단백질의 P에 힙 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 삼중 특이적 항체는 2+1 IgG 형태이며, 항-EGFR의 Fab 단편을 구성하는 중쇄와 경쇄를 링커로 연결시켜 단일 사슬로 발현하고, 항-MSLN 또는 항-CD3의 Fab 단편을 구성하는 중쇄와 경쇄를 링커로 연결시켜 각각의 단일 사슬로 발현하고, 단일 사슬인 항-MSLN 및 항-CD3의 Fab 단편을 펩타이드 링커로 연결하여, 상기 삼중 특이적 항체가 두 개의 단일 사슬로 구성되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명은 또 다른 측면에서, 상기 제1 융합 단백질, 상기 제2 융합 단백질, 상기 제3 융합 단백질, 상기 이중 특이적 항체 또는 상기 삼중 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물 및 이를 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체의 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

상기 약학적 조성물의 제형은 상술한 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조될 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다.

상기 약학적 조성물은 암 세포 또는 그들의 전이를 치료하거나 암의 성장을 억제하기 위해 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 암 종류, 환자의 연령,

체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 치료 회수, 투여 형태 및 경로 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 해당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

상기 약학적 조성물은 약리학적 또는 생리학적 성분과 함께 투여되거나 순차적으로 투여될 수 있으며, 또한 추가의 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 암은 기술분야에서 알려진 모든 암종을 제한 없이 포함할 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면에서, 치료가 필요한 개체의 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 상기 제1 융합 단백질, 상기 제2 융합 단백질, 상기 제3 융합 단백질, 상기 이중 특이적 항체 또는 상기 삼중 특이적 항체의 용도에 관한 것이다.

15 발명의 실시를 위한 형태

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

20 실시예 1. 항-MSLN/항-CD3 이중 특이적 항체 및 항-EGFR/항-MSLN/항-CD3 삼중 특이적 항체의 제조

실시예 1.1. MSLN, CD3, EGFR 특이적 항체의 제조

MSLN 특이적 항체를 선별하기 위해 재조합 인간 MSLN을 마우스에 면역한 후 B 세포를 추출하여 다양한 항체 유전자를 클로닝하였다. 이 유전자들을 파지 디스플레이를 이용하여 항체 라이브러리를 제작하고, 재조합 인간 MSLN에 결합하는 항체를 클로닝하고 최종적으로 항체 인간화를 통해 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 HMI323 클론을 얻었으며, 이를 코딩하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진다.

인간과 원숭이의 CD3에 특이적인 항체를 선별하기 위해 마우스 SP34 항체를

인간화하여 CD3에 다양한 친화도로 결합하는 항체를 선별하였고, 이들 중에서 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 A07, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 A15, 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 E15 클론을 얻었으며, 이들을 코딩하는 유전자는 각각 서열번호 22, 12, 24의 염기서열로 이루어진다.

- 5 EGFR에 특이적인 항체는 대장암 치료제인 Cetuximab을 사용하였으며, 이는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어졌으며, 이를 코딩하는 유전자는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진다.

실시에 1.2. 항체 발현을 위한 벡터의 트랜스펙션

실시에 1.2.1. 항체 발현 벡터의 제작

- 10 도 1과 같이, 항-MSLN 항체(HMI323); 및 CD3 Fab(A15)와 항-MSLN Fab(HMI323)를 연결한 항체를 공발현함에 따라 노-인트루-홀 구조를 갖는 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15)를 발현하기 위하여 다음과 같은 방법으로 벡터를 제작하였다.

- 항-MSLN(HMI323) 항체 서열(서열번호 4) DNA 또는 항-CD3 Fab(A15)와 항-MSLN Fab(HMI323)를 연결한 항체 서열 DNA(서열번호 2)를 pCI vector(Promega, Madison, WI, USA)에 In-fusion HD(Takara, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 각 벡터에 삽입 후 E.coli competent cell에 42℃에서 45초 동안 heat shock transformation을 하고, transformants를 carbenicillin이 포함된 LB plate에 도포하여 37℃ 배양기에서 14시간 배양하였다. 배양 후 플레이트 상에서 배양된 transformant 콜로니를 carbenicillin이 포함된 LB 배지 2 ml에 접종하여 37℃ 20 진탕 배양기에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양된 transformant에서 플라스미드를 추출하여 염기서열분석을 통해 벡터에 항체 발현 유전자가 클로닝되었음을 확인하였다.

- 도 2와 같이, 항-EGFR 항체(Cetuximab); 및 CD3 Fab(A15)와 항-MSLN Fab(HMI323)를 연결한 항체를 공발현함에 따라 노-인트루-홀 구조를 갖는 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)를 발현하기 위하여 다음과 같은 방법으로 벡터를 제작하였다.

항-EGFR (Cetuximab) 항체 서열 DNA(서열번호 6) 또는 항-CD3 Fab(A15)와

항-MSLN Fab(HMI323)를 연결한 항체 서열 DNA(서열번호 2)를 pCI vector(Promega, Madison, WI, USA)에 In-fusion HD(Takara, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 각각의 벡터에 삽입하였다. 그 다음, E.coli competent cell에 42℃에서 45초 동안 heat shock transformation을 하고, transformants 를 carbenicillin이 포함된 LB 플레이트에 도포하여 37℃ 배양기에서 14시간 동안 배양하였다. 배양 후, 플레이트 상에서 배양된 transformant 콜로니를 carbenicillin이 포함된 LB 배지 2 ml에 접종하여 37℃ 진탕 배양기에서 16시간 동안 배양하였다. 그 다음, 배양된 transformant에서 플라스미드를 추출하여 염기서열분석을 통해 벡터에 항체 발현 유전자가 클로닝되었음을 확인하였다.

10 실시예 1.2.2. 항체 발현 벡터의 숙주세포로의 트랜스펙션

24시간 전, 2.0×10^6 cells/ml 농도의 Expi293F™ 세포(Thermo Fisher Scientific)를 Expi293™ 발현 배지(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 37℃, 8% CO₂의 진탕 배양기(shaking incubator)에서 125 ± 10 rpm으로 계대배양하였다. 트랜스펙션 수행 시, 세포 수와 세포 생존율을 측정하여 95% 이상의 세포 생존율을 나타내는지 확인하였다. 500 ml 배양 플라스크에 5×10^8 개의 세포를 넣고, Expi293™ 발현 배지를 첨가하여 최종 부피를 170 ml로 조정하였다(200 ml 기준).

Opti-MEM I™ 배지(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 200 μ g의 항체 발현 벡터가 총 1,500 μ l가 되도록 섞어 주고, 실온에서 5분 동안 배양하였다. Opti-MEM I™ 배지를 이용하여, 540 μ l의 transfection reagent(ExpiFectamine™ 293 Reagent, Thermo Fisher Scientific)가 총 1,500 μ l가 되도록 섞어 주고 상온에서 5분 동안 배양하였다. 벡터와 transfection reagent가 각각 들어있는 Opti-MEM I™ 배지를 부드럽게 섞어주고 20분 동안 상온에서 반응시킨 후, Expi293F™ 세포가 포함된 플라스크에 넣어주었다.

37℃, 8% CO₂ 진탕 배양기에서 125 ± 10 rpm으로 16 ~ 20시간 동안 배양한 후, transfection enhancer I(ExpiFectamine™ 293 Enhancers I, Thermo Fisher Scientific)을 1 ml, transfection enhancer II(ExpiFectamine™ 293 Enhancers I, Thermo Fisher Scientific)를 10 ml 첨가하고, 5일 동안 배양하여 후보 항체들을 수득하였다.

실시에 2. 항-MSLN/항-CD3 이중 특이적 항체 및 항-EGFR/항-MSLN/항-CD3 삼중 특이적 항체의 정제

실시에 2.1. 친화성 크로마토그래피를 이용한 정제

단백질 A와 항체 사이의 특이적인 상호작용을 이용하여 항체만을 분리하기
 5 위한 실험으로, 배양액을 4000 rpm 에서 30분 동안 원심분리하고, 0.22 μ m bottle top filter로 여과하여 세포 debris가 제거된 상등액을 준비하였다. 그 후 Mabselect Prisma(GE healthcare) resin 5 ml이 packing된 column을 ÄKTA PrimePlus(GE healthcare)에 결합하여 사용하였다. 그 후에 Binding buffer(Pierce)로 세척한 다음, 상등액을 5 ml/min 속도로 로딩(loading)하였고,
 10 준비된 상등액을 모두 로딩한 후, 비-특이적 결합을 제거하기 위해 binding buffer(Pierce)를 이용하여 동일 속도로 세척하였다.

세척 후, IgG elution buffer(Pierce)를 흘려주며 UV 280nm 값이 상승하는 구간을 5 ml binding buffer(Pierce)가 들어있는 tube에 5 ml씩 분할 수집하여 eluate를 즉시 중화하였다. 중화된 eluate를 Zeba spin desalting column(Thermo
 15 Fisher Scientific)을 이용하여 PBS로 buffer를 치환하였다.

실시에 2.2. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용한 정제

크기에 의해 분리되는 정제 방법으로 분리된 항체 중 200 kDa의 목적 항체만을 분리하기 위한 실험으로, Superdex 200 SEC column(GE healthcare)을 ÄKTA pure 150L(GE healthcare) 장비에 결합하여 사용하였다. Buffer가 PBS로 치환된
 20 항체 시료를 sample loop에 충전하여 ÄKTA pure 150L(GE healthcare) 장비에 결합한 후, 1 ml/min 유속 조건 하에서 공정을 진행하고 peak pattern에 따라 elution sample을 1 ml 단위로 분할하여 수집하였다. 분할 수집한 eluate를 SDS-PAGE (NuPAGE®, Novex 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen)를 수행한 후에 코마씨 블루 염색 (Coomassie blue staining)하여 확인하고, 순도 높은 200 kDa의 목적 항체만을
 25 pooling하였다.

그 결과, 하기의 표 1에 기재된 바와 같은 결과를 얻었다.

[표 1]

구축물	수율(mg/L)	SEC 후 응집 (%)	단량체 (%)
HMI323/HMI323-A15	3.3	30	100

Cetuximab/HMI323-A15	3.2	30	100
----------------------	-----	----	-----

실시예 3. 항체의 MSLN, CD3 및 EGFR에 대한 친화도 측정

Octet system을 이용하여 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)의 인간 MSLN, 인간 CD3 및 인간 EGFR에 대한 친화도를 각각 측정하였다.

- 구체적으로, 재조합 인간 MSLN, CD3 및 EGFR을 1X kinetic buffer에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 제작하여 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 로 96 웰 플레이트에 처리하고, 처리된 MSLN, CD3, EGFR을 Aminopropylsilane(APS, Cat#18-5045, Fortebio) 센서에 고정시켰다. 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)를 10X kinetic buffer에 100, 50, 25, 12.5, 6.25 nM로 제작하여 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 의 농도로 처리하였다. 센서에 고정된 재조합 인간 MSLN(표 2), 인간 CD3(표 3) 및 인간 EGFR(표 4)와 항체 간의 상호작용을 분석하여 항원/항체간의 친화도를 산출하였고, 그 결과는 각각 하기의 표 2, 표 3, 표 4에 기재된 바와 같다.

[표 2]

항체	$k_a(1/\text{M} \cdot \text{s})$	$k_d(1/\text{s})$	KD(nM)
HMI323/HMI323-A15	9.94×10^4	7.74×10^{-4}	7.79
Cetuximab/HMI323-A15	6.20×10^4	1.36×10^{-3}	22.6

[표 3]

항체	$k_a(1/\text{M} \cdot \text{s})$	$k_d(1/\text{s})$	KD(nM)
HMI323/HMI323-A15	4.61×10^5	2.42×10^{-2}	52.6
Cetuximab/HMI323-A15	4.63×10^5	6.25×10^{-3}	13.5

[표 4]

항체	$k_a(1/\text{M} \cdot \text{s})$	$k_d(1/\text{s})$	KD(nM)
Cetuximab/HMI323-A15	2.08×10^6	2.54×10^{-3}	1.22

측정 결과, 상기 표 2 내지 표 4의 결과와 같이 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)가 인간 MSLN, 인간 CD3 및 인간 EGFR에 대하여 우수한 친화도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 4. 항체의 MSLN, EGFR 및 CD3 발현 세포에 대한 친화도 분석

- 유세포분석기를 이용하여 특정 세포주에서 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)가 친화도를 나타내는지 확인하였다.

구체적으로, MSLN 및 EGFR이 과발현된 H226 암 세포주(ATCC®, CRL-5826™), MSLN 및 EGFR이 과발현된 AsPC-1 암 세포주(ATCC®, CRL-1682™), 및 CD3가 발현되어 있는 Jurkat E6-1 T 세포주(ATCC®, TIB-152™)의 3종류 세포를 각각 100 μ l FACS buffer(2% FBS/sheath buffer)에 0.5×10^6 cells 농도로 첨가한 후, 1차 항체(HMI323/HMI323-A15 또는 Cetuximab/HMI323-A15)를 튜브당 1 μ g씩 처리한 뒤 1시간 30분 동안 빛을 차단하고 4℃에서 배양하였다. 이후, 200 μ l FACS buffer를 넣어주고 4℃에서 2,000 rpm으로 3분 동안 원심분리한 다음 상등액을 제거하였다.

다음으로, 1차 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 형광색소 표지된 2차 항체(PE labeled anti-human IgG)를 100 μ l의 FACS buffer에 0.2 μ g씩 처리한 뒤 30분 동안 빛을 차단하고 4℃에서 배양하였다. 이후, 200 μ l FACS buffer를 넣어주고 4℃에서 2,000 rpm으로 3분 동안 원심분리한 후에 상등액을 제거하여 시료를 수득하였다.

시료를 200 μ l의 BD Cytotfix™를 넣어주고 세포를 현탁시켜 BD LSR Fortessa™로 분석하였으며, 특정 세포 결합 친화도에 대한 EC₅₀ 값은 하기의 표 5에 기재된 바와 같다.

[표 5]

Cell line	HMI323/HMI323-A15 (nM)	Cetuximab/HMI323-A15 (nM)
H226	6.2	1.2
AsPC-1	4.7	0.48
Jurkat	58	113

분석 결과, 도 7 내지 도 9에 나타난 바와 같이, 3종류의 세포주에 대하여 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15) 모두 결합하는 것을 확인할 수 있었다. Irrelevant control로 사용하는 음성 대조군 항체에 대해서는 3종의 세포 모두 결합하지 않았다.

실시예 5. PBMC의 존재 하에서 항체의 종양 세포 사멸 효능 평가

실시예 5.1. 타겟 세포주 구축

MSLN+ 종양 세포 2종(H226, AsPC-1)에 IncuCyte® NucLight Red Lentivirus Reagent(EF-1 Alpha Promoter, Puromycin selection)를 사용하여 형질유도(transduction)하고 puromycin을 처리하여, 최종적으로 종양 세포주에

NucLight Red가 형질유도된 타겟 세포주들을 구축하였다.

실시예 5.2. 타겟 세포주 준비

1×Trypsin-EDTA 용액으로 세포들을 수확(harvest)하고 1,200 rpm으로 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 이후, 상등액을 제거하고 cRPMI(RPMI, A10491-01+10% FBS+55 μ M β -ME)에 재현탁한 뒤 세포 수를 정량하였다. 각 세포주 현탁액을 준비하여 96-웰 플레이트에 10,000 cells/웰씩 넣고, 플레이트들을 37℃의 CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하여 타겟 세포주를 준비하였다.

실시예 5.3. 말초 혈액 단핵 세포 준비

냉동보존된(Cryopreserved) 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 37℃ 수조에서 신속하게 녹인 후, 50 ml 코니컬 튜브(conical tube)로 옮겨 흔들어주면서 해동 배지(thawing media)(RPMI, 11875-093+10% FBS+55 μ M β -ME)를 한 방울씩 점적하여 섞어 주었다. 그 다음 1,200 rpm으로 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 cRPMI에 재현탁한 뒤 세포 수를 정량하였다.

실시예 5.4. 말초 혈액 단핵 세포 및 항체의 플레이팅

타겟 세포를 웰에 플레이팅하고, 24시간 후에 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15) 각각을 cRPMI로 희석한 후 20 nM에서부터 1/5씩 희석하여(농도범위 0.26 pM ~ 20 nM) 처리하였다. 그 다음, PBMC : 타겟 세포 = 20 : 1 또는 10 : 1 비율로 준비하여 cRPMI에 현탁한 후 웰에 넣어 주었다.

실시예 5.5. IncuCyteS3를 이용한 실시간 세포 측정 및 분석

37℃의 CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하면서 IncuCyteS3(Essenbio)를 이용하여 10× 배율에서 24시간 그리고 48시간에 bright field, red fluorescence를 측정하였다. MSLN 발현 종양 세포에 대한 PBMC 매개된 항체의 세포 사멸에 대한 IC₅₀ 값은 하기의 표 6에 기재된 바와 같고, MSLN 발현 종양 세포에 대한 PBMC 매개된 항체의 세포 사멸에 대한 최대 효과(%)는 하기의 표 7에 기재된 바와 같다.

[표 6]

PBMC: 타겟세포	시간	암세포주	IC ₅₀ 값(pM)	
			HMI323/HMI323-A15	Cetuximab/HMI323-A15
10:1	24hr	H226	84.38	14.93

		AsPC-1	405.8	3.845
10:1	48hr	H226	50.31	8.913
		AsPC-1	143.6	1.351
20:1	48hr	H226	15.32	3.918
		AsPC-1	30.36	1.374

[표 7]

PBMC: 타겟세포	시간	암세포주	최대 사멸효과(%)	
			HMI323/HMI323-A15	Cetuximab/HMI323-A15
10:1	24hr	H226	56.57	49.67
		AsPC-1	38.3	43.8
10:1	48hr	H226	90.66	92
		AsPC-1	74.62	80.99
20:1	48hr	H226	93.46	94.54
		AsPC-1	84.24	81.29

평가 결과, 도 10 내지 도 15에 나타난 바와 같이, MSLN 및 EGFR을 발현하는 2종의 암세포들(H226, AsPC-1)에 대한 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)의 세포 사멸 효과가 PBMC : 타겟 세포 = 5 20 : 1 또는 10 : 1 조건에서 용량 의존적으로(dose dependent) 나타나는 것을 확인하였다. 또한, Irrelevant Ab와 CD3 항체를 연결한 이중 특이적 항체(Irrelevant/CD3)는 세포 사멸을 유도하지 않았다.

실시에 6. T 세포의 존재 하에서 항체의 MSLN+ 종양 세포 사멸 효능 평가

실시에 6.1. 타겟 세포주 구축

10 MSLN+ 종양 세포 2종(H226, AsPC-1)에 IncuCyte® NucLight Red Lentivirus Reagent(EF-1 Alpha Promoter, Puromycin selection)를 사용하여 형질유도(transduction)하고 puromycin을 처리하여, 최종적으로 종양 세포주에 NucLight Red가 형질유도된 타겟 세포주들을 구축하였다.

실시에 6.2. 타겟 세포주 준비

15 1×Trypsin-EDTA 용액으로 세포들을 수확(harvest)하고 1,200 rpm으로 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 이후, 상등액을 제거하고 cRPMI(RPMI, A10491-01+10% FBS+55 μM β-ME)에 재현탁한 뒤 세포 수를 정량하였다. 각 세포주 현탁액을 준비하여 96-웰 플레이트에 10,000 cells/well씩 넣고, 플레이트들을 37℃의 CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하여 타겟 세포주를 준비하였다.

20 실시에 6.3. 증식된 T 세포의 준비

냉동보존된(Cryopreserved) 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 37℃ 수조에서 신속하게 녹인 후, 50 ml 코니컬 튜브(conical tube)로 옮겨 흔들어주면서 해동 배지(thawing media)(RPMI, 11875-093+10% FBS+55 μ M β -ME)를 한 방울씩 점적하여 섞어 주었다. 그 다음 1,200 rpm으로 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을
 5 제거하고 MACS 배지(PBS+0.5%FBS+2mM EDTA)에 현탁하였다. 세포 수에 맞게 CD3 microbeads를 넣어 4℃에서 15분 동안 staining 하고, LS column을 이용하여 CD3 T 세포만 분리하였다. 분리한 CD3 T 세포를 X-VIVO에 현탁한 뒤 α CD3/28 Dynabeads®, IL-2(200 U/ml, Proleukin®), human plasma(5%)를 넣어 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양 시작 후 4일, 7일 후에 세포 수를 측정하여 세포 농도가 1×10^6 cells/ml가
 10 되도록 X-VIVO와 IL-2, human plasma를 추가로 넣어주었다.

실시예 6.4. T 세포 및 항체 플레이트팅

타겟 세포를 웰에 플레이트팅하고, 24시간 후에 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15) 각각을 cRPMI로 희석한 후 20 nM에서부터 1/5씩 희석하여(농도범위 0.26 pM ~ 20 nM)
 15 처리하였다. 그 다음, 증식된 T 세포를 최종적으로 T 세포 : 타겟 세포 = 10 : 1 또는 5 : 1 비율로 준비하여 cRPMI에 현탁 후 웰에 넣어 주었다.

실시예 6.5. IncuCyteS3를 이용한 실시간 세포 측정 및 분석

37℃의 CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하면서 IncuCyteS3(Essenbio)를 이용하여 10× 배율에서 24시간 그리고 48시간에 bright field, red fluorescence를
 20 측정하였다. MSLN 발현 종양 세포에 대한 T 세포 매개된 항체의 세포 사멸에 대한 IC₅₀ 값은 하기의 표 8에 기재된 바와 같고, MSLN 발현 종양 세포의 T 세포 매개된 항체의 세포 사멸에 대한 최대 효과(%)는 하기의 표 9에 기재된 바와 같다.

[표 8]

T 세포: 타겟세포	시간	IC ₅₀ 값	
		HMI323/HMI323-A15	Cetuximab/HMI323-A15
5:1	24hr	8.57	0.86
	48hr	9.31	0.91
10:1	24hr	5.57	0.50
	48hr	5.78	0.51

[표 9]

T 세포:	시간	최대 사멸효과 (%)
-------	----	-------------

타겟세포		HMI323/HMI323-A15	Cetuximab/HMI323-A15
5:1	24hr	96.33	95.28
	48hr	99.40	99.82
10:1	24hr	97.71	99.07
	48hr	99.52	99.95

평가 결과, 도 16 내지 도 19에 나타난 바와 같이, MSLN 및 EGFR을 발현하는 2종의 암세포들(H226, AsPC-1)에 대한 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)의 세포 사멸 효과가 T 세포 : 타겟 세포 = 10 : 1 또는 5 : 1 조건에서 용량 의존적으로 나타나는 것을 확인하였다. 또한, Irrelevant Ab와 CD3 항체를 연결한 이중 특이적 항체(Irrelevant/CD3)는 세포 사멸을 유도하지 않았다.

실시예 7. 항체의 마우스 종양발달 억제 효능 분석

T-세포 engager 항체로서 개발 중인 이중 특이적 항체(HMI323/HMI323-A15) 및 삼중 특이적 항체(Cetuximab/HMI323-A15)를 종양 이식 마우스 모델에 투여하여 종양 발달 억제 효과를 알아보려고 하였다.

실시예 7.1. 세포주 이종 이식 모델의 확립

동물실에 입고된 마우스는 실험 시작 전 약 일주일 동안 적응 기간을 두었다. H226 종양 세포주(1×10^7 /200 μ L PBS) 또는 AsPC-1 종양 세포주(5×10^6 /200 μ L PBS)를 마우스 겨드랑이(axillary fossa)에 피하 주사하였다. 종양 세포 주사 후 5일째, human purified and activated T 세포를 T 세포 : 종양 세포 = 2 : 1 비율로 복강 주사하였다. 종양 세포 주사 후 7일째, 그룹당 5마리씩 총 4개의 그룹으로 나눈 후 통계 분석하여 각 그룹 간 종양 크기의 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

실시예 7.2. 항체 투여

PBS 또는 항체(HMI323/HMI323-A15, Cetuximab/HMI323-A15)를 T 세포를 주사한지 이틀 후부터 주 2회씩 3 mg/kg 농도로 총 4회 복강 투여하였다.

실시예 7.3. 종양 크기 측정

Grouping 한 날부터 종료 시점까지 주 2회씩 종양의 크기(종양의 부피 (mm^3) = 단축 x 장축 x 높이 x 0.5)를 측정하였다. 단축, 장축 및 높이의 길이는 동일한 시험 담당자가 자를 이용하여 측정하였다.

실시예 7.4. 종양 발달율(RTV%), 상대 종양 발달율(T/C%), 종양 발달

억제율(억제 효과)의 계산

종양 발달율(relative tumor volume, RTV%)은 $V1/V0$ 방식으로 계산하였다. V1는 실험 효과 측정시점에서의 부피를 의미하며, V0는 실험 시작 시점에서의 부피를 의미한다. 각 그룹의 상대 종양 발달율(T/C%)은 측정 시점에서의 각 그룹의 평균 종양 발달율을 PBS 그룹의 평균 종양 발달율로 나눈 후 100을 곱한 값이며, 발달 억제율(억제 효과)는 100-상대 종양 발달율이다. 통계 분석은 실험의 종류에 따라 One-way ANOVA, Two-way ANOVA를 사용하였으며, p value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

실시예 7.5. 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

종양 발달시킨 마우스에 항체(HMI323/HMI323-A15, Cetuximab/HMI323-A15) 처리 일주일 후, 종양 샘플을 적출하여 포르말린으로 고정시켰다. 그 후 파라핀 침투 및 포매 과정을 거친 다음, 박절기(microtome)을 이용하여 파라핀 절편을 얻었다. 파라핀 절편은 탈 파라핀, 함수, 수세 과정을 거친 후, 인간 CD3(anti-CD3, Abcam) 혹은 인간 CD8(anti-CD8, Abcam)으로 염색하였다. 조직 절편은 Mayer's hematoxylin(Dako)으로 대비염색(counterstaining)을 하였고, Olympus BX51 현미경으로 관찰하였다.

실시예 7.6. 실험 종료 및 결과

마우스를 경추 탈골 또는 CO₂로 안락사 시켰다. 그 결과, 메소텔린 과발현 폐 선암종(lung adenocarcinoma) 세포주인 H226을 이종 이식한 마우스 모델에서 Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15 항체를 3 mg/kg 농도로 총 4회 복강 투여한 결과, PBS 투여 그룹과 비교하여 항체 투여 그룹 모두에서 뛰어난 종양 발달 억제 효능을 나타내었다(도 20 및 도 21).

면역조직화학 염색을 통하여 PBS 그룹에 비해 항체(Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15) 처리 군에서 종양 조직 내에 면역 T 세포(진한 색으로 염색됨)의 침투가 많이 되었음을 확인하였다(도 22). 하기의 표 10에 기재한 바와 같이, 메소텔린, EGFR 및 CD3와 결합하는 항체인 Cetuximab/HMI323-A15의 경우 종양 이식 후 20일째부터, 메소텔린 및 CD3와 결합하는 항체인 HMI323/HMI323-A15의 경우 종양 이식 후 25일째부터 100% 종양 발달 억제 효과를 나타내었다.

[표 10]

H226 group	Inhibition rate (median)						
	Day 7	Day 10	Day 13	Day17	Day 20	Day 25	Day 28
HMI323/HMI323-A15	0%	-53%	-35%	74%	80%	100%	100%
Cetuximab/HMI323-A15	0%	-119%	-40%	86%	100%	100%	100%

또한, H226과 비교하여 상대적으로 메소텔린의 발현이 낮은 pancreatic cancer 세포주인 AsPC-1을 이종 이식한 마우스 모델에서 마찬가지로 Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15 항체를 3 mg/kg 농도로 총 4회 복강 투여한 결과, PBS 투여 그룹과 비교하여 항체 투여 그룹 모두에서 뛰어난 종양 발달 억제 효능을 나타내었다(도 23 및 도 24).

면역조직화학 염색에서도 PBS 그룹에 비해 항체(Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15) 처리 군에서 종양 조직 내로 면역 T 세포(진한 색으로 염색됨)의 침투가 많이 되었음을 확인하였다(도 25). 하기의 표 11에 기재한 바와 같이, 메소텔린, EGFR 및 CD3와 결합하는 항체인 Cetuximab/HMI323-A15의 경우 종양 이식 후 20일째부터, 메소텔린 및 CD3와 결합하는 항체인 HMI323/HMI323-A15의 경우 종양 이식 후 28일째부터 100% 종양 발달 억제 효과를 나타내었다.

[표 11]

AsPC-1 groups	Inhibition rate (median)							
	Day 7	Day 10	Day 13	Day17	Day 20	Day 25	Day 28	Day 32
HMI323/HMI323-A15	0%	23%	58%	94%	97%	97%	100%	100%
Cetuximab/HMI323-A15	0%	26%	57%	95%	100%	100%	100%	100%

실시예 8. 항체의 마우스 PK 분석

T-세포 engager 항체로서 개발 중인 Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15의 약물동력학(pharmacokinetics;PK) 자료 획득을 위하여 마우스 혈청 내 항체의 PK parameters를 분석하였다.

실시예 8.1. 검액 (마우스 혈청)의 확보

Cetuximab/HMI323-A15 또는 HMI323/HMI323-A15 항체를 3 mg/kg의 농도로 마우스의 꼬리 미정맥에 주입하였다. 채혈 시간은 항체 주입 후 5 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 168 h, 240 h, 336 h, 504 h, 672 h에서 안와채혈하였다. 각 그룹당 3마리 이상에서 마리당 100 μ L씩 채혈하였다. 혈액은 상온에서

약 20~30 분 동안 응고시킨 후에 10,000 rpm 에서 10 분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리하였다.

실시예 8.2. ELISA 분석법

플레이트에 항-인간 Fab(50 ng/100 μ L/웰)를 넣고 4°C에서 밤새도록
 5 반응시킨 후 남아 있는 용액을 완전히 제거하였다. 1% BSA/PBS 용액을 200 μ L/웰로 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 후 남아 있는 용액을 완전히 제거하였다. 표준액(Standard antibody)은 1% serum/1% BSA/PBS 용액을 이용하여 1 μ g/mL 로 맞춘 후 1/2 씩 희석하여 준비하였다. 검액은 1% BSA/PBS 용액을 이용하여 100 배 희석하여 준비하였다.

10 준비된 표준액 및 검액을 한 농도당 2 개 웰에 각각 100 μ L 씩 분주하여 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 각 웰 당 PBST(0.05% Tween 20) 용액을 300 μ L 씩 분주하여 총 3 회 세척하였다. 항-인간 Fc-HRP 를 1% BSA/PBST 용액에 5000 배 희석한 후 각 웰에 100 μ L 씩 분주하여 상온에서 한 시간 반응시켰다.

15 반응이 끝나면 각 웰 당 PBST(0.05% Tween 20) 용액을 300 μ L 씩 분주하여 총 3 회 세척하였다. TMB peroxidase substrate 용액을 실험 전 실온에 맞춘 후, 각 웰에 100 μ L 씩 분주하여 상온에서 30 분 동안 반응시켰다. TMB stop solution 을 각 웰에 100 μ L 씩 분주하여 잘 섞이도록 가볍게 흔들어 준 후, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

메소텔린, EGFR 및 CD3 와 결합하는 항체인 Cetuximab/HMI323-A15 또는
 20 메소텔린 및 CD3 와 결합하는 항체인 HMI323/HMI323-A15 를 3 mg/kg 의 용량으로 누드 마우스의 꼬리 정맥에 주입한 후 5 min, 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h, 240 h, 336 h, 504 h, 672 h 까지 채혈하여 마우스 혈청 내 항체의 농도를 ELISA 기법으로 정량한 결과를 도 26 및 도 27 에 나타내었다.

ELISA 결과를 토대로 PK 파라미터를 분석한 결과, Cetuximab/HMI323-A15
 25 항체의 반감기는 약 207.94 시간으로 확인되었고, HMI323/HMI323-A15 항체의 반감기는 약 202.58 시간으로 확인되었다(표 12 및 표 13). 이는 일반적인 IgG 형태의 이중 특이적 항체 반감기 범위에 해당한다. 또한, 곡선 아래의 면적(area

under the curve, AUC)의 외삽법 (Extrapolation) 수치가 20% 이하이므로 산출된 PK 파라미터의 신뢰성이 확보되었다.

Cetuximab/HMI323-A15의 PK 파라미터 결과는 하기의 표 12에 기재된 바와 같고, HMI323/HMI323-A15의 PK 파라미터의 결과는 표 13에 기재된 바와 같다.

5 [표 12]

Parameter (units)	Parameter value		
Material	Cetuximab/HMI323-A15		
Dose (mg/kg)	3		
T _{1/2} (h)	207.94	±	23.91
C _{max} (µg/mL)	41.40	±	6.87
AUC _{0-t} (µg.h/mL)	4512.59	±	601.50
AUC _{0-inf} (µg.h/mL)	5071.93	±	891.25
AUC_%Extrap_obs (%)	10.48	±	5.43
CL (mL/hr/kg)	0.61	±	0.11
MRT (hr)	223.19	±	11.76
Vss (mL/kg)	180.08	±	13.15

[표 13]

Parameter (units)	Parameter value		
Material	HMI323/HMI323-A15		
Dose (mg/kg)	3		
T _{1/2} (h)	202.58	±	84.68
C _{max} (µg/mL)	45.46	±	5.52
AUC _{0-t} (µg.h/mL)	4568.32	±	821.75
AUC _{0-inf} (µg.h/mL)	5270.89	±	1719.18
AUC_%Extrap_obs (%)	10.65	±	11.09
CL (mL/hr/kg)	0.61	±	0.17
MRT (hr)	210.51	±	30.99
Vss (mL/kg)	166.09	±	19.28

청구범위

[청구항 1]

하기 구조식 1의 융합 단백질로서,

[구조식 1]

5 N' -A-B-L1-C-D-L2-E-F-L3-G-H-L4-I-C'

상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,

상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,

상기 A는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서
서열번호 25의 경쇄 CDR1, 서열번호 26의 경쇄 CDR2 및 서열번호 27의 경쇄 CDR3를
10 포함하고,

상기 B는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 C는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서
서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 29의 중쇄 CDR2 및 서열번호 30의 중쇄 CDR3를
포함하고,

15 상기 D는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,

상기 E는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호
31의 경쇄 CDR1, 서열번호 32의 경쇄 CDR2 및 서열번호 33의 경쇄 CDR3를 포함하고,

상기 F는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 G는 CD3에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호
20 34의 중쇄 CDR1, 서열번호 35의 중쇄 CDR2 및 서열번호 36의 중쇄 CDR3를 포함하고,

상기 H는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,

상기 I는 Fc 영역 또는 이의 변이체이고,

상기 L1, L2, L3 및 L4는 각각 펩타이드 링커인 제1 융합 단백질.

[청구항 2]

25 제1항에 있어서,

상기 L1, L2, L3 및 L4는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진
펩타이드 링커인, 제1 융합 단백질.

[청구항 3]

제1항에 있어서,

상기 L1 및 L3는 각각 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제1 융합 단백질.

[청구항 4]

5 제1항에 있어서,

상기 L2는 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제1 융합 단백질.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

10 상기 L4는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제1 융합 단백질.

[청구항 6]

제1항에 있어서,

15 상기 제1 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 제1 융합 단백질

[청구항 7]

하기 구조식 2의 융합 단백질로서,

[구조식 2]

$N' - A - B - L1 - C - D - L5 - J - C'$

20 상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,

상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,

상기 A는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 25의 경쇄 CDR1, 서열번호 26의 경쇄 CDR2 및 서열번호 27의 경쇄 CDR3를 포함하고,

25 상기 B는 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 C는 메소텔린에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 28의 중쇄 CDR1, 서열번호 29의 중쇄 CDR2 및 서열번호 30의 중쇄 CDR3를 포함하고,

상기 D는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며,
 상기 J는 Fc 영역 또는 이의 단편이고,
 상기 L1 및 L5는 각각 펩타이드 링커인 제2 융합 단백질.

[청구항 8]

- 5 제7항에 있어서,
 상기 L1 및 L5는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커인, 제2 융합 단백질.

[청구항 9]

- 제7항에 있어서,
 10 상기 L1은 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제2 융합 단백질.

[청구항 10]

- 제7항에 있어서,
 상기 L5는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제2
 15 융합 단백질.

[청구항 11]

- 제7항에 있어서,
 상기 제2 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 제2
 융합 단백질.

20 [청구항 12]

하기 구조식 3의 융합 단백질로서,

[구조식 3]

$N' - K - M - L6 - N - O - L7 - P - C'$

- 상기 N' 는 융합 단백질의 N-말단이고,
 25 상기 C' 는 융합 단백질의 C-말단이며,
 상기 K는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변 부위로서 서열번호 37의 경쇄 CDR1, 서열번호 38의 경쇄 CDR2 및 서열번호 39의 경쇄 CDR3를 포함하고,
 상기 M은 항체의 경쇄 불변 부위이며,

상기 N은 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 부위로서 서열번호 40의 중쇄 CDR1, 서열번호 41의 중쇄 CDR2 및 서열번호 42의 중쇄 CDR3를 포함하고, 상기 O는 항체의 중쇄 불변 부위의 CH1 영역이며, 상기 P는 Fc 영역 또는 이의 단편이고, 5 상기 L6 및 L7는 각각 펩타이드 링커인 제3 융합 단백질.

[청구항 13]

제12항에 있어서, 상기 L6 및 L7는 각각 1 내지 50개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커인, 제3 융합 단백질.

10 [청구항 14]

제12항에 있어서, 상기 L6는 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제3 융합 단백질.

[청구항 15]

15 제12항에 있어서, 상기 L7는 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 링커인, 제3 융합 단백질.

[청구항 16]

20 제12항에 있어서, 상기 제3 융합 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 제3 융합 단백질.

[청구항 17]

제1항의 제1 융합 단백질 및 제7항의 제2 융합 단백질을 포함하는 이중 특이적 항체.

25 [청구항 18]

제17항에 있어서, 상기 제1 융합 단백질의 I에 늑(knob) 변형을 포함하고, 상기 제2 융합 단백질의 J에 홀(hole) 변형을 포함하거나; 또는

상기 제1 융합 단백질의 I에 홀 변형을 포함하고, 상기 제2 융합 단백질의 J에 늑 변형을 포함하는 것인, 이중 특이적 항체.

[청구항 19]

제1항의 제1 융합 단백질 및 제12항의 제3 융합 단백질을 포함하는 삼중 특이적 항체.

[청구항 20]

제19항에 있어서,

상기 제1 융합 단백질의 I에 늑 변형을 포함하고, 상기 제3 융합 단백질의 P에 홀 변형을 포함하거나; 또는

상기 제1 융합 단백질의 I에 홀 변형을 포함하고, 상기 제3 융합 단백질의 P에 늑 변형을 포함하는 것인, 삼중 특이적 항체.

[청구항 21]

제1항의 제1 융합 단백질, 제7항의 제2 융합 단백질, 제12항의 제3 융합 단백질, 제17항의 이중 특이적 항체 또는 제19항의 삼중 특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

[청구항 22]

치료가 필요한 개체의 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 제1항의 제1 융합 단백질, 제7항의 제2 융합 단백질, 제12항의 제3 융합 단백질, 제17항의 이중 특이적 항체 또는 제19항의 삼중 특이적 항체의 용도.

[청구항 23]

제21항의 약학적 조성물을 치료 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체의 암을 치료하는 방법.