



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2025-0075621  
(43) 공개일자 2025년05월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)  
C07K 16/32 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2878 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7012739
- (22) 출원일자(국제) 2023년09월19일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2025년04월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2023/119761
- (87) 국제공개번호 WO 2024/061223  
국제공개일자 2024년03월28일
- (30) 우선권주장  
202211142594.0 2022년09월20일 중국(CN)

- (71) 출원인  
바이오세우스 인크.  
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완  
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비
- (72) 발명자  
루오, 이  
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완  
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비  
첸, 리안디  
중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완  
타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한성

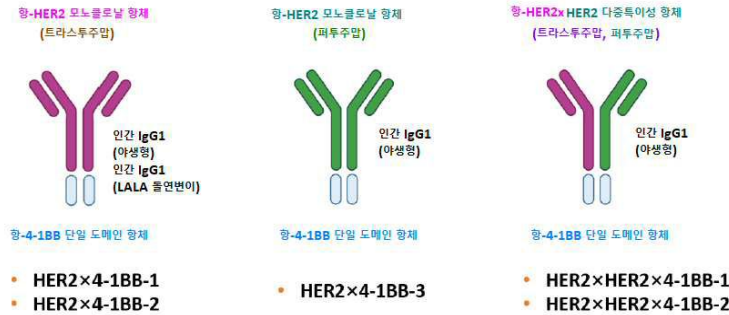
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 항체 및 종양 저항에서의 이의 용도

(57) 요약

항체 및 종양을 저항하는 데 있어서의 이의 용도가 제공된다. 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 다중특이성 항체가 제공된다. 항체는 항암 활성을 개선하고 간 독성을 낮춘다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61P 35/04* (2018.01)

*C07K 16/32* (2013.01)

*G01N 33/574* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/31* (2013.01)

*C07K 2317/52* (2013.01)

*C07K 2317/55* (2013.01)

*C07K 2317/569* (2013.01)

(72) 발명자

**황, 웨이핑**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**먀오, 샤오니우**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**옌, 야오**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**왕, 차오**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

(a) 서열 번호 43에 제시된 서열, 또는 서열 번호 43에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR1.

(b) 서열 번호 44에 제시된 서열, 또는 서열 번호 44에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR2; 및

(c) 서열 번호 45에 제시된 서열, 또는 서열 번호 45에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR3을 포함하고;

바람직하게는, 치환은 보존적 치환이고;

바람직하게는, 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 43에 제시된 CDR1, 서열 번호 44에 제시된 CDR2 및 서열 번호 45에 제시된 CDR3을 포함하는, 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 단일 도메인 항체는 다음:

(i) 서열 번호 7에 제시된 서열;

(ii) 서열 번호 7에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열; 또는

(iii) 서열 번호 7에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

바람직하게는, 치환은 보존적 치환인, 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는, 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드 작제물(polypeptide construct)로서,

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 N-말단 및/또는 C-말단(예를 들어, C-말단)에 연결되고; 바람직하게는, 펩타이드 링커는  $(G_m X_n)_l G_m'$ 로 나타내어지는 구조를 갖고, 여기서  $m$ ,  $m'$ ,  $n$  및  $l$ 은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고,  $X$ 는 A 및 S 중에서 선택되고; 바람직하게는,  $m$ 은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고,  $n$ 은 1 및 2 중에서 선택되고,  $l$ 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고,  $m'$ 는 0 및 1 중에서 선택되고,  $X$ 는 A 및 S 중에서 선택되고; 바람직하게는, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖고; 바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG의 Fc 도메인(예를 들어 CH2 및 CH3을 포함하는 IgG1의 Fc 도메인)이고;

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열 번호 19에 제시된 서열, 또는 이와 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이와 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 포함하고;

바람직하게는, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열 번호 19 또는 20에 제시된 서열을 포함하고;

바람직하게는, 폴리펩타이드 구조는 서열 번호 31 또는 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된, 폴리펩타이드 작제물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 따른 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물을 포함하는 다중특이성 항체로서,

바람직하게는 다중특이성 항체는 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있고, 추가적으로 하나 이상의 다른 표적에 특이적으로 결합할 수 있으며;

바람직하게는 표적은 종양 항원이고;

바람직하게는, 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD40, CD49, CD52, CD56, CD74, CD80, CD95, CD138, CS1/SLAMF7, KiR, Thy-1, Ly-6, Fas, APO-1, EGFR, HER2, CXCR4, HLA, GM1 및 DRD로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상인, 다중특이성 항체.

#### 청구항 5

4-1BB에 특이적인 제1 항원 결합 도메인 및 HER2에 특이적인 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 다중특이성 항체로서,

제1 항원 결합 도메인은 제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고;

제2 항원 결합 도메인은 항-HER2 항체의 중쇄 가변 영역의 적어도 하나의 CDR 및/또는 항-HER2 항체의 경쇄 가변 영역의 적어도 하나의 CDR을 포함하고;

바람직하게는, 제2 항원 결합 도메인은 항-HER2 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 항-HER2 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하고;

바람직하게는, 항-HER2 항체는 트라스투주맵, 퍼투주맵 및 이의 변이체로 이루어진 군에서 선택되고;

변이체는 이것이 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된, 다중특이성 항체.

#### 청구항 6

4-1BB에 특이적인 제1 항원 결합 도메인과 HER2에 특이적인 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 다중특이성 항체로서,

제1 항원 결합 도메인은 VHH이고; 제2 항원 결합 도메인은 Fab이며,

다중특이성 항체는 다음을 포함하고:

(1) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 I-A.

및,

(2) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역과 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 I-B; - 바람직하게는, 펩타이드 사슬 I-B는 N-말단에서 C-말단으로 제2 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역과 제1 항원 결합 도메인을 포함함 -;

바람직하게는, 펩타이드 사슬 I-A의 CL은 펩타이드 사슬 I-B의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있고;

바람직하게는, 다중특이성 항체는 2개의 펩타이드 사슬 I-A와 2개의 펩타이드 사슬 I-B를 포함하고; 바람직하게는, 두 펩타이드 사슬 I-B의 중쇄 불변 영역은 이량체를 형성하고;

바람직하게는, 도메인은 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결되고; 바람직하게는, 펩타이드 링커는  $(G_mX_n)_lG_m$ 로 나타내어지는 구조를 가지며, 여기서 m, m', n 및 l은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택되며; 바람직하게는, m은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고, n은 1 및

2 중에서 선택되고, l은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, m'는 0 및 1 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택되며; 바람직하게는, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 다중특이성 항체.

### 청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 다음 항목 중 하나 이상을 특징으로 하고:

- (i) 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (ii) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (iii) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 I-A는 서열 번호 22, 24 또는 26에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 I-B는 서열 번호 21, 23 또는 25에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된, 다중특이성 항체.

### 청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, HER2에 특이적인 제3 항원 결합 도메인을 추가로 포함하고;

바람직하게는, 제1 항원 결합 도메인은 VHH이고; 제2 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 Fab이며, 다중특이성 항체는 다음을 포함하고:

- (1) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 II-A.
- (2) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역 및 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 II-B; - 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B는 N-말단에서 C-말단으로 제2 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역, 및 제1 항원 결합 도메인을 포함함 -;
- (3) 제3 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 II-C; 및,
- (4) 제3 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역 및 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 II-D; - 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-D는 N-말단에서 C-말단으로 제3 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역과 제1 항원 결합 도메인을 포함함 -;

바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-A의 CL은 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있고; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-C의 CL은 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있고; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 1 내지 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

바람직하게는, 다중특이성 항체는 하나의 펩타이드 사슬 II-A, 하나의 펩타이드 사슬 II-B, 하나의 펩타이드 사슬 II-C, 하나의 펩타이드 사슬 II-D를 포함하고; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B 및 II-D의 중쇄 불변 영역은 이량체를 형성하고;

바람직하게는, 도메인은 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결되고; 바람직하게는, 펩타이드 링커는  $(G_m X_n)_l G_m$ 로 나타내어지는 구조를 가지며, 여기서 m, m', n 및 l은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택되고; 바람직하게는, m은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고, n은 1 및 2 중에서 선택되고, l은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, m'는 0 및 1 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택되고; 바람직하게는, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는, 다중특이성 항체.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 다음 항목 중 하나 이상을 특징으로 하고:

- (i) 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (ii) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (iii) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (iv) 제3 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
  - (v) 제3 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-A는 서열 번호 28 또는 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B는 서열 번호 27 또는 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-C는 서열 번호 30 또는 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고;
- 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-D는 서열 번호 29 또는 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된, 다중특이성 항체.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 11**

제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

**청구항 12**

제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제11항에 따른 벡터를 포함하는 제조합 세포.

**청구항 13**

제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제11항에 따른 벡터 또는 제12항에 따른 제조합 세포 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 14**

종양을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제11항에 따른 벡터, 제12항에 따른 제조합 세포 또는 제13항에 따른 약학적 조성물의 용도로서,

바람직하게는 종양은 HER2를 과발현하고;

바람직하게는, 종양은 유방암, 결장암, 위암, 폐암(예를 들어, 편평세포 폐암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암), 복막암, 피부암, 편평세포 암종, 피부 또는 안구 흑색종, 직장암, 항문 근처 암, 식도암, 소장 종양, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간암, 위장관암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포 선종, 대장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 침샘 종양, 신장암, 자궁경부암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군

중에서 선택되고;

바람직하게는, 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양인, 용도.

**청구항 15**

종양 치료를 위해 사용되는, 제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제11항에 따른 벡터, 제12항에 따른 재조합 세포 또는 제13항에 따른 약학적 조성물로서,

바람직하게는, 종양은 HER2를 과발현하고;

바람직하게는, 종양은 유방암, 결장암, 위암, 폐암(예를 들어, 편평세포 폐암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 선암), 복막암, 피부암, 편평세포 암종, 피부 또는 안구 흑색종, 직장암, 항문 근처 암, 식도암, 소장 종양, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간암, 위장관암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포 선종, 대장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 침샘 종양, 신장암, 자궁경부암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군 중에서 선택되고;

바람직하게는, 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 폴리펩타이드 작제물, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 재조합 세포 또는 약학적 조성물.

**청구항 16**

종양 치료 방법으로서, 제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드, 제11항에 따른 벡터, 제12항에 따른 재조합 세포, 또는 제13항에 따른 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고;

바람직하게는, 종양은 HER2를 과발현하고;

바람직하게는, 종양은 유방암, 결장암, 위암, 폐암(예를 들어, 편평세포 폐암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 선암), 복막암, 피부암, 편평세포 암종, 피부 또는 안구 흑색종, 직장암, 항문 근처 암, 식도암, 소장 종양, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간암, 위장관암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포 선종, 대장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 침샘 종양, 신장암, 자궁경부암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군 중에서 선택되고;

바람직하게는, 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양인, 방법.

**청구항 17**

제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 및 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 상기 폴리펩타이드 작제물에 부착된 검출 가능한 라벨을 포함하는 접합체로서,

바람직하게는, 검출 가능한 라벨은 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 바이오틴으로 이루어진 군 중에서 선택되는, 접합체.

**청구항 18**

제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 또는 제17항에 따른 접합체를 포함하는 키트로서,

바람직하게는, 키트는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다아제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 바이오

틴과 같은 검출 가능한 라벨을 추가로 포함하는, 키트.

**청구항 19**

샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로서, 제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 또는 제17항에 따른 접합체를 사용하는 단계를 포함하고;

바람직하게는, 면역 블로팅, 효소 면역 측정법(예를 들어, ELISA), 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법 또는 방사 면역 측정법과 같은 면역학적 분석법이고;

바람직하게는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물을 사용하는 단계를 포함하고, 검출 가능한 라벨(예를 들어, 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학 발광제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 바이오틴)을 갖는 제2 항체를 사용하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물이 항원에 결합하는 것을 검출하는 단계를 추가로 포함하고;

바람직하게는, (1) 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; (2) 항원-항체 면역 복합체의 형성을 검출하거나 면역 복합체의 양을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 면역 복합체의 형성은 4-1BB의 존재 또는 4-1BB를 발현하는 세포를 나타내는, 방법.

**청구항 20**

샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 검출 시약의 제조에서의 제1항, 제2항, 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 제3항에 따른 폴리펩타이드 작제물, 또는 제17항에 따른 접합체의 용도로서,

바람직하게는, 검출 시약은 제19항에 따른 방법에 의해 샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하고;

바람직하게는, 샘플은 대상체(예를 들어, 포유동물, 바람직하게는 인간 또는 원숭이)로부터의 세포 샘플(예를 들어, 종양 세포)인, 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2022년 9월 20일에 출원된 CN 출원 번호 202211142594.0을 기초로 하며, 이를 우선권으로 주장한다. 상기 CN 출원의 개시 내용은 본 출원에 전체적으로 통합된다.

[0002] **기술 분야**

[0003] 본 출원은 생물치료 기술 분야, 특히 4-1BB 및 HER2를 표적으로 하는 항체 및 종양 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2/ErbB2/Neu)는 많은 고형 종양에서 과발현되는 ErbB 수용체 티로신 키나제 패밀리의 구성원으로, ErbB 패밀리의 다른 구성원과 동종이량체 또는 이종이량체를 형성하여 수용체의 세포질 도메인 내에서 티로신 잔기의 인산화를 유발함으로써 세포에서 여러 신호 경로를 활성화하고 암세포 증식과 종양 형성을 촉진할 수 있다<sup>[1]</sup>. 종양 치료에 사용되는 가장 초기의 표적 중 하나인 HER2를 표적으로 하는 치료제에는 모노클로날 항체(트라스투주맙 및 퍼투주맙과 같은 mAb), 티로신 키나제 억제제(네라티닙 및 라파티닙과 같은 TKI) 및 항체-약물 접합체(T-DM1과 같은 ADC) 등이 있다. 이러한 약물은 HER2 과발현 및/또는 증폭이 있는 유방암 또는 위암의 치료에 널리 사용되고 있다<sup>[2]</sup>. 이들 HER2 표적 치료제는 좋은 임상적 이점이 있음에도 불구하고 충족되지 않은 의학적 요구가 여전히 존재하며 재발 또는 전이성 질환이 있는 환자의 임상 효능을 더욱 개선하기 위해 새로운 약물을 지속적으로 개발해야 할 필요가 있다.

[0005] T 세포 공동 자극 수용체 TNFRSF9(4-1BB)는 TNF 수용체 패밀리의 구성원이며 주로 활성화된 T 세포에서 발현된다. 활성화되면 T 세포의 이펙터 활성과 기억 반응을 향상시킬 수 있다<sup>[3,4]</sup>. 4-1BB를 표적으로 하는 모노클로날

항체 약물인 우렐루맵은 T 세포 상의 4-1BB에 결합하고 활성화하여 치료 효과를 발휘한다. 불행히도, 우렐루맵의 임상 개발 중에 심각한 간 관련 독성이 관찰되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 더욱 우수한 효과와 높은 안전성을 갖춘 항암 약물을 개발하는 것은 본 분야에서 여전히 시급히 해결해야 할 문제이다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 본 출원은 4-1BB에 대해 높은 결합 활성을 갖는 단일 도메인 항체 및 이를 기반으로 개발된 4-1BB 및 HER2를 표적으로 하는 다중특이성 항체를 개시한다. 특히, 본 출원은 독특한 항종양 활성화와 강력한 면역 기억 효과를 갖는 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체를 개시한다. 항체는 트라스투주맵과 퍼투주맵으로 구성된 1+1 IgG1 유사 이종이량체 항체이고, 그 C-말단은 G4S 링커를 통해 항-4-1BB 단일 도메인 항체(sdAb)에 연결된다. 항체는 트라스투주맵과 퍼투주맵이 항종양 활성을 발휘하는 데 중요한 Fc 이펙터 기능을 유지한다. 또한, 항체는 간 독성이 낮고 향상된 안전성을 갖는다.

[0008] 단일 도메인 항체

[0009] 일 측면에서, 본 출원은 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 여기서 단일 도메인 항체는 다음을 포함한다.

[0010] (a) 서열 번호 43에 제시된 서열, 또는 서열 번호 43에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR1;

[0011] (b) 서열 번호 44에 제시된 서열, 또는 서열 번호 44에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR2; 및

[0012] (c) 서열 번호 45에 제시된 서열, 또는 서열 번호 45에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 갖는 CDR3.

[0013] 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 43에 제시된 CDR1, 서열 번호 44에 제시된 CDR2 및 서열 번호 45에 제시된 CDR3을 포함한다.

[0014] 단일 도메인 항체는 다음 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다:

[0015] (i) 서열 번호 7에 제시된 서열,

[0016] (ii) 서열 번호 7에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열; 또는

[0017] (iii) 서열 번호 7에 제시된 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0018] 일부 실시양태에서, 치환은 보존적 치환이다.

[0019] 용어 "4-1BB"는 CD137 또는 TNFRSF9(TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원 9)로도 알려져 있으며, TNF 수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF)의 구성원이고, 면역 세포(선천 면역 세포와 적응 면역 세포 모두)가 활성화되면 발현되는 공동 자극 분자이다. 4-1BB는 다양한 면역 세포의 활성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 본원에서 사용된 4-1BB는 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)(인간)(NCBI 접근 번호 NP\_001552.2)와 같은 포유동물에서 유래될 수 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 4-1BB 에피토프 CRD-4에 특이적으로 결합한다.

[0021] 폴리펩타이드 작제물

[0022] 본 출원은 또한 상술된 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하는, 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드 작제물을 제공한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 N-말단 및/또는

C-말단(예를 들어, C-말단)에 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결된다.

- [0024] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는  $(G_mX_n)_lG_m$ 로 나타내어지는 구조를 가지며, 여기서 m, m', n 및 l은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택되며; 바람직하게는, m은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고, n은 1 및 2 중에서 선택되고, l은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, m'는 0 및 1 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택된다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG1의 Fc 도메인(예를 들어, CH2와 CH3를 포함하는 IgG1의 Fc 도메인)이다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열 번호 19에 제시된 서열, 또는 이에 비해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 이에 비해 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된 서열을 포함한다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 서열 번호 19 또는 20에 제시된 서열을 포함한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 폴리펩타이드 구조는 서열 번호 31 또는 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0030] 다중특이성 항체
- [0031] 본 출원은 또한 HER2를 발현하는 종양 세포와 교차 결합될 때만 4-1BB 신호전달을 활성화할 수 있는 다중특이성 항체를 제공한다. 또한, 다중특이성 항체에 포함된 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 종양 미세 환경(TME)에서만 국소화 및/또는 활성화되고/되거나 기존의 항-4-1BB 항체에 비해 간 독성을 상당히 감소시키는 동시에 면역 반응 증진 및/또는 종양 치료의 효능을 유지하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 본 출원은 상술한 바와 같은 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 구조를 포함하는 다중특이성 항체를 제공한다.
- [0033] 본 출원은 또한 항 4-1BB에 대해 특이적인 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 다중특이성 항체를 제공하며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 상술한 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 상술한 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 상기 임의의 다중특이성 항체는 4-1BB에 특이적으로 결합하고, 추가적으로 하나 이상의 다른 표적에 특이적으로 결합한다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 표적은 종양 항원이다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD40, CD49, CD52, CD56, CD74, CD80, CD95, CD138, CS1/SLAMF7, KiR, Thy-1, Ly-6, Fas, APO-1, EGFR, HER2, CXCR4, HLA, GM1, 및 DRD 중에서 선택된 하나 이상이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 여러 개의 동일하거나 상이한 종양 항원에 결합할 수 있다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 동일한 종양 항원 상의 동일하거나 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 HER2에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0041] "HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)"는 ErbB2 유전자에 의해 인코딩되며 표피 성장 인자 수용체(EGFR/ErbB)의 구성원이다. HER2는 세포 증식과 분화를 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 세포 외 성장 인자에 결합하면 다른 HER 수용체와 동중량체화 및/또는 이중량체화를 거치는 현저한 경향을 보이며, 여러 형태의 신호 전달 경로가 활성화되고 세포자멸사, 생존 또는 세포 증식이 유도된다. 예를 들어, HER2 단백질은 GenBank 접근 번호 NP\_004439.2, NP\_001005862.1 등으로 기탁된 폴리펩타이드일 수 있으며, 이는 각각 GenBank 접근 번호 NM\_004448.4, NM\_001005862.3 등으로 기탁된 뉴클레오타이드 서열(mRNA)에 의해 인코딩된다.
- [0042] HER2에 결합하고 HER2를 항원으로 인식하는 단편은 항-HER2 항체의 scFv, (scFv)<sub>2</sub>, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 중에서

선택될 수 있다.

- [0043] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 항-HER2 항체의 중쇄 가변 영역의 적어도 하나(예를 들어, 1, 2 또는 3)의 CDR 및/또는 항-HER2 항체의 경쇄 가변 영역의 적어도 하나(예를 들어, 1, 2 또는 3)의 CDR을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 항-HER2 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 항-HER2 항체의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙, 퍼투주맙 및 이의 변이체 중에서 선택된다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 변이체는 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙의 변이체이다. 구체적으로, 항-HER2 항체는 다음 3개의 중쇄 가변 영역(VH) 상보적 결정 영역(CDR):
- [0048] 서열 번호 46에 제시된 VH CDR1, 서열 번호 47에 제시된 VH CDR2 및 서열 번호 48에 제시된 VH CDR3; 및/또는,
- [0049] 다음 3개의 경쇄 가변 영역(VL) 상보적 결정 영역(CDR)을 포함한다:
- [0050] 서열 번호 49에 제시된 VL CDR1, 서열 번호 50에 제시된 VL CDR2, 및 서열 번호 8에 제시된 VL CDR3.
- [0051] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 HER2에 특이적인 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0052] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 VHH이고; 제2 항원 결합 도메인은 Fab이고, 다중특이성 항체는 다음을 포함한다:
- [0053] (1) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 I-A;
- [0054] 및,
- [0055] (2) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역 및 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 I-B; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 I-B는 N-말단에서 C-말단으로, 제2 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역, 및 제1 항원 결합 도메인을 포함함.
- [0056] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 다음 중에서 선택될 수 있다(예를 들어, Fc 영역): IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄 불변 영역, 구체적으로, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1의 CH1, CH2 및/또는 CH3, 및 예를 들어, 인간 IgG1의 Fc 영역.
- [0057] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 다음 중 하나 이상을 증가시키거나 감소시키도록 변경(예를 들어, 돌연변이)된다: Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기 수, 이펙터 세포 기능 또는 보체 기능.
- [0058] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 LALA 돌연변이, CH3 Knob 돌연변이, CH3 Hole 돌연변이, CH1/CL 선호 돌연변이 CH SET1, CH1/CL 선호 돌연변이 CH SET2CH SET2 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 다음으로 이루어진 군 중에서 선택된다:
- [0060] HC-1: 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열;
- [0061] HC-2: 서열 번호 11에 제시된 아미노산 서열;
- [0062] HC-3: 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열;
- [0063] HC-4: 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열;
- [0064] HC-5: 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열;
- [0065] HC-6: 서열 번호 19에 제시된 아미노산 서열
- [0066] HC-7: 서열 번호 20에 제시된 아미노산 서열;
- [0067] HC-8: 서열 번호 37에 제시된 아미노산 서열; 및
- [0068] HC-9: 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열;

- [0069] 변이체는 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된다.
- [0070] 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은  $\kappa$  또는  $\lambda$ 의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체 중에서 선택된다.
- [0071] 변이체는 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가된 것이다(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가).
- [0072] 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 다음으로 이루어진 군 중에서 선택되고:
- [0073] LC-1: 서열 번호: 9;
- [0074] LC-2: 서열 번호 15; 및,
- [0075] LC-3: 서열 번호: 16;
- [0076] 변이체는 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 I-A의 CL은 펩타이드 사슬 I-B의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 2개의 펩타이드 사슬 I-A와 2개의 펩타이드 사슬 I-B를 포함하고; 바람직하게는, 두 펩타이드 사슬 I-B의 중쇄 불변 영역은 이량체를 형성한다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 도메인은 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결된다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는  $(G_mX_n)_lG_m$ 로 나타내어지는 구조를 가지며, 여기서  $m$ ,  $m'$ ,  $n$  및  $l$ 은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고,  $X$ 는 A 및 S 중에서 선택되며; 바람직하게는,  $m$ 은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고,  $n$ 은 1 및 2 중에서 선택되고,  $l$ 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고,  $m'$ 는 0 및 1 중에서 선택되고,  $X$ 는 A 및 S 중에서 선택된다.
- [0081] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 다음 중 하나 이상을 특징으로 한다:
- [0083] (i) 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0084] (ii) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0085] (iii) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨.
- [0086] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 I-A는 서열 번호 22, 24 또는 26에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 I-B는 서열 번호 21, 23 또는 25에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 다음 중에서 선택되고:
- [0089] (1) 펩타이드 사슬 I-A 및 I-B를 포함하는 다중특이성 항체 - 여기서 펩타이드 사슬 I-A는 서열 번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 I-B는 서열 번호 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨 -;
- [0090] (2) 펩타이드 사슬 I-A 및 I-B를 포함하는 다중특이성 항체 - 여기서 펩타이드 사슬 I-A는 서열 번호 24에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 I-B는 서열 번호 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨 -.

- [0091] 및,
- [0092] (3) 펩타이드 사슬 I-A 및 I-B를 포함하는 다중특이성 항체 - 여기서 펩타이드 사슬 I-A는 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 I-B는 서열 번호 25에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨 -;
- [0093] 바람직하게는 다중특이성 항체는 2개의 펩타이드 사슬 I-A와 2개의 펩타이드 사슬 I-B를 포함하고;
- [0094] 바람직하게는 두 펩타이드 사슬 I-B의 중쇄 불변 영역은 이량체를 형성한다.
- [0095] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 HER2에 특이적인 제3 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 VHH이고; 제2 항원 결합 도메인과 제2 항원 결합 도메인은 Fab이고, 다중특이성 항체는 다음을 포함한다:
- [0097] (1) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 II-A;
- [0098] (2) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역 및 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 II-B; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-B는 N-말단에서 C-말단으로 제2 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역, 및 제1 항원 결합 도메인을 포함함;
- [0099] (3) 제3 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함하는 펩타이드 사슬 II-C.
- [0100] 및,
- [0101] (4) 제3 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역과 중쇄 불변 영역 및 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 펩타이드 사슬 II-D; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-D는 N-말단에서 C-말단으로 제3 항원 결합 도메인의 인접한 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역, 및 제1 항원 결합 도메인을 포함함.
- [0102] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은(예를 들어, Fc 영역) IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄 불변 영역; 구체적으로, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1의 CH1, CH2 및/또는 CH3, 및 또 다른 예로, 인간 IgG1의 Fc 영역 중에서 선택될 수 있다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 다음 중 하나 이상을 증가 또는 감소시키도록 변경(예를 들어, 돌연변이)된다: Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스테인 잔기 수, 이펙터 세포 기능 또는 보체 기능.
- [0104] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 LALA 돌연변이, CH3 Knob 돌연변이, CH3 Hole 돌연변이, CH1/CL 선호 돌연변이 CH SET1, CH1/CL 선호 돌연변이 CH SET2 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은  $\kappa$  또는  $\lambda$ 의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체 중에서 선택된다.
- [0106] 변이체는 유래된 야생형 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가(예를 들어, 최대 20개, 최대 15개, 최대 10개 또는 최대 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가; 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개 아미노산이 치환, 결실 또는 첨가)된다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-A의 CL은 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있으며; 바람직하게는, 펩타이드 사슬 II-C의 CL은 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역 CH1 도메인과 이량체를 형성할 수 있다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 하나의 펩타이드 사슬 II-A, 하나의 펩타이드 사슬 II-B, 하나의 펩타이드 사슬 II-C, 하나의 펩타이드 사슬 II-D를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-B 및 II-D의 중쇄 불변 영역은 이량체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-B의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 펩타이드 사슬 II-D의 중쇄 불변 영역은 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 도메인은 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결된다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는  $(G_mX_n)_lG_m$ 로 나타내어지는 구조를 갖고, 여기서  $m$ ,  $m'$ ,  $n$  및  $l$ 은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고,  $X$ 는 A 및 S 중에서 선택된다.
- [0111] 일부 실시양태에서,  $m$ 은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고,  $n$ 은 1 및 2 중에서 선택되고,  $l$ 은 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, m'는 0 및 1 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택된다.

- [0112] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 다음 특징 중 하나 이상을 특징으로 한다:
- [0114] (i) 제1 항원 결합 도메인은 서열 번호 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0115] (ii) 제2 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0116] (iii) 제2 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0117] (iv) 제3 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 1, 3 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨;
- [0118] (v) 제3 항원 결합 도메인의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2, 4 또는 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨.
- [0119] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-A는 서열 번호 28 또는 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-B는 서열 번호 27 또는 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-C는 서열 번호 30 또는 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 펩타이드 사슬 II-D는 서열 번호 29 또는 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 다중특이성 항체는 다음 중에서 선택된다:
- [0124] (1) 펩타이드 사슬 II-A, II-B, II-C 및 II-D를 포함하는 다중특이성 항체 - 여기서 펩타이드 사슬 II-A는 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-B는 서열 번호 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-C는 서열 번호 29에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-D는 서열 번호 30에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨 -;
- [0125] 및,
- [0126] (2) 펩타이드 사슬 II-A, II-B, II-C 및 II-D를 포함하는 다중특이성 항체 - 여기서 펩타이드 사슬 II-A는 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-B는 서열 번호 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-C는 서열 번호 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, 펩타이드 사슬 II-D는 서열 번호 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성됨 -.
- [0127] 펩타이드 링커
- [0128] 본원에서 기술한 바와 같이 4-1BB에 결합하는 부분의 N-말단 또는 C-말단 (바람직하게는 N-말단)은 중쇄 불변 영역의 C-말단 또는 N-말단에 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결된다.
- [0129] 본원에서 사용되는 용어 "펩타이드 링커"는 1 내지 100개의 아미노산, 특히 2 내지 50개의 아미노산을 포함하는 올리고펩타이드를 지칭할 수 있으며, 각 아미노산은 어떠한 제한 없이 임의의 종류의 아미노산일 수 있다. 임의의 통상적인 펩타이드 링커가 특정 목적을 충족시키기 위해 적절히 변형되거나 변형 없이 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 펩타이드 링커는 예를 들어 Gly, Asn 및/또는 Ser 잔기를 함유할 수 있고/있거나 Thr 및/또는 Ala와 같은 중성 아미노산을 함유할 수 있다. 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 서열은 관련 기술 분야에서 알려져 있을 수 있다. 펩타이드 링커의 길이는 폴리펩타이드 및/또는 scFv의 기능에 영향을 미치지 않는 제한 내에서 적절하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 링커는 총 약 1 내지 약 100개의 아미노산, 약 2 내지 약 50개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 25개(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개)의 아미노산을 포함함으로써 형성될 수 있으며, 각 아미노산은 Gly, Asn, Ser, Thr 및 Ala로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다.

- [0130] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는  $(G_m X_n)_l G_m$ 로 나타내어지는 구조를 갖고, m, m', n 및 l은 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택된다.
- [0131] 일부 실시양태에서, m은 1, 2, 3, 4 및 5 중에서 선택되고, n은 1 및 2 중에서 선택되고, l은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 중에서 선택되고, m'는 0 및 1 중에서 선택되고, X는 A 및 S 중에서 선택된다.
- [0132] 일부 실시양태에서, 펩타이드 링커는 서열 번호 17 또는 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0133] 폴리뉴클레오타이드, 재조합 벡터 및 항체의 제조
- [0134] 일 측면에서, 본 발명은 상기 항목 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0135] 일 측면에서, 본 발명은 상술한 바와 같은 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0136] 일 측면에서, 본 발명은 상술된 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 재조합 세포는 재조합 벡터로 형질감염된 세포일 수 있다.
- [0137] 일 측면에서, 본 발명은 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 단계는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 벡터에 있음)를 폴리뉴클레오타이드의 발현을 허용하는 조건 하에 배양함으로써 수행될 수 있다. 이 방법은 발현 또는 배양 단계 후 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0138] 적용
- [0139] 본 발명은 또한 본원에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 면역 반응 증대 및/또는 종양 치료에서의 용도를 제공한다.
- [0140] 구체적으로, 본 발명은 상기 항목 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 재조합 세포, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0141] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 항종양 약제의 제조에서의 상기 항목 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 재조합 세포 또는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0142] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 항목 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 재조합 세포 또는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 항종양 방법을 제공한다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 종양은 HER2를 과발현한다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 종양은 유방암, 결장암, 위암, 폐암(예를 들어, 편평세포 폐암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암), 복막암, 피부암, 편평세포 암종, 피부 또는 안구 흑색종, 직장암, 항문 근처 암, 식도암, 소장 종양, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간암, 위장관암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포 선종, 대장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 침샘 종양, 신장암, 자궁경부암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양이다.
- [0146] 검출 용도
- [0147] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 상기 측면 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물 및 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물에 부착된 검출 가능한 라벨을 포함하는 접합체를 제공한다.
- [0148] 일부 실시양태에서, 검출 가능한 라벨은 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학 발광제(예를 들어, 아크리리딘 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테놀 유도체), 형광 염료(예를 들어,

어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 바이오틴으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

- [0149] 한편, 본 발명은 또한 상기 측면 중 어느 하나에 기술된 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물, 또는 접합체를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0150] 특정 실시양태에서, 키트는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 제2 항체를 추가로 포함하고; 선택적으로, 제2 항체는 또한 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학 발광제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성 핵종 또는 바이오틴과 같은 검출 가능한 라벨을 더 포함한다.
- [0151] 일부 실시양태에서, 제2 항체는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물과 동일하거나 상이한 항원 에피토프를 표적으로 삼는다.
- [0152] 한편, 본 발명은 또한 샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하는 방법을 제공하며, 이는 상기 측면 중 어느 하나에 기술된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물, 또는 접합체를 사용하는 것을 포함한다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 방법은 면역 블로팅, 효소 면역 측정법(예를 들어, ELISA), 화학 발광 면역 측정법, 형광 면역 측정법 또는 방사 면역 측정법과 같은 면역학적 분석법이다.
- [0154] 특정 실시양태에서, 본 방법은 상술한 바와 같은 접합체를 사용하는 단계를 포함한다.
- [0155] 특정 실시양태에서, 본 방법은 상기 측면 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물을 사용하는 단계를 포함하며, 방법은 또한 검출 가능한 라벨(예를 들어, 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다아제 또는 알칼리성 포스파타제), 화학발광제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 루미놀 및 이의 유도체 또는 루테늄 유도체), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인 또는 형광 단백질), 방사성핵종 또는 바이오틴)을 갖는 제2 항체를 사용하여 항원에 대한 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드 작제물의 결합을 검출하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 방법은 다음 단계를 포함한다: (1) 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; (2) 항원-항체 면역 복합체의 형성을 검출하는 단계 또는 면역 복합체의 양을 검출하는 단계. 면역 복합체의 형성은 4-1BB 또는 4-1BB를 발현하는 세포의 존재를 나타낸다.
- [0157] 한편, 본 출원은 또한 검출 시약의 제조에서의 상기 측면 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 폴리펩타이드 작제물, 또는 접합체의 용도를 제공하며, 여기서 검출 시약은 샘플 내 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하기 위해 사용된다.
- [0158] 특정 실시양태에서, 검출 시약은 상술한 바와 같은 샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출하는 방법에 의해 샘플에서 4-1BB의 존재 또는 수준을 검출한다.
- [0159] 특정 실시양태에서, 샘플은 대상체(예를 들어, 포유동물, 바람직하게는 인간 또는 원숭이)로부터의 세포 샘플(예를 들어, 종양 세포)이다.
- [0160] 정의
- [0161] 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자들이 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본원에서 사용된 단백질 및 핵산 화학, 분자 생물학, 세포 및 조직 배양, 미생물학, 면역학 및 관련 용어와 실험실 작업 단계는 모두 해당 분야에서 널리 사용되는 용어 및 일상 단계이다. 한편, 본 발명의 이해를 돕기 위해, 관련 용어의 정의 및 설명이 이하에 제공된다.
- [0162] 본원에서 사용되는 "적어도 하나의 (종류)" 또는 "하나 (종류) 이상 (종류들)"은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 (종류들) 이상 (종류들)을 지칭할 수 있다.
- [0163] "포함하는"이라는 표현 또는 이와 동의어 또는 유사한 표현인 "포함한", "함유하는" 및 "가지는"은 개방적이며 나열되지 않은 추가 요소, 단계 또는 구성 요소를 제외하지 않는다. "...로 구성되는"이라는 표현에는 지정되지 않은 요소, 단계 또는 구성 요소가 제외된다. "...로 구성되는"이라는 표현은 범위가 지정된 요소, 단계 또는 구성 요소와 보호하려는 대상의 기본 및 새로운 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않는 선택적 요소, 단계 또는 구성 요소로 제한됨을 지칭한다. "포함하는"이라는 표현은 "본질적으로 ...로 구성되는" 과 "...로 구성되

는"이라는 표현을 포함한다는 것을 이해해야 한다.

- [0164] "선택적으로" 또는 "선택적"이라는 용어는 이후에 설명된 사건 또는 상황이 발생할 수도 있고 발생하지 않을 수도 있음을 의미하며, 설명에는 사건 또는 상황의 발생과 사건 또는 상황의 비발생이 포함된다.
- [0165] 본원에서 사용되는 "펩타이드", "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합으로 연결된 2개 이상의 아미노산에 의해 형성된 폴리머를 지칭한다. "단백질"은 공유 또는 비공유 방식으로 하나 이상의 폴리펩타이드에 의해 형성될 수 있다. 달리 명칭되지 않는 한, 용어 "폴리펩타이드"와 "단백질"은 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0166] 본원에서 사용되는 "항체"는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 통해 항원 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 또는 이의 단편을 지칭한다. 본원에서 사용되는 항체의 정의는 항원 결합 단편을 포함한다. 따라서 "항체"라는 용어에는 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 인간 항체, 비인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 도메인 항체 및 항원 결합 단편이 포함된다. 항체는 합성(예를 들어, 화학적 결합 또는 생물학적 결합에 의해 생성), 효소적 처리 또는 재조합에 의해 생성될 수 있다. 본원에 제공된 항체에는 모든 면역글로불린 유형(예를 들어, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY), 임의의 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 클래스(예를 들어, IgG2a 및 IgG2b)가 포함된다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체는 뮤린 모노클로날 항체이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간화된 모노클로날 항체이다.
- [0167] 본원에서 사용되는 "전통적인 항체" 또는 "전장 항체"는 일반적으로 4개의 폴리펩타이드, 즉 2개의 중쇄(HC)와 2개의 경쇄(LC)를 포함한다. 각 경쇄는 N-말단에서 C-말단으로 "경쇄 가변 영역(VL)"과 "경쇄 불변 영역(CL)"을 포함한다. 각 중쇄는 N-말단에서 C-말단으로 "중쇄 가변 영역(VH)"과 "중쇄 불변 영역(CH)"을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 N-말단에서 C-말단으로 CH1, CH2 및 CH3을 포함할 수 있다. 일부 면역글로불린 유형(예를 들어, IgM 및 IgE)에서 중쇄 불변 영역은 CH4도 포함할 수 있다. "Fc" 단편은 Fc 수용체에 결합하기 위한 부위를 제공하는 CH2 및 CH3을 포함하는 단편을 지칭한다. "힌지 영역"은 면역글로불린의 Fab 및 Fc 단편을 연결하는 항체의 일부를 지칭한다. 일부 경우에, 힌지 영역은 불변 영역과 막관통 도메인을 연결하는 T 세포 수용체의 일부를 지칭한다. 본원에서 사용된 힌지 영역은 키메라 항원 수용체에 사용되는 경우, 또한 모든 기능적 동등물을 나타낼 수 있다. 당업자는 알려진 알고리즘 및 소프트웨어에 따라 항체에서 VH, VL, CL, CH1, CH2, CH3 및 힌지 영역의 위치를 결정할 수 있다. 적용할 수 있는 알고리즘 및 소프트웨어에 대한 설명은 예를 들어 William R. Strohl, Lila M. Strohl, (2012), *Antibody structure-function relationships*, In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, *Therapeutic Antibody Engineering*, Woodhead Publishing, pp. 37-56에서 찾을 수 있다.
- [0168] 전형적으로, VL 및 VH는 각각 3개의 고가변 "상보성 결정 영역(CDR)"과 4개의 상대적으로 보존적인 "프레임워크 영역(FR)"을 포함할 수 있으며, N-말단에서 C-말단으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 순서로 연결된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 경쇄 가변 영역 CDR (CDRL)은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 지칭될 수 있으며, 중쇄 가변 영역 CDR(CDRH)은 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 지칭될 수 있다. 일반적으로 VH 및 VL의 쌍을 포함하는 6개의 CDR이 항원 결합 부위의 결합 특이성을 결정한다고 믿어지지만, 일부 경우에는 6개 미만(예를 들어, 3개, 4개 또는 5개)의 CDR을 포함하는 다른 단편(예를 들어, 단일 도메인 항체, 나노바디라고도 함)도 항원에 결합할 수 있는 능력이 있다. 당업자는 Kabat, Abm 또는 Chothia 넘버링 방법과 같이 해당 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 CDR을 식별할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, Chothia, Abm, Kabat 및 IMGT와 같은 다수의 CDR 넘버링 시스템이 동일한 가변 영역에 사용될 수 있다. 당업자는 서로 다른 넘버링 시스템에 의해 정의된 CDR이 다를 수 있지만, 동일한 넘버링 시스템에 해당하는 CDR은 항원 에피토프에 결합할 수 있는 효과적인 항원 결합 부위를 나타낸다는 것을 이해할 것이다. CDR 넘버링 시스템에 대한 설명은 예를 들어 Kabat 넘버링 시스템: Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia 넘버링 시스템: Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; IMGT 넘버링 시스템: Lefranc, M.-P., 2011(6), *IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System Cold Spring Harb Protoc.*; Abm 넘버링 시스템: Martin, A.C.R. and J. Allen (2007) "Bioinformatics tools for antibody engineering," in S. Duebel (ed.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, pp. 95-118를 참조한다.
- [0169] 본원에서 사용되는 용어 "프레임워크 영역" 및 "프레임워크"는 상호 교환적으로 사용할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "프레임워크 영역", "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 위에서 정의한 CDR 잔기 이외의 항체의 가변 영역에 있는 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0170] 일반적으로 비공유 상호작용을 통해 VH와 VL로 구성된 "Fv" 단편이 항원 결합 부위를 포함하는 가장 작은 항원

결합 단편이라고 믿어진다. 그러나, 중쇄 가변 영역만을 포함하는 단일 도메인 항체(VHH, sdAb 또는 나노바디라고도 함)도 항원 결합 능력을 가질 수 있다. VH와 VL을 펩타이드 링커로 연결하여 "단일 사슬 Fv(scFv)"를 얻을 수 있다. Fv 또는 scFv에 이황화물 결합을 도입함으로써 각각 "이황화물 안정화 Fv(dsFv)" 또는 "단일 사슬 이황화물 안정화 Fv(scdsFv 또는 dsscFv)"를 얻을 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 본 발명의 단일 도메인 항체, 이중특이성 항체 및 다중특이성 항체의 항원 결합 단편은 바람직하게는 scFv 또는 scdsFv를 사용한다.

[0171] 본원에서 사용되는 "Fab"는 하나의 온전한 항체 경쇄(VL-CL)와 항체 중쇄 가변 영역 및 하나의 중쇄 불변 영역(VH-CH1, Fd라고도 함)을 포함한다. 단일 사슬 "Fab(scFab)"은 "Fab"의 CL과 CH1을 펩타이드 링커로 연결하여 얻을 수 있다. "F(ab')<sub>2</sub>"는 기본적으로 힌지 영역에서 이황화물 결합으로 연결된 2개의 Fab 단편을 포함한다. "Fab"는 F(ab')<sub>2</sub>의 절반이며, F(ab')<sub>2</sub>의 힌지 영역에서 이황화물 결합을 환원시켜 얻을 수 있다.

[0172] 항체 또는 항원 결합 단편은 "1가", "2가", "3가" 또는 "4가" 또는 "다가"일 수 있으며, 이는 복수개의(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개 이상) 항원 결합 부위를 가지고 있음을 의미한다.

[0173] 항체 또는 항원 결합 단편이 2개 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 항원에 결합하는 경우, 이를 "다중특이성 항체"라고도 하며, 각각 2개, 3개 또는 4개의 항원에 결합할 수 있는 다중특이성 항체를 나타내는 이중특이성 항체, 삼중특이성 항체 또는 사중특이성 항체를 나타낸다.

[0174] 본원에서 사용되는 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위(2가)를 갖는 2개의 scFv를 포함하는 항체를 지칭하며, 여기서 각 scFv의 VH와 VL은 짧은 펩타이드 링커(약 5 내지 10개 아미노산 잔기)로 연결되어 VH와 VL 사슬이 쌍을 이루도록(즉, 제1 scFv의 VH와 제2 scFv의 VL이 쌍을 이루고, 제1 scFv의 VL과 제2 scFv의 VH가 쌍을 이루도록) 항원 결합 부위를 형성한다. 디아바디는 이중특이성 항체일 수 있다.

[0175] 본원에서 사용되는 항체의 "항원 결합 단편"은 전장보다 짧지만, 적어도 전장 항체의 가변 영역의 일부를 포함하고(예를 들어, 하나 이상의 CDR 및/또는 하나 이상의 항원 결합 부위를 포함함), 따라서 전장 항체의 항원에 특이적으로 결합하는 능력의 일부를 유지하는 전장 항체의 일부를 지칭한다. 항원 결합 단편은 예를 들어, 전장 항체의 효소 처리에 의해 생성된 항체 유도체, 합성적으로 생성된 유도체 및 재조합적으로 생성된 유도체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단편의 예로는 Fv, scFv, dsFv, scdsFv, Fab, scFab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 디아바디, Fd 및 Fd' 단편 및 기타 단편(예를 들어, 변형을 포함하는 단편)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항원 결합 단편은 예를 들어 이황화물 결합 및/또는 펩타이드 링커에 의해 연결되고/되거나 비공유 상호작용에 의해 형성된 여러 개의 펩타이드 사슬을 포함할 수 있다.

[0176] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 고도의 동질적인 항체 그룹을 지칭하며, 여기에 포함된 항체 분자는 소량으로 존재할 수 있는 자연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고는 실질적으로 동일하다. 모노클로날 항체는 일반적으로 단일 항원 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본원에서 사용되는 모노클로날 항체는 예를 들어, 트랜스제닉 동물(예를 들어, 트랜스제닉 마우스)에서 생산되거나, 불멸화된 B 세포(예를 들어, B 세포 하이브리도마)에서 생산되거나, 재조합 DNA 방법을 사용하여 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 제조되거나, 파지 항체 라이브러리에서 단리되는 등 해당 기술 분야에 알려진 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 모노클로날 항체이다. 일 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화된 모노클로날 항체이다.

[0177] "키메라 항체"는 특정 종에서 유래된 항체의 해당 서열과 일부(예를 들어, CDR, FR, 가변 영역, 불변 영역 또는 이들의 조합)가 동일하거나 상동하고 나머지 부분이 다른 종에서 유래된 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동하는 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 "키메라 항체"는 또한 상이한 항체 유형 또는 하위 클래스에 속하는 부분을 포함하는 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 무린 항체 가변 영역 및 인간 항체 불변 영역을 갖는다.

[0178] 본원에서 사용되는 "인간화 항체"는 비인간 항체와 인간 항체 서열을 포함하는 항체를 지칭한다. 따라서, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린에서 유래된 최소한의 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 비인간 항체는 비인간 종에서 유래된 항체이거나 비인간 종의 일부를 포함하는 항체(예를 들어, 키메라 항체)일 수 있다. 비인간 종에는 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 알파카 또는 비인간 영장류가 포함될 수 있다. 비인간 항체로부터 인간화 항체를 얻는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 인간화 항체는 비인간 항체(예를 들어, 무린 항체 또는 키메라 항체)로부터 생산될 수 있으며, 예를 들어, 비인간 항체(예를 들어, 무린 항체)의 CDR 서열을 인간 항체 프레임워크 영역으로 이식함으로써 생산될 수 있다. 일부 경우, 인간화 항체의 항원 결합 능력 및/또는 안정성을 유지하기 위해 비인간 항체(예를 들어, 무린 항체)의 프레임워크 서열의 핵심 아미노산 잔기가 인간 항체 프레임워크

크 영역에 유지될 수 있으며, 즉 "역돌연변이"가 수행될 수 있다(예를 들어, Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81(21): 6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312: 604-608 참조).

- [0179] 본원에서 사용되는 아미노산 서열의 "퍼센트(%) 서열 동일성" 및 "서열 동일성"은 당업계에 잘 알려진 정의를 가지며, 이는 서열 정렬(예를 들어, 수동 검사 또는 잘 알려진 알고리즘)에 의해 결정된 두 폴리펩타이드 서열 간의 동일성 백분율을 지칭한다. 이는 BLAST, BLAST-2, Clustal Omega 및 FASTA 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것과 같이 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0180] "친화도" 또는 "결합 친화도"는 비공유 상호작용을 통해 항체와 항원 간의 상호 결합 강도를 측정하는 데 사용된다. "친화도"의 크기는 일반적으로 평형 해리 상수  $K_D$  또는  $EC_{50}$ 으로 보고될 수 있다.  $K_D$ 는 측정된 평형 결합 상수( $k_a$ )와 평형 해리 상수( $k_d$ )로 계산할 수 있다:  $K_D = k_d/k_a$ . 친화도는 생체막 간섭법(예를 들어, Octet ForteBio 검출 시스템 사용 가능), 방사면역측정법, 표면 플라즈몬 공명, 효소 결합 면역 흡착 검사법 또는 유세포 분석법과 같이 당업계에 알려진 기존 기술을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0181] 본원에서 사용되는 항체와 항원 사이의 "특이적 결합"은 항체와 항원이 더 높은 친화력으로 서로 결합된다는 것을 지칭한다. 전형적으로, 특이적으로 결합된 항체와 항원 사이의  $KD$  값은 적어도 약  $10^{-6}$  내지 적어도 약  $10^{-9}$  M 이하, 예를 들어, 적어도 약  $10^{-6}$ , 적어도 약  $10^{-7}$ , 적어도 약  $10^{-8}$ , 적어도 약  $10^{-9}$  M 이하이다.
- [0182] 본원에서 사용된 참조 아미노산 서열 "에서" 또는 "유래된" 아미노산 서열은 참조 아미노산 서열과 부분적으로 또는 완전히 동일하거나 상동성이다. 예를 들어, 인간 면역글로불린의 중쇄 불변 영역에서 유래된 아미노산 서열은 그것이 유래된 인간 면역글로불린의 중쇄 불변 영역의 야생형 서열과 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0183] 본원에서 사용되는 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열의 "변이체"는 유래된 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 돌연변이 또는 변형을 갖는다. 아미노산 돌연변이는 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가를 포함한다. 당업자는 폴리펩타이드 또는 단백질의 비필수 영역에 있는 아미노산이 적합한 보존적 아미노산으로 치환될 수 있고 이러한 치환은 일반적으로 생물학적 활성을 변화시키지 않는다는 것이 이해될 것이다(예를 들어, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224 참조). 적합한 보존적 치환은 당업자에게 잘 알려져 있다. 다음 표는 아미노산 잔기의 일반적인 보존적 치환의 제한적이지 않은 몇 가지 예를 나열한다. 일부 경우에, 아미노산 치환은 비보존적 치환이다. 당업자는 예를 들어, 항체 글리코실화 변형 유형을 변화시키고, 사슬 간 이황화물 결합을 형성하는 능력을 변화시키기 위해 항체 또는 항체 단편에 아미노산 돌연변이 또는 변형을 가하여 이의 특성을 변화시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 아미노산 돌연변이 또는 변형을 함유하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편도 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 범위에 포함된다.

원래의 잔기	예시적인 보존적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu

[0184]

[0185]

본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드", "핵산" 및 "핵산 분자"는 적어도 2개의 연결된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체를 포함하는 올리고머 또는 폴리머를 지칭하며, 일반적으로 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있다.

[0186]

본원에서 사용되는 "단리된"은 물질(예를 들어, 핵산 분자 또는 폴리펩타이드)이 이의 공급원 또는 환경으로부터 단리되었으며, 즉, 다른 성분을 실질적으로 포함하지 않는다는 것을 의미한다.

[0187]

본원에서 사용되는 "백터"는 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 매개체이며, 백터가 적절한 숙주 세포로 형질전환되면 외인성 핵산이 증폭되거나 발현된다. 백터는 일반적으로 자유롭게 유지되지만, 유전자 또는 이의 일부가 게놈의 염색체에 통합되도록 설계될 수 있다. 본원에서 사용되는 백터의 정의는 플라스미드, 선형화된 플라스미드, 바이러스 백터, 코스미드, 파지 백터, 파지미드, 인공 염색체(예를 들어, 효모 인공 염색체 및 포 유동물 인공 염색체) 등을 포함한다.

[0188]

본원에서 사용되는 "발현 백터"는 DNA를 발현할 수 있는 백터를 지칭하며, 여기서 DNA는 DNA 발현에 영향을 줄 수 있는 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 리보솜 결합 부위)에 작동적으로 연결된다. 조절 서열은 프로모터 및 종결자 서열을 포함할 수 있으며, 선택적으로 복제 기원, 선택 마커, 인헨서, 폴리아데닐화 신호 등을 포함할 수 있다. 발현 백터는 플라스미드, 파지 백터, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포에 도입될 때 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 백터일 수 있다. 적합한 발현 백터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포에서 복제 가능한 발현 백터뿐만 아니라 유리 상태를 유지하거나 숙주 세포 게놈에 통합되는 발현 백터를 포함한다.

[0189]

본원에서 사용되는 "재조합 세포"는 백터를 수신, 유지, 복제 또는 증폭하는 데 사용되는 세포이다. 재조합 세포는 또한 핵산이나 백터에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드를 발현하는 데 사용될 수 있다. 재조합 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포일 수 있다.

[0190] 본원에서 사용되는 용어 "치료"는 질환/증상의 개선, 예컨대 질환/증상의 완화 또는 제거, 질환/증상의 발생, 진행 및/또는 악화의 예방 또는 지연을 지칭한다. 따라서 치료는 예방, 치료 및/또는 치유를 포함한다.

[0191] "유효량"은 질환 증상의 심각성을 감소시키거나, 무병 기간의 빈도와 지속 시간을 증가시키거나, 질환으로 인한 손상이나 장애를 예방하기에 충분한 용량을 지칭한다. "유효량"은 질환이나 증상을 예방, 치료, 개선, 차단 또는 부분적으로 차단하는 데 필요한 양을 지칭한다. 예를 들어, 종양을 치료하기 위해, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 약학적 조성물의 "유효량"은 바람직하게는 종양 세포 성장 또는 종양 성장을 치료되지 않은 대상에 비해 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 30%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 더 바람직하게는 적어도 약 50%, 더 바람직하게는 적어도 약 60%, 더 바람직하게는 적어도 약 70%, 더 바람직하게는 적어도 약 80% 억제한다. 종양 성장을 억제하는 효능은 자연 종양, 유도 종양 및 이식된 종양 동물 모델과 같은 당업계의 통상적인 종양 동물 모델을 사용하여 평가할 수 있다. 대안적으로, 세포 성장을 억제하는 능력은 또한 당업계에 알려진 시험관 내 검출 방법을 사용하여 검사할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 약학적 조성물의 유효량은 종양 크기를 줄이거나, 그렇지 않으면 대상체의 증상을 완화할 수 있다(예를 들어, 전이 또는 재발을 예방 또는 치료할 수 있다). 당업자는 대상체의 나이, 신체 상태, 성별, 증상의 심각도, 및 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 요인에 따라 유효량을 결정할 수 있다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.

[0192] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는 부형제"는 대상체 및 활성 성분과 약리학적 및/또는 생리학적으로 적합한 부형제를 지칭하며, 당업계에 잘 알려져 있고(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR 편집, 19판. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995 참조), pH 조절제, 계면활성제, 보조제, 이온 강도 증강제, 희석제, 삼투압 유지제, 흡수 지연제, 방부제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, pH 조절제는 인산염 완충액을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 계면활성제는 양이온성, 음이온성 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween-80을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이온 강도 증강제는 염화나트륨을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 방부제는 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 삼투압 유지제는 당, NaCl 및 이의 유사체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 흡수 지연제는 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 희석제는 물, 수성 완충액(예를 들어, 완충 식염수), 알코올 및 폴리올(예를 들어, 글리세롤) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 보존제는 티메로살, 2-페녹시에탄올, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 안정화제는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가지며, 글루탐산나트륨, 젤라틴, SPGA, 당(예를 들어, 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 락토오스, 텍스트란 또는 글루코스), 아미노산(예를 들어, 글루탐산, 글리신), 단백질(예를 들어, 건조 유청, 알부민 또는 카제인) 또는 이들의 분해 산물(예를 들어, 락트알부민 가수분해물) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, 약물 중의 활성 성분의 원하는 활성을 안정화할 수 있는 것이다.

[0193] 본원에서 사용되는 포유동물의 예로는 인간, 비인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간과 같은 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서 대상체는 암 환자, 암이 있거나 암 발생 위험이 있는 인간 또는 동물이다. 본원에서 사용되는 용어 "환자"와 "대상체"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0194] 본원에 설명된 도면은 본 발명에 대한 추가적인 이해를 돕기 위해 사용되며 본 출원의 일부를 구성한다. 본 발명의 예시적인 예와 이의 설명은 본 발명을 설명하기 위한 것이며 본 발명의 부적절한 제한을 구성하지 않는다. 도면에서:

- 도 1은 본 출원에서 기술한 바와 같은 다중특이성 항체의 구조에 대한 개략도를 나타낸다.
- 도 2는 HER2를 과발현하는 세포 N87 및 CT26에서 검출된 인간 HER2에 대한 본 발명의 다중특이성 항체의 결합을 나타낸다.
- 도 3은 HER2를 과발현하는 세포 CHO-h4-1BB에서 검출된 인간 4-1BB에 대한 본 발명의 다중특이성 항체의 결합을 나타낸다.
- 도 4는 FcR에 대한 본 발명의 다중특이성 항체의 결합을 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 다중특이성 항체가 HER2 신호 의존성 세포인 N87 또는 SK-OV-3의 증식을 차단하는 것을 나타

낸다.

도 6은 본 발명의 다중특이성 항체가 HER2를 통해 ADCC 기능을 매개한다는 것을 나타낸다.

도 7은 HER2가 본 발명의 다중특이성 항체에 의해 유도된 일차 T 세포에 의한 사이토카인 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 의 방출을 매개한다는 것을 나타낸다.

도 8은 FcR이 본 발명의 다중특이성 항체에 의해 유도된 일차 T 세포에 의한 사이토카인 IL-2 및 IFN- $\gamma$ 의 방출을 매개한다는 것을 나타낸다.

도 9는 본 발명의 다중특이성 항체 HER2xHER2x4-1BB의 SEC 및 LC/MS 검출 결과를 나타낸다.

도 10은 CT26-h-HER2를 피하 접종한 h-4-1BB KI BALB/c 마우스의 종양 모델에서 본 발명의 다중특이성 항체의 종양 억제 활성을 나타내며, 여기서 도 10A는 투여 후 0 내지 15일차에 종양 용적에 대한 효과를 나타내고, 도 10B는 마우스 종양에서 CD8+T 세포 침윤을 나타낸다.

도 11은 CT26-h-HER2를 피하 접종한 h-4-1BB KI BALB/c 마우스의 종양 모델에서 본 발명의 다중특이성 항체의 종양 억제 활성을 나타낸다(투여 후 11 내지 27일차에 종양의 용적에 미치는 영향).

도 12는 MC38-h-HER2를 피하 접종한 h-4-1BB KI C57 마우스의 종양 모델에서 본 발명의 다중특이성 항체의 항종양 활성을 나타낸다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

#### **[0195] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 모델**

[0196] 본 발명의 기술적 해결책은 본 발명의 실시예 및 도면과 결합하여 명확하고 완전하게 설명될 것이다. 명백히, 설명된 실시예들은 본 발명의 실시예의 일부일 뿐이며, 전부는 아니다. 적어도 하나의 예시적인 실시예에 대한 다음의 설명은 실제로 단지 예시일 뿐이며, 본 발명 및 이의 적용 또는 용도에 대한 제한이 아니다. 본 발명의 실시예에 기초하여, 당업자가 창의적인 작업 없이 얻은 모든 다른 실시예는 본 발명의 범위 내의 것이다.

서열 정보 요약

서열 번호	설명
1	항-트라스투주맙 mAb 의 중쇄 가변 영역
2	항-트라스투주맙 mAb 의 경쇄 가변 영역
3	항퍼투주맙 mAb 의 중쇄 가변 영역
4	항퍼투주맙 mAb 의 경쇄 가변 영역
5	항-HER2 mAb 의 중쇄 가변 영역
6	항-HER2 mAb 의 경쇄 가변 영역
7	항-4-1BB 나노바디 AB24 ME 의 4-1BB 결합 영역
8	항-HER2 mAb VLCDR3
9	인간 $\kappa$ 경쇄 불변 영역 (CL)의 아미노산 서열
10	인간 G1 의 아미노산 서열
11	인간 IgG1 의 아미노산 서열 (Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이 도입)
12	인간 IgG1 의 아미노산 서열
13	CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열 CH SET1 (Knob 돌연변이 도입)
14	CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열 CH SET2 (Hole 돌연변이 도입)
15	CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 $\kappa$ 경쇄 불변 영역 (CL) 아미노산 서열 CL SET1
16	CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 $\kappa$ 경쇄 불변 영역 (CL) 아미노산 서열 CL SET2
17	(G4S)4G
18	(G4A)4
19	인간 IgG1 Fc 의 아미노산 서열
20	IgG1 Fc 의 아미노산 서열 (Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이 도입)
21	HER2x4-1BB-1 중쇄 (HER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #1)
22	HER2x4-1BB-1 경쇄 (HER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #2)
23	HER2x4-1BB-2 중쇄 (HER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #1)
24	HER2x4-1BB-2 경쇄 (HER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #2)

[0197]

25	HER2x4-1BB-3 중쇄 (HER2x4-1BB-3 펩타이드 사슬 #1)
26	HER2x4-1BB-3 경쇄 (HER2x4-1BB-3 펩타이드 사슬 #2)
27	HER2x HER2x4-1BB-1 중쇄 1 (HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #1)
28	HER2x HER2x4-1BB-1 경쇄 1 (HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #2)
29	HER2x HER2x4-1BB-1 중쇄 2 (HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #3)
30	HER2x HER2x4-1BB-1 경쇄 2 (HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #4)
31	항-4-1BB VHH-1
32	항-4-1BB VHH-2
33	우렐루맵 중쇄 (우렐루맵 펩타이드 사슬 #1)
34	우렐루맵 경쇄 (우렐루맵 펩타이드 사슬 #2)
35	PRS-343 중쇄 (PRS-343 펩타이드 사슬 #1)
36	PRS-343 경쇄 (PRS-343 펩타이드 사슬 #2)
37	인간 IgG1 아미노산 서열 HC-1
38	인간 IgG1 아미노산 서열 HC-2
39	HER2x HER2x4-1B-2 중쇄 1 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #1)
40	HER2x HER2x4-1B-2 경쇄 1 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #2)
41	HER2x HER2x4-1BB-2 중쇄 2 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #3)
42	HER2x HER2x4-1BB-2 경쇄 2 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #4)
43	항-4-1BB 니노바디 AB24 ME 의 CDR1
44	항-4-1BB 니노바디 AB24 ME 의 CDR2
45	항-4-1BB 니노바디 AB24 ME 의 CDR3
46	항-HER2 mAb VHCDR1
47	항-HER2 mAb VHCDR2
48	항-HER2 mAb VHCDR3
49	항-HER2 mAb VLCDR1
50	항-HER2 mAb VLCDR2

[0198]

[0199]

서열 번호 1: 항-트라스투주맙 mAb 중쇄 가변 영역

[0200]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD  
GFYAMDYWGQGLTVTVSS

[0201]

서열 번호 2: 항-트라스투주맙 mAb 경쇄 가변 영역

[0202]

DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYHTPPTFGQGT  
KVEIK

[0203]

서열 번호 3: 항-피투주맙 mAb 중쇄 가변 영역

[0204]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP  
SFYFDYWGQGLTVTVSS

[0205]

서열 번호 4: 항-피투주맙 mAb 경쇄 가변 영역

[0206]

DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGT  
KVEIK

- [0207] 서열 번호 5: 항-HER2 mAb 중쇄 가변 영역
- [0208] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIIYPTQGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGE  
GFYAMDYWGQGTLLTVSS
- [0209] 서열 번호 6: 항-HER2 mAb 경쇄 가변 영역
- [0210] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVQGAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFGSGRSRGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHSTTPPTFGQGT  
KVEIK
- [0211] 서열 번호 7: 항-4-1BB 니노바디 AB24 ME의 4-1BB 결합 영역
- [0212] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSTIVAMGWYRQAPGKQRELVASIIITGDDTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGY  
GSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS
- [0213] 서열 번호 8: 항-HER2 mAb VLCDR3
- [0214] QQHSTTPPT
- [0215] 서열 번호 9: 인간  $\kappa$  경쇄 불변 영역 (CL)의 아미노산 서열
- [0216] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC
- [0217] 서열 번호 10: 인간 IgG1의 아미노산 서열
- [0218] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0219] 서열 번호 11: 인간 IgG1의 아미노산 서열(Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이 도입)
- [0220] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0221] 서열 번호 12: 인간 IgG1의 아미노산 서열
- [0222] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0223] 서열 번호 13: CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열 CH SET1(Knob 돌연변이 도입)
- [0224] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCQVEDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYELSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0225] 서열 번호 14: CH1/CL 선호 돌연변이화 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열 CH SET2(Hole 돌연변이 도입)
- [0226] ASTKGPSVFPRAPSSKSTSGGTAALGCLVRDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0227] 서열 번호 15: CH1/CL 선호 돌연변이화 인간  $\kappa$  경쇄 불변 영역 (CL) 아미노산 서열 CL SET1
- [0228] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGRASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSRQLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

- [0229] 서열 번호 16: CH1/CL 선호 돌연변이화 인간  $\kappa$  경쇄 불변 영역 (CL) 아미노산 서열 CL SET2
- [0230] RTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVQCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSELTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0231] 서열 번호 17: (G4S)4G
- [0232] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
- [0233] 서열 번호 18: (G4A)4
- [0234] GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA
- [0235] 서열 번호 19: 인간 IgG1 Fc의 아미노산 서열
- [0236] THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0237] 서열 번호 20: 인간 IgG1 Fc의 아미노산 서열(Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이 도입)
- [0238] THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0239] 서열 번호 21: HER2x4-1BB-1 중쇄(HER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #1)
- [0240] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARITYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS
- [0241] 서열 번호 22: HER2x4-1BB-1 경쇄(HER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #2)
- [0242] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFYLSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0243] 서열 번호 23: HER2x4-1BB-2 중쇄(HER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #1)
- [0244] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARITYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDDTNYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS
- [0245] 서열 번호 24: HER2x4-1BB-2 경쇄(HER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #2)
- [0246] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFYLSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0247] 서열 번호 25: HER2x4-1BB-3 중쇄(HER2x4-1BB-3 펩타이드 사슬 #1)
- [0248] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWRQAPGKGLEWADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAPG

KQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

[0249] 서열 번호 26: HER2x4-1BB-3 경쇄(HER2x4-1BB-3 펩타이드 사슬 #2)

[0250] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC

[0251] 서열 번호 27: HER2xHER2x4-1BB-1 중쇄 1(HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #1)

[0252] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTQGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGG  
GFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCQVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYELSSVTVTPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSTIVAMGWYRQAP  
GKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

[0253] 서열 번호 28: HER2xHER2x4-1BB-1 경쇄 1(HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #2)

[0254] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVQGAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYLSYGVPSRFRSGSRSGDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHSTTPPTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGRASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSRLQLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC

[0255] 서열 번호 29: HER2xHER2x4-1BB-1 중쇄 2(HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #3)

[0256] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP  
SFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLPRAPSSKSTSGGTAALGCLVRDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV  
NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
VSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSTIVAMGWYRQAPG  
KQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

[0257] 서열 번호 30: HER2xHER2x4-1BB-1 경쇄 2(HER2xHER2x4-1BB-1 펩타이드 사슬 #4)

[0258] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVQCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSELTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC

[0259] 서열 번호 31: 항-4-1BB VHH-1

[0260] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSTIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

[0261] 서열 번호 32: 항-4-1BB VHH-2

[0262] THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSTIVAMGWYRQAPGKQRELVASIITGDGDTNYA  
DSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

[0263] 서열 번호 33: 우렐루맵 중쇄(우렐루맵 펩타이드 사슬 #1)

[0264] QVQLQWAGLLKPKSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKLEWIGEINHGYYTYNPSLESRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGP  
NYDWYFDLWGRGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC  
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSRLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

- [0265] 서열 번호 34: 우렐루맘 경쇄(우렐루맘 펩타이드 사슬 #2)
- [0266] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGG  
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC
- [0267] 서열 번호 35: PRS-343 중쇄(PRS-343 펩타이드 사슬 #1)
- [0268] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD  
GFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCN  
VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDMLIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGQDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWIYVVGAGNIRLREDKDP  
IKMMATIELKEDKSYDVTMVKFDDKCMYDIWTFVPGSQPGEFTLGIKSFPGHTSSLRVVSTNYNQHAMVFFKVFQNRREEFYITLYGRTKELTSELKE  
NFIKRFSLGLPENHIVFPVPIIDQCIDG
- [0269] 서열 번호 36: PRS-343 경쇄(PRS-343 펩타이드 사슬 #2)
- [0270] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC
- [0271] 서열 번호 37: 인간 IgG1 아미노산 서열 HC-1
- [0272] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNINNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDMLIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTEPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLLSVLTVDKSRWQEGNVF  
SCVMHEALHNHYTQKLSLSPG
- [0273] 서열 번호 38: 인간 IgG1 아미노산 서열 HC-2
- [0274] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNINNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDMLIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLLSVLTVDKSRWQEGNVF  
SCVMHEALHNHYTQKLSLSPG
- [0275] 서열 번호 39: HER2xHER2x4-1B-2 중쇄 1 (HER2xHER2x4-1B-2 펩타이드 사슬 #1)
- [0276] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD  
GFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDMLIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTEPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
LLSVLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGGGAQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAP  
GKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS
- [0277] 서열 번호 40: HER2xHER2x4-1B-2 경쇄 1 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #2)
- [0278] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC
- [0279] 서열 번호 41: HER2xHER2x4-1BB-2 중쇄 2 (HER2xHER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #3)
- [0280] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP  
SFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCN  
NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDMLIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
YSKLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGGGAQVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGSTFSIVAMGWYRQAP  
GKQRELVASIITGDGDTNYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYARTGYGSSELEGHEYDYWGQGTQVTVSS

- [0281] 서열 번호 42: HER2x HER2x4-1BB-2 경쇄 2 (HER2x HER2x4-1BB-2 펩타이드 사슬 #4)
- [0282] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGT  
KVEIKRTVAAPSVMIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGEC
- [0283] 서열 번호 43: 항-4-1BB 니노바디 AB24 ME의 CDR1
- [0284] GSTFSIVA
- [0285] 서열 번호 44: 항-4-1BB 니노바디 AB24 ME의 CDR2
- [0286] IITGDGDT
- [0287] 서열 번호 45: 항-4-1BB 니노바디 AB24 ME의 CDR3
- [0288] YARTGYGSSELEGHEYDY
- [0289] 서열 번호 46: 항-HER2 mAb VHCDR1
- [0290] GFNIKDTY
- [0291] 서열 번호 47: 항-HER2 mAb VHCDR2
- [0292] IYPTQGYT
- [0293] 서열 번호 48: 항-HER2 mAb VHCDR3
- [0294] SRWGGEGFYAMDY
- [0295] 서열 번호 49: 항-HER2 mAb VLCDR1
- [0296] QSVQGA
- [0297] 서열 번호 50: 항-HER2 mAb VLCDR2
- [0298] SAS
- [0299] 실시예 1. 다중특이성 항체의 클로닝 및 발현
- [0300] 이 실시예에서는, 3개의 HER2x4-1BB 이중특이성 항체, 2개의 항-HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체 및 2개의 4-1BB 모노클로날 항체가 각각 작제되었다:
- [0301] HER2x4-1BB-1: 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되었으며, 구조 개략도는 도 1에 나와 있다. 펩타이드 사슬 #1은 서열 번호 21에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: WO1992022653A1)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 1)과 인간 IgG1 아미노산 서열(서열 번호 10)을 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 22에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: WO1992022653A1)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 2) 및 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간  $\kappa$  경쇄 불변 영역(CL)의 아미노산 서열(서열 번호 9)을 포함하고 있다.
- [0302] HER2x4-1BB-2: 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되며, 이의 구조적 개략도는 도 1에 나와 있다. 펩타이드 사슬 #1은 서열 번호 23에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: WO1992022653A1)의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 1)과 인간 IgG1 아미노산 서열(Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이 도입, 서열 번호 11)을 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 24에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: WO1992022653A1)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 2)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간  $\kappa$  경쇄 불변 영역(CL)의 아미노산 서열(서열 번호 9)을 포함하고 있다.
- [0303] HER2x4-1BB-3: 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되었으며, 이의 구조적 개략도는 도 1에 나와 있다. 펩타이드 사

슬 #1은 서열 번호 25에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 3)과 인간 IgG1 아미노산 서열(서열 번호 12)을 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 4)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간 κ 경쇄 불변 영역(CL)의 아미노산 서열(서열 번호 9)을 포함하고 있다.

[0304] HER2xHER2x4-1BB-1: 4개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되었으며, 이의 구조적 개략도는 도 1에 나와 있다. 펩타이드 사슬 #1은 서열 번호 27에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 5)과 인간 IgG1 아미노산 서열(CH3 Knob 돌연변이 및 CH1/CL 선호 돌연변이가 도입됨) CH SET1(특허 출원 번호: W02021067404A2, 서열 번호 13)을 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 6)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간 κ 경쇄 불변 영역(CL) 아미노산 서열(CH1/CL 선호 돌연변이 도입) CL SET1(특허 출원 번호: W02021067404A2, 서열 번호 15)을 포함하고 있다. 펩타이드 사슬 #3은 서열 번호 29에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열 번호 3)과 인간 IgG1 아미노산 서열(CH3 Hole 돌연변이 및 CH1/CL 선호 돌연변이가 도입됨) CH SET2(특허 출원 번호: W02021067404A2, 서열 번호 14)를 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기의 유연한 펩타이드(G4A)4(서열 번호 18)를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #4는 서열 번호 30에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 4)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간 κ 경쇄 불변 영역(CL) 아미노산 서열(CH1/CL 선호 돌연변이가 도입됨) CL SET2(특허 출원 번호: W02021067404A2, 서열 번호 16)를 포함하고 있다.

[0305] HER2xHER2x4-1BB-2: 4개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되었으며, 이의 구조적 개략도는 도 1에 나와 있다. 펩타이드 사슬 #1은 특허(특허 출원 번호: 201611016435.0)에 기술된 방법에 따라 합성되었고, 서열 번호 39에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: W01992022653A1)의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 1)과 자발적으로 이종 이량체를 형성할 수 있는 인간 IgG1 아미노산 서열 HC-1(서열 번호 37, 특허 출원 번호: PCT/CN2017/111310)을 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(특허 출원 번호: W01992022653A1)의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 2)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간 κ 경쇄 불변 영역(CL) 아미노산 서열(서열 번호 9)을 포함하고 있다. 특허(특허 출원 번호: 201611016435.0)에 기술된 합성 방법에 따른 펩타이드 사슬 #3은 서열 번호 41에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 3)과 자발적으로 이종 이량체를 형성할 수 있는 인간 IgG1 아미노산 서열 HC-2(서열 번호 38, 특허 출원 번호: PCT/CN2017/111310)를 포함하고 있다. 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 20개 아미노산 잔기(G4A)4(서열 번호 18)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다. 펩타이드 사슬 #4는 서열 번호 42에 제시된 아미노산 서열을 가지고 있으며, 이는 항-HER2 모노클로날 항체 퍼투주맙(특허 출원 번호: US7449184)의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열 번호 4)과 VL 아미노산 서열의 C-말단에 인간 κ 경쇄 불변 영역(CL) 아미노산 서열(서열 번호 9)을 포함하고 있다.

[0306] 항-4-1BB-VHH-1: 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되고 서열 번호 31에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 이는 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열(서열 번호 19)을 포함하고, 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 21개 아미노산 잔기(G4S)4G(서열 번호 17)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다.

[0307] 항-4-1BB-VHH-2: 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되고 서열 번호 32에 제시된 아미노산 서열을 가지며, 이는 인간 IgG1 Fc 아미노산 서열(Fc 기능을 감소시키기 위해 LALA 돌연변이가 도입됨, 서열 번호 20)을 포함하고, 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단은 21개 아미노산 잔

기(G4S)4G(서열 번호 17)의 유연한 펩타이드를 통해 Fc의 C-말단에 연결되었다.

[0308] 이 실시예에서는, 양성 대조 분자 우렐루맵 및 PRS343을 작제하였다:

[0309] 우렐루맵: 대조 분자 우렐루맵(특허 출원 번호: WO2004010947)은 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되며, 여기서 펩타이드 사슬 #1은 서열 번호 33에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 34에 제시된 아미노산 서열을 가진다.

[0310] PRS-343: 대조 분자 PRS-343(특허 출원 번호: WO2016177802A1)은 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되며, 여기서 펩타이드 사슬 #1은 서열 번호 35에 제시된 아미노산 서열을 갖고, 펩타이드 사슬 #2는 서열 번호 36에 제시된 아미노산 서열을 가진다.

[0311] 실시예 2. 인간 HER2에 대한 다중특이성 항체 결합

[0312] 이 실험에서는, 확장 및 배양된 N87 세포(HER2 자가 발현) 및 CT26-hHER2(인간 HER2 과발현) 세포를 0.25% EDTA 트립신으로 소화시키고 배양 배지로 1회 세척하였다. 세포 밀도를  $2 \times 10^6$  세포/ml로 조정하였다. 생성된 현탁액을 96-웰 유동 플레이트에 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고 나중 사용을 위해 원심분리하였다. 구배 희석한 항체를 세포가 있는 상기 96-웰 유동 플레이트에 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 2% BSA 용액으로 1000배 희석한 염소 항-인간 IgG-Fc(PE)(Abcam, ab98596)를 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 최종적으로 100  $\mu$ l/웰로 PBS에 현탁시키고 CytoFlex(Beckman) 유세포 분석기로 검출하여 해당 평균 형광 강도(MFI)를 계산하였다.

[0313] 실험 결과를 도 2 및 표 1-2에 나타내었다. 본 발명의 모든 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체 및 HER2x4-1BB 이중특이성 항체는 인간 위암 세포 N87(도 2A) 및 인간 HER2 과발현 CT26 세포(도 2B)에서 발현된 HER2에 결합할 수 있었으며, 결합 활성은 HER2 모노클로날 항체(트라스투주맵 또는 퍼투주맵)와 유사하였다.

**표 1**

[0314] 인간 위암 세포 N87에서 과발현되는 HER2에 대한 다중특이성 항체의 결합

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	1.876
HER2×4-1BB-3	2.769
HER2×HER2×4-1BB-1	2.650
HER2×HER2×4-1BB-2	2.877
트라스투주맵	1.441
퍼투주맵	1.737
PRS-343 유사체	1.253
항-4-1BB vHH-1	N/A
우렐루맵 유사체	N/A
Neg Ctrl	N/A

**표 2**

[0315] CT26에서 과발현된 인간 HER2에 대한 다중특이성 항체의 결합

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	1.170
HER2×4-1BB-3	1.755
HER2×HER2×4-1BB-1	1.823
HER2×HER2×4-1BB-2	1.812
트라스투주맵	1.084
퍼투주맵	1.171
PRS-343 유사체	1.080
항-4-1BB vHH-1	N/A
우렐루맵 유사체	N/A
Neg Ctrl	N/A

[0316] 실시예 3. 인간 4-1BB에 대한 다중특이성 항체의 결합

[0317] 이 실험에서는, 확장 및 배양된 CHOS-h4-1BB(인간 4-1BB를 과발현) 세포를  $2 \times 10^6$  세포/ml의 세포 밀도로 조정하고 96-웰 유동 플레이트에 100  $\mu$ l/웰로 첨가한 다음, 나중 사용을 위해 원심분리하였다. 구배 희석한 항체를 상기 96-웰 유동 플레이트에 100  $\mu$ l/웰의 세포로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 2% BSA 용액으로 1000배 희석한 염소 항 인간 IgG-Fc(PE)(Abcam, ab98596)를 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 최종적으로 PBS에 100  $\mu$ l/웰로 재현탁하고 CytoFlex(Beckman) 유세포 분석기로 검출한 다음, 해당 MFI를 계산하였다.

[0318] 실험 결과를 도 3 및 표 3에 나타내었다. 본 발명의 모든 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체 및 HER2x4-1BB 이중특이성 항체는 CHOS-h4-1BB 세포에 결합할 수 있었고, 결합 활성은 4-1BB 모노클로날 항체(항-4-1BB VHH)와 유사했으며, 대조 항체인 우렐루맵 및 PRS-343 보다 약했다.

**표 3**

[0319] CHOS 세포에서 과발현되는 인간 4-1BB에 대한 다중특이성 항체의 결합

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	7.853
HER2×4-1BB-3	10.900
HER2×HER2×4-1BB-1	6.990
HER2×HER2×4-1BB-2	6.003
트라스투주맵	N/A
퍼투주맵	N/A
PRS-343 유사체	2.960
항-4-1BB vHH-1	4.605
우렐루맵 유사체	0.316
Neg Ctrl	N/A

[0320] 실시예 4. 인간 FcR에 대한 다중특이성 항체의 결합

[0321] 이 실험에서는, 확장 및 배양된 THP-1(FcR 자가 발현) 및 CHOS-hCD32b(인간 Fc  $\gamma$  RI Ib 과발현) 세포를  $2 \times 10^6$  세포/ml의 세포 밀도로 조정하여 96-웰 유동 플레이트에 웰당 100  $\mu$ l로 첨가한 후 나중 사용을 위해 원심분리하였다. 구배 희석한 항체를 세포가 있는 상기 96-웰 유동 플레이트에 웰당 100  $\mu$ l로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 2% BSA 용액으로 1000배 희석한 염소 항-인간 IgG-Fc(PE)(Abcam, ab98596)를 웰당 100  $\mu$ l로 첨가하고 4  $^{\circ}$ C에서 60분 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 최종적으로 PBS에 100  $\mu$ l/웰로 재현탁하고 CytoFlex (Beckman) 유세포 분석기로 검출한 후, 해당 평균 형광 강도 (MFI)를 계산하였다.

[0322] 실험 결과를 도 4 및 표 4-5에 나타내었다. 본 발명의 Fc 이펙터 기능을 유지하는 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체 및 HER2x4-1BB 이중특이성 항체는 모두 THP-1(FcR 자가 발현, 도 4A) 및 CHOS-hCD32b(인간 FcR 과발현, 도 4B) 세포에서 발현되는 Fc  $\gamma$  RI Ib에 결합할 수 있었다. HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체의 Fc는 노브-인-홀 (Knob in Hole) 돌연변이를 채택하였으므로, FcR과의 결합 활성은 야생형 인간 IgG1 Fc를 채택한 HER2x4-1BB 이중특이성 항체 및 HER2 모노클로날 항체보다 다소 약했다. 우렐루맵과 PRS-343의 Fc는 각각 야생형 인간 IgG4 Fc 또는 FALA 돌연변이를 지닌 인간 IgG4 Fc를 채택했으므로 Fc 이펙터 기능을 유지하는 다중특이성 항체보다 FcR과의 친화성이 약했다.

**표 4**

[0323] FcR(THP-1)에 대한 다중특이성 항체의 결합

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	1.224
HER2×4-1BB-3	1.053
HER2×HER2×4-1BB-1	1.224
HER2×HER2×4-1BB-2	2.274

트라스투주맙	0.731
퍼투주맙	0.716
PRS-343 유사체	N/A
항-4-1BB vHH-1	N/A
우렐루맙 유사체	0.462
Neg Ctrl	N/A

**표 5**

FcR에 대한 다중특이성 항체의 결합(CHOS-hCD32b)

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	52.600
HER2×4-1BB-3	3.416
HER2×HER2×4-1BB-1	1.064
트라스투주맙	14.120
퍼투주맙	1.355
PRS-343 유사체	N/A
항-4-1BB vHH-1	N/A
우렐루맙 유사체	65.240
Neg Ctrl	N/A

[0325] 실시예 5. 다중특이성 항체에 의한 HER2 신호 의존성 세포의 증식 억제

[0326] 이 실험에서는, 확장 및 배양된 N87 및 SK-OV-3(HER2 자가 발현) 세포를 0.25% EDTA 트립신으로 소화하고 배양 배지로 1회 세척하였다. 세포 밀도를  $5 \times 10^4$  세포/ml로 조정하였다. 생성된 현탁액을 나중 사용을 위해 96-웰 플레이트에 80  $\mu$ l/웰로 첨가하였다. 구매 회석한 항체를 세포가 있는 상기 96-웰 플레이트에 80  $\mu$ l/웰로 첨가하고 세포 배양 인큐베이터에서 3-5일 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(Promega, G7572) 키트를 신호 생성에 사용하고 마이크로플레이트 리더를 사용하여 화학 발광 신호를 수집하였다.

[0327] 도 5A 및 5B에 나타난 바와 같이, 다중특이성 항체는 N87 또는 SK-OV-3 세포의 증식을 현저히 억제할 수 있었고, 여기서 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체는 HER2-4-1BB 이중특이성 항체 또는 HER2 모노클로날 항체보다 세포 증식에 대해 현저히 강한 억제 효과를 가졌다. 또한, HER2 항체의 중앙 세포에 대한 억제 효과는 세포에서의 HER2 발현 수준과 양의 상관관계를 가졌다. HER2 발현 수준이 높을수록 항체의 세포 증식에 대한 억제 효과가 더욱 현저해졌다.

[0328] 실시예 6. 다중특이성 항체에 의한 ADCC 효과(리포터 유전자) 유도

[0329] 이 실험에서는, 확장 및 배양된 N87(HER2 자가 발현) 세포 및 CHOS-h4-1BB(인간 4-1BB 과발현) 세포를  $1.2 \times 10^5$ /웰의 NFAT 루시퍼라제/Jurkat CD16a(CD16a 및 NFAT-Luc 과발현) 이펙터 세포와  $3 \times 10^4$ /웰로 혼합하고 96-웰 세포 배양용 흰색 바닥 플레이트에 접종하였다. 그런 다음, 농도 구매 회석한 다중특이성 항체를 96-웰 플레이트에 첨가하여 혼합한 후, 세포 배양 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 신호 생성에 Bio-Glo 루시퍼라제 검정 시스템(Promega, G7940) 키트를 사용하고, ELISA 기기를 사용하여 화학발광 신호를 수집하였다.

[0330] 실험 결과를 도 6A 및 6C와 표 6-7에 나타내었다. Fc 이펙터 기능을 유지하는 다중특이성 항체는 N87 세포에서 발현되는 HER2를 통해 ADCC 효과를 매개하여 Jurkat 세포에서 CD16a-NFAT 신호 전달 경로를 활성화할 수 있었다. 반면, LALA 돌연변이가 있는 HER2x4-1BB-2 이중특이성 항체는 Fc 이펙터 기능을 폐지하지 못했을 뿐만 아니라, FALA 돌연변이가 있는 IgG4 Fc를 기반으로 하는 대조 분자 PRS-343은 ADCC 효과를 입증하지도 못했다. 또한, 도 6B에 나타난 바와 같이 CHOS-h4-1BB 세포를 표적 세포로 사용했을 때, 다중특이성 항체 중 어느 것도 4-1BB 세포에 대해 검출 가능한 ADCC 효과를 나타내지 않았다.

**표 6**

[0331]

다중특이성 항체에 의해 유도된 ADCC 효과(도 6A에 상응)

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-1	0.232
HER2×4-1BB-3	0.367
HER2×4-1BB-1+HER2×4-1BB-3	0.114
HER2×HER2×4-1BB-1	0.313
HER2×HER2×4-1BB-2	0.391
트라스투주맵	0.097
피투주맵	0.185
트라스투주맵+피투주맵	0.051
PRS-343 유사체	N/A
우렐루맵 유사체	N/A
항 4-1BB vHH-1	N/A
Neg Ctrl	N/A

**표 7**

[0332]

다중특이성 항체에 의해 유도된 ADCC 효과(도 6C에 상응)

항체	EC <sub>50</sub> (nM)
HER2×4-1BB-2	N/A
HER2×4-1BB-1	0.360
PRS-343 유사체	N/A
우렐루맵 유사체	N/A
트라스투주맵	0.121
항 4-1BB vHH-2	N/A
Neg Ctrl	N/A

[0333]

실시예 7. 다중특이성 항체에 의한 일차 T 세포의 사이토카인 방출 유도(HER2+ 세포에 의한 매개)

[0334]

확장 및 배양된 표적 세포 N87(HER2 자가 발현)을 0.25% EDTA 트립신으로 소화하고 96-웰 배양 플레이트에  $1 \times 10^4$  세포/웰로 접종하였다(배양 플레이트를 하루 전에  $2 \mu\text{g/ml}$  항-CD3 항체를  $100 \mu\text{l}$ /웰로 코팅하였다). 하루 전에 회수한 PBMC를 수집하고 T 세포 단리 키트(Stemcell, 17951)를 사용하여 PBMC 중의 T 세포를 단리하여  $5 \times 10^4$ /웰로 표적 세포 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 구매 희석된 다중특이성 항체를 세포 웰에 첨가하고 48시간 동안 인큐베이션한 후 상층액을 수집하였다. 인간 IL-2 ELISA 키트(Invitrogen, 88-7025-77) 및 인간 IFN $\gamma$  ELISA 키트(Invitrogen, 88-7316-77)를 사용하여 상층액 중의 IL-2 및 IFN $\gamma$  수준을 검출하였다.

[0335]

실험 결과를 도 7에 나타내었다. 본 발명의 모든 다중특이성 항체는 N87 세포의 존재 하에 일차 T 세포가 IL-2(도 7A) 또는 IFN- $\gamma$ (도 7B)를 방출하도록 유도할 수 있었으며, 용량 의존성을 나타내었다. 또한, HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체는 HER2x4-1BB 이중특이성 항체 및 대조 항체인 PRS-343 및 우렐루맵과 비교하여 상당히 강한 사이토카인 방출 유도 능력을 보였다.

[0336]

실시예 8. 다중특이성 항체에 의한 일차 T 세포의 사이토카인 방출 유도(FcR+ 세포에 의한 매개)

[0337]

확장 및 배양된 표적 세포 CHOS-hCD32b(인간 Fc $\gamma$ RIIb 과발현)를 원심분리하여 계수한 후 96-웰 배양 플레이트에  $1 \times 10^4$  세포/웰로 접종하였다(배양 플레이트를 하루 전에  $2 \mu\text{g/ml}$ 의 항-CD3 항체를  $100 \mu\text{l}$ /웰로 코팅시킴). 하루 전에 회수한 PBMC를 수집하고, T 세포 단리 키트(Stemcell, 17951)를 사용하여 PBMC 중의 T 세포를 단리하고  $5 \times 10^4$  세포/웰로 표적 세포 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 구매 희석된 다중특이성 항체를 세포 웰에 첨가하고 48시간 동안 인큐베이션한 다음, 상층액을 수집하였다. 인간 IL-2 ELISA 키트(Invitrogen, 88-7025-77) 및 인간 IFN $\gamma$  ELISA 키트(Invitrogen, 88-7316-77)를 사용하여 상층액 중의 IL-2 및 IFN $\gamma$  수준을 검출하였다.

[0338]

실험 결과를 도 8에 나타내었다. 본 발명의 다중특이성 항체 중 어느 것도 CHOS-hCD32b 세포의 존재 하에서 일차 T 세포에 의한 IL2(도 8A) 또는 IFN- $\gamma$ (도 8B)의 방출을 유도할 수 없었다. 반면, 양성 대조 항체인 우렐루맵은 FcR 결합을 통해 T 세포 활성화와 전염증성 인자 방출을 성공적으로 유도하였다. 또한, 음성 대조 분자인

PRS-343은 CHOS-hCD32b 세포에 결합하지 않아 FcR 상호 작용을 통해 일차 T 세포에서 사이토카인 방출을 유도하지 못했다.

[0339] 실시예 9. 세포주 스크리닝

[0340] 이 실시예에서는, CH1/CL 선호 돌연변이(특허 번호: WO2021/067404A2) 및 노브-인-홀(Knob in hole) 기술을 사용하여 항-HER2 항체 및 퍼투주맙 항체의 중쇄 가변 영역을 각각 CH1 돌연변이 CH SET1(서열 번호 13) 및 CH SET2(서열 번호 14)로 작제하였고, 항-CD137 단일 도메인 항체 AB24 ME의 CD137 결합 영역 아미노산 서열(서열 번호 7)의 N-말단을 20개 아미노산 잔기의 유연한 펩타이드(G4A)4(서열 번호 18)를 통해 Fc의 C-말단에 연결하였다. 항-HER2 항체 및 퍼투주맙 항체의 경쇄 가변 영역을 각각 CL 돌연변이 경쇄 불변 영역의 CL SET1(서열 번호 15) 및 CL SET2(서열 번호 16)로 작제하였다. 1+1 비대칭 항-HER2xHER2x4-1BB-1 삼중특이성 항체 세포주를 작제하였다.

[0341] 세포주 작제

[0342] 항-HER2 항체 및 항-4-1BB 항체의 중쇄 유전자(서열 번호 27) 및 경쇄 유전자(서열 번호 28)를 가지는 벡터 pCHO2.0-GS-Puro-H1-L1 및 항-퍼투주맙 항-4-1BB 항체의 중쇄 유전자(서열 번호 29) 및 경쇄 유전자(서열 번호 30)를 가지는 벡터 pCHO2.0-GS-Puro-H2-L2를 전기천공법을 통해 숙주 세포 CHOS-ADP에 공동 형질감염시켰다. 퓨로마이신 및 MSX 스크리닝 압력을 가하여 형질감염된 세포에 압력 스크리닝을 수행하여 고수율 미니풀을 선택하였다. 이어서 한계 희석을 한 차례 실시한 후 모노클로날 식별을 실시하여 고수율 안정 세포주를 단리하였다.

[0343] 세포 배양

[0344] Dynamis AGT Medium을 기본 배지로 사용하고, 세포를  $(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 집중한 후, 유가식(fed-batch) 배양을 실시하였다. 3일차, 5일차, 7일차, 9일차 및 11일차에, 세포 부스트 7a 분말 보충제(Cell boost 7a powder supplement)를 초기 배양 무게의  $5.0 \pm 0.5\%$  (w/w)로 첨가하고, 세포 부스트 7b 분말 보충제를 초기 배양 무게의  $0.5 \pm 0.05\%$  (w/w)로 첨가하였다. 용존 산소를 40%로 설정했고, 초기 배양 온도는  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ 였으며 4일째에  $33.0\text{ }^\circ\text{C}$ 로 내렸다. 글루코스 농도 측정을 기준으로, 수확일을 제외하고 세포 배양액에서 글루코스 농도가  $6.0\text{ g/L}$ 가 되도록 매일  $300\text{ g/kg}$ 의 글루코스 농축액을 첨가하였다. 배양을 14일에, 또는 세포 생존율이 80% 이하로 떨어지면 종료하였다. 배양 과정 전체에 걸쳐 Vcell 분석기(Beckman)를 사용하여 세포 밀도 및 생존율을 모니터링하였다. 7일차부터 시작해서 매일 Cedex 분석기(Roche)를 사용하여 항체 생산을 측정하였다.

[0345] 안정한 세포주 산물의 품질 평가

[0346] 실시예 1에서 1-아암 항체에 사용된 것과 동일한 1-단계 친화성 정제 방법을 사용하였다. HPLC를 사용하여 단백질 순도를 얻었다. HPLC 방법은 다음과 같다: 이동상:  $150\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0. 크로마토그래피 조건: 검출 파장:  $280\text{ nm}$ , 컬럼 온도:  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 유량:  $0.5\text{ ml/분}$ , 검출 시간: 30분, TSKgel G3000SWXL 컬럼. SEC 결과로도 9A에 나타내었으며, 1-단계 친화 정제로 얻은 이중특이성 항체의 순도는 98.3%였다.

[0347] 단백질의 중쇄와 경쇄의 쌍 형성을 액상 시스템 Vanquish UHPLC(Thermo), 질량 분석기 Q Exactive(Thermo) 및 크로마토그래피 컬럼 Waters ACQUITY UPLC BEH C4,  $2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ 를 사용하여 고성능 액체 크로마토그래피-질량 분석법을 통해 검출하였다. 샘플  $50\text{ }\mu\text{g}$ 을 취해 초순수 물로  $25\text{ }\mu\text{l}$ 로 희석하고 원심분리하였다. 그런 다음 샘플  $20\text{ }\mu\text{l}$ 를 취해 샘플 바이알에 옮기고  $5\text{ }\mu\text{l}$ 를 주입한 후 LC-MS를 사용하여 손상되지 않은 분자량을 분석하였다. 크로마토그래피 조건은 다음과 같다: 컬럼 온도:  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; UV 검출 파장:  $280\text{ nm}$ ; 유량:  $0.3\text{ mL/분}$ ; 이동상 A: 0.1% 포름산이 함유된 물; 이동상 B: 0.1% 포름산이 함유된 아세트니트릴. 질량 분석 파라미터는 다음과 같다: ESI 이온원: 이온 전달 튜브 온도:  $320\text{ }^\circ\text{C}$ , 전압:  $3.8\text{ kV}$ , 가스 유량:  $36\text{ L/분}$ ; 모드: 양이온 Full MS; 분해능: 17500; 스캐닝 범위:  $600\text{--}4000\text{ m/z}$ . 결과를 도 9B 및 9C에 나타내었다. 정제된 삼중특이성 항체 HER2xHER2x4-1BB-1의 올바른 사슬 쌍 형성 비율은 98%를 초과하였다.

[0348] 실시예 10. 다중특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구

[0349] 이 실험에서는, 본 발명의 다중특이성 항체의 항종양 활성화에 대한 개념 검증을 CT26-h-HER2를 피하 집중한 h-4-1BB KI BALB/c 마우스를 이용한 종양 모델에서 수행하였다.

[0350] 먼저, CT26-h-HER2 세포의 피하 집중을 통해 종양을 가진 마우스 모델을 확립하였다. 종양이 약  $180\text{ mm}^3$ 의 용적으로 성장하면 마우스를 무작위로 그룹으로 나누고 다음을 복강 내 주입을 통해 투여 처리하였다: G1: PBS, G2:  $2.5\text{ mg/kg}$  PRS-343, G3:  $2\text{ mg/kg}$  트라스투주맙, G4:  $2.3\text{ mg/kg}$  HER2x4-1BB-1, 및 G5:  $2.3\text{ mg/kg}$  HER2x4-1BB-

2(모든 그룹은 동등한 몰 용량으로 처리됨). 각 그룹의 마우스의 종양 용적 및 체중 변화를 2 내지 3주의 기간 동안 회당 2 내지 3일마다 모니터링하였다. 복용량과 투여 일정을 표 8에 나타내었다. 실험 후, 마우스의 종양을 채취하고 면역조직화학 검출을 실시하여 다른 그룹의 종양에서의 CD8+T 세포의 침윤과 비교하였다.

[0351] 실험 결과를 도 10A에 나타내었다. Fc 이펙터 기능을 유지하는 이중특이성 항체 HER2x4-1BB-1은 Fc 이펙터 기능을 폐지하는 LALA 돌연변이가 있는 HER2x4-1BB-2 이중특이성 항체(TGI: 73.2% 대 26.6%), 대조 항체 PRS-343(TGI: 6.5%) 및 HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(TGI: 4.2%)과 비교하여 월등한 항종양 활성을 보였다. 마찬가지로, 면역조직화학 검출 결과(도 10B) 또한 HER2x4-1BB-1 이중특이성 항체로 처리한 마우스 종양에서 CD8+T 세포 침윤이 대조 항체인 PRS-343, 트라스투주맙 및 HER2x4-1BB-2 이중특이성 항체로 처리한 마우스다 훨씬 강한 것으로 나타났다.

**표 8**

[0352] 다중특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구를 위한 투여 요법

그룹	투여량	투여 횟수 × 투여 빈도
G1: 음성 대조군(PBS)	N/A	Q2d×4
G2: PRS-343	2.5 mg/kg	Q2d×4
G3: 트라스투주맙	2mg/kg	Q2d×4
G4: HER2x4-1BB-1	2.3 mg/kg	Q2d×4
G5: HER2x4-1BB-2	2.3 mg/kg	Q2d×4

[0353] 실시예 11. 다중 특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구

[0354] 이 실험에서는, 본 발명의 다중특이성 항체의 항종양 활성을 CT26-h-HER2를 피하 접종한 h-4-1BB KI BALB/c 마우스를 사용한 종양 모델에서 평가하였다.

[0355] 먼저, h-HER2 CT26 세포의 피하 접종을 통해 종양을 가진 마우스 모델을 확립하였다. 종양이 약 180 mm<sup>3</sup>의 용적으로 성장하면, 마우스를 무작위로 그룹으로 나누고 복강 내 주사를 통해 다음을 투여하였다: G1: PBS, G2: 3 mg/kg 트라스투주맙과 3 mg/kg 퍼투주맙의 조합, G3: 3.6 mg/kg PRS-343, G4: 3 mg/kg 엔허투(DS8201), G5: 3.6 mg/kg HER2x4-1BB-1, G6: 3.6 mg/kg HER2x4-1BB-3, G7: 1.8 mg/kg HER2x4-1BB-1과 1.8 mg/kg HER2x4-1BB-3의 조합, G8: 3.6 mg/kg HER2xHER2x4-1BB-2(모든 그룹은 동등한 몰 용량으로 처리되었다). 각 그룹의 마우스의 종양 용적 및 체중 변화를 2 내지 3주의 기간 동안 회당 2 내지 3일마다 모니터링하였다. 복용량과 투여 일정을 표 9에 나타내었다.

[0356] 실험 결과를 도 11에 나타내었다. HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체 분자의 항종양 활성(TGI: 85.7%)은 등몰 대조 항체인 PRS-343(TGI: 37.7%), 엔허투(TGI: 47.7%) 및 HER2 모노클로날 항체인 트라스투주맙과 퍼투주맙의 조합(TGI: 39.5%)보다 상당히 뛰어났다. 또한 HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체는 HER2x4-1BB 이중특이성 항체 HER2x4-1BB-1(TGI: 66.9%) 및 HER2x4-1BB-3(TGI: 59.7%)과 비교하여 상당히 강한 항종양 활성을 나타냈으며, HER2x4-1BB 이중특이성 항체의 조합으로 처리된 그룹(HER2x4-1BB-1+HER2x4-1BB-3, TGI: 83.7%)과 비슷한 효능을 보였다.

**표 9**

[0357] 다중특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구를 위한 투여 요법

그룹	투여량	투여 횟수 × 투여 빈도
G1: 음성 대조군(PBS)	N/A	Q2d×4
G2: 트라스투주맙+퍼투주맙	3+3 mg/kg	Q2d×4
G3: PRS-343	3.6mg/kg	Q2d×4
G4: 엔허투	3 mg/kg	Q2d×4
G5: HER2x4-1BB-1	3.6 mg/kg	Q2d×4
G6: HER2x4-1BB-3	3.6 mg/kg	Q2d×4
G7: HER2x4-1BB-1+ HER2x4-1BB-3	1.8+1.8mg/kg	Q2d×4
G8: HER2x HER2x4-1BB-2	3.6 mg/kg	Q2d×4

- [0358] 실시예 12. 다중 특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구
- [0359] 이 실험에서는, 본 발명의 다중특이성 항체의 항종양 활성을 MC38-h-HER2를 피하 접종한 h-4-1BB KI C57 마우스를 이용한 종양 모델에서 평가하였다.
- [0360] 먼저, MC38-h-HER2 세포의 피하 접종을 통해 종양을 가진 마우스 모델을 확립하였다. 종양이 약 100 mm<sup>3</sup>의 용적으로 성장하면, 마우스를 무작위로 그룹으로 나누고 복강 내 주사를 통해 다음을 투여하였다: G1: PBS, G2: 3 mg/kg 트라스투주맙과 3 mg/kg 퍼투주맙의 조합, G3: 3.6 mg/kg PRS-343, G4: 3 mg/kg 엔허투(DS8201), G5: 1.8 mg/kg HER2x4-1BB-1과 1.8 mg/kg HER2x4-1BB-3의 조합, G6: 3.6 mg/kg HER2xHER2x4-1BB-1(모든 그룹은 동일한 물 용량으로 처리되었다). 각 그룹의 마우스의 종양 용적 및 체중 변화를 2 내지 3주의 기간 동안 해당 2 내지 3일마다 모니터링하였다. 복용량과 투여 일정을 표 10에 나타내었다.
- [0361] 결과를 도 12에 나타내었다. HER2xHER2x4-1BB 삼중특이성 항체로 처리된 모든 마우스는 완전한 종양 퇴행을 보였으며, 이는 등물 대조 항체인 PRS-343(TGI: 54.9%)과 HER2 모노클로날 항체의 조합(트라스투주맙 + 퍼투주맙, TGI: 63.8%)에 비해 상당히 우수한 효능을 입증한다. 또한, 이 종양 모델에서 HER2x4-1BB 이중특이성 항체(HER2x4-1BB-1 + HER2x4-1BB-3)의 조합으로 처리한 그룹과 엔허투로 처리한 그룹도 완전한 종양 퇴행을 달성하였다.

**표 10**

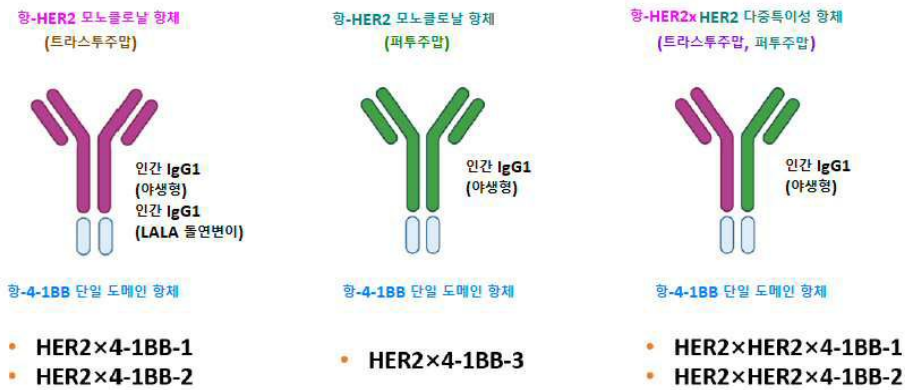
[0362] 다중특이성 항체의 종양 억제 활성화에 대한 연구를 위한 투여 요법

그룹	투여량	투여 횟수 × 투여 빈도
G1: 음성 대조군(PBS)	N/A	Q3d×2
G2: 트라스투주맙+퍼투주맙	3+3 mg/kg	Q3d×2
G3: PRS-343	3.6 mg/kg	Q3d×2
G4: 엔허투	3 mg/kg	Q3d×2
G5: HER2x4-1BB-1+ HER2x4-1BB-3	1.8+1.8 mg/kg	Q3d×2
G6: HER2x HER2x4-1BB-1	3.6 mg/kg	Q3d×2

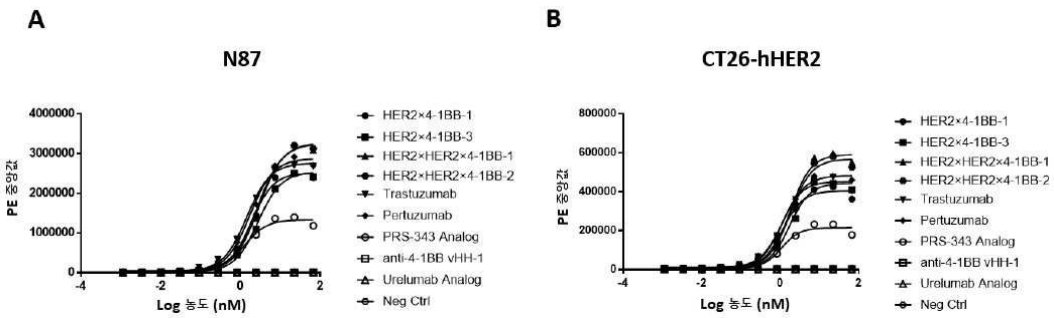
- [0363] 1. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 127-37.
- [0364] 2. Oh, D.Y. and Y.J. Bang, *HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. 17(1): p. 33-48.
- [0365] 3. Schaer, D.A., D. Hirschhorn-Cymerman, and J.D. Wolchok, *Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2014. 2: p. 7.
- [0366] 4. Chen, S., et al., *Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model*. Cancer Immunol Res, 2015. 3(2): p. 149-60.
- [0367] 본 발명의 구체적인 실시양태가 상세히 설명되었지만, 당업자라면 개시된 모든 교시에 기초하여 이러한 세부 사항에 다양한 수정 및 대체가 이루어질 수 있으며, 이러한 변경은 본 발명의 범위 내에 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 전체 범위는 이어지는 청구범위 및 이의 모든 등가물에 의해 제공된다.

도면

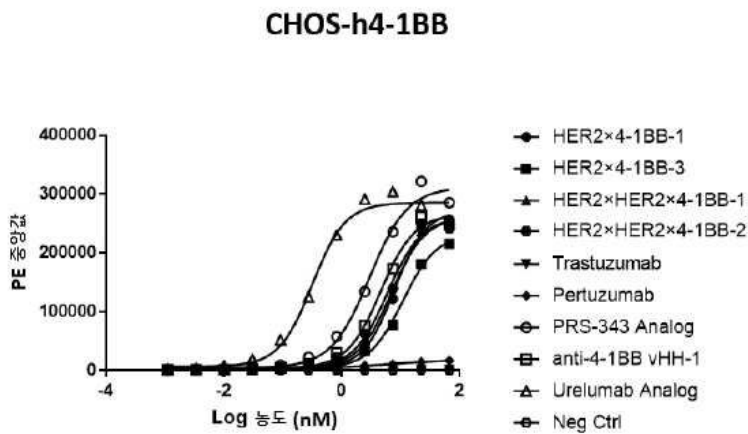
도면1



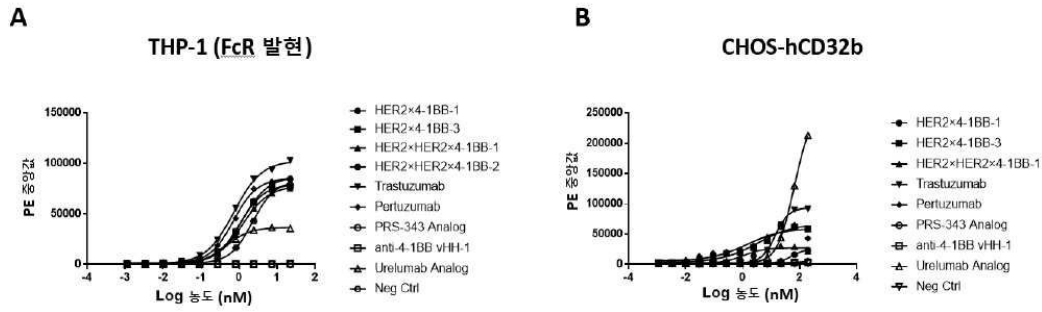
도면2



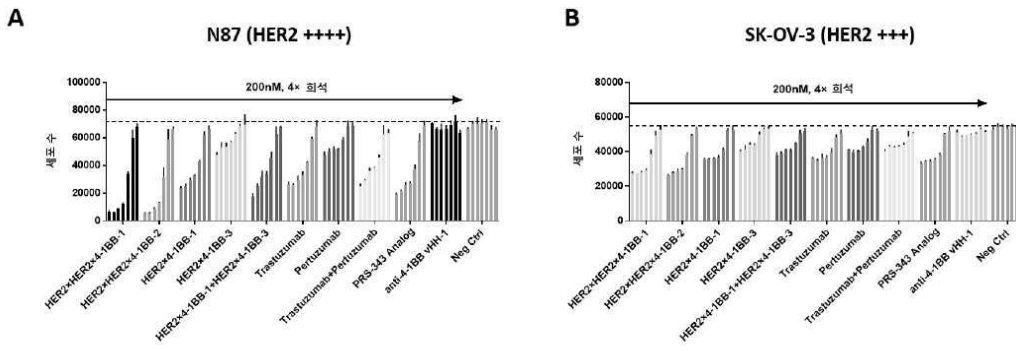
도면3



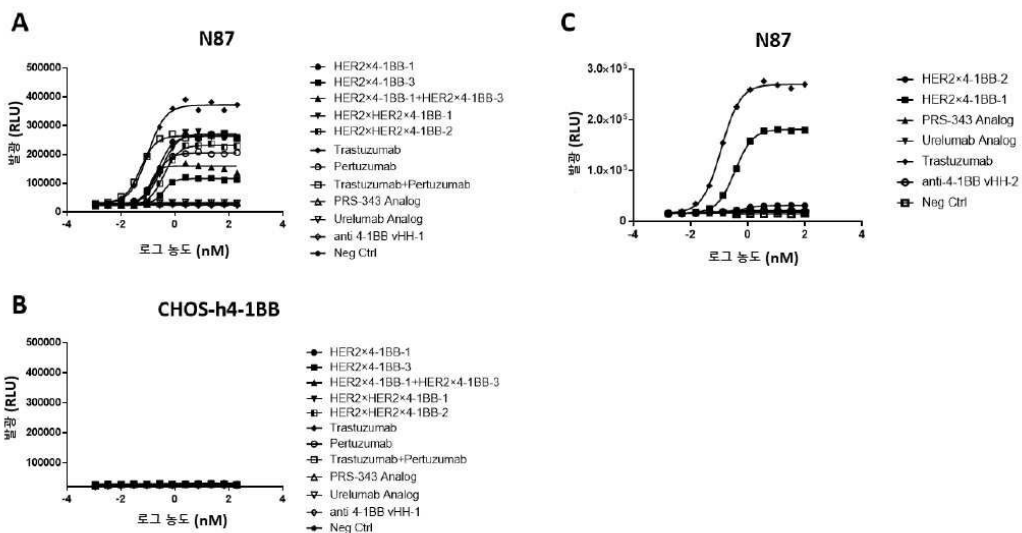
도면4



도면5

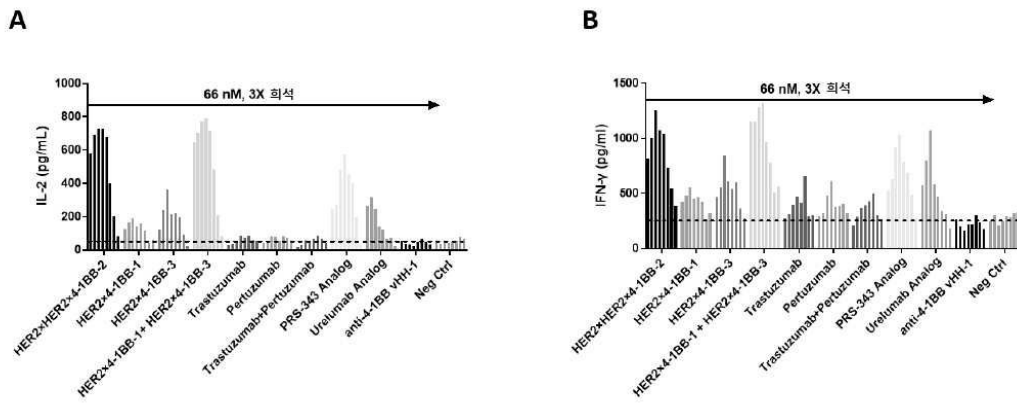


도면6



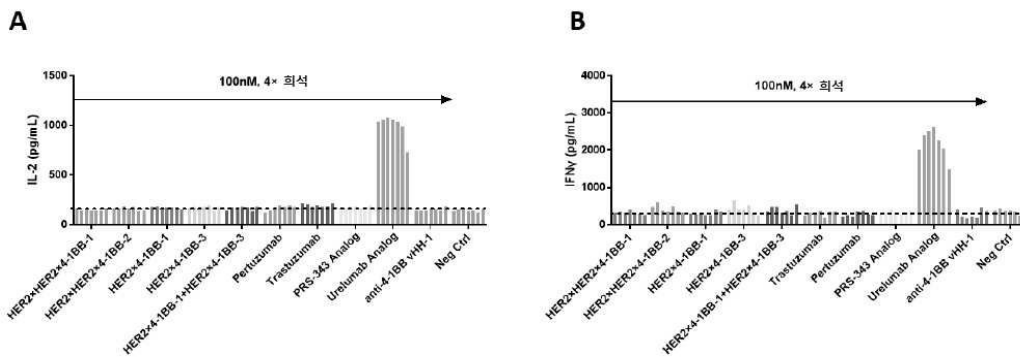
도면7

N87 + 일차 T 세포



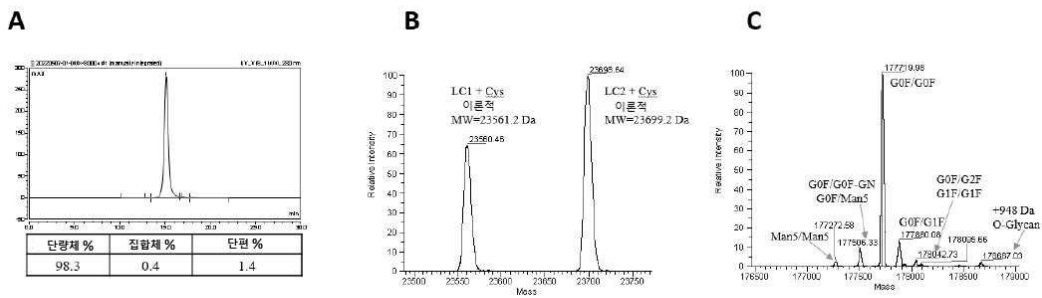
도면8

CHOS-hCD32b + 일차 T 세포



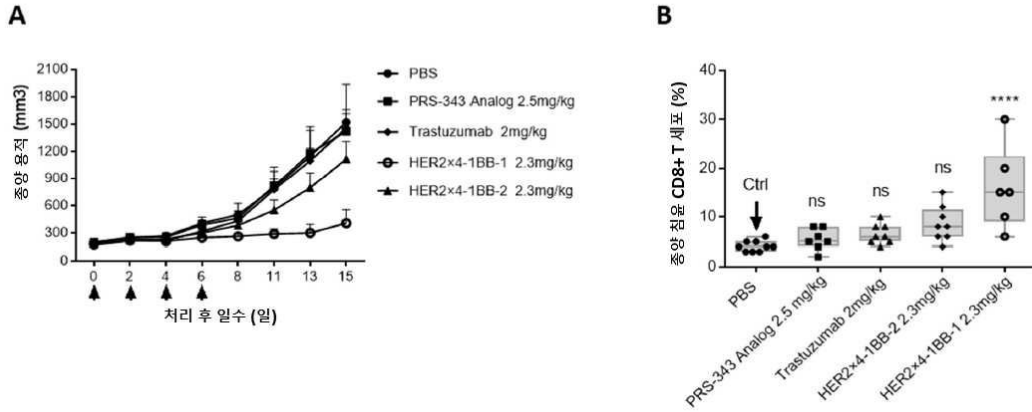
도면9

HER2xHER2x4-1BB-1 의 SEC 및 LC/MS



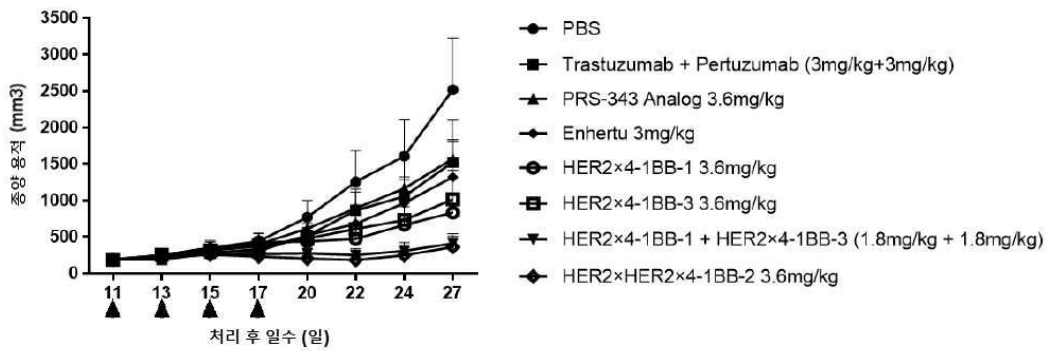
도면10

인간 41BB KI Balb/c 마우스에서 CT26-hHer2



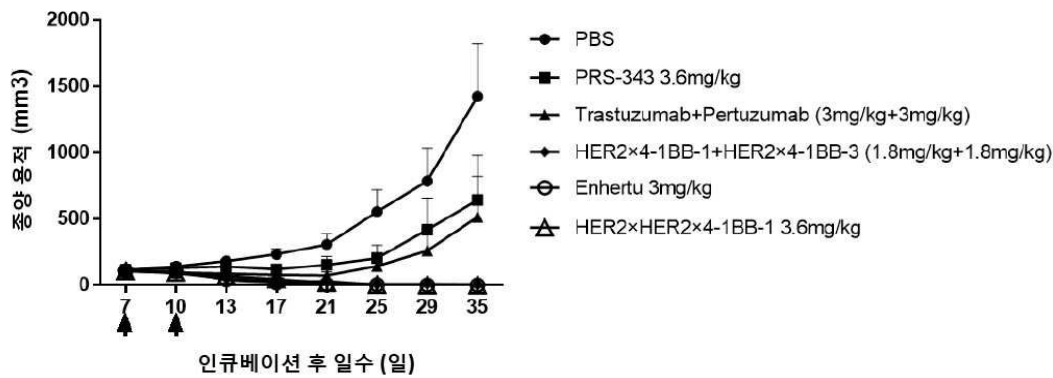
도면11

인간 41BB KI Balb/c 마우스에서 CT26-hHer2



도면12

인간 41BB KI C57 마우스에서 MC38-hHer2



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.