(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0133694
(43) 공개일자 2024년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/71* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7019286
(22) 출원일자(국제) 2022년12월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/053125
(87) 국제공개번호 WO 2023/140950
국제공개일자 2023년07월27일
(30) 우선권주장
63/300,440 2022년01월18일 미국(US)

(71) 출원인
에프비디 바이올로직스 리미티드
홍콩 카오룬 침사추이 차탐 로드 사우쓰 17-19 엠프레스 플라자 20/에프 플랫 02-03 룸 5
(72) 발명자
왕, 지인-타앙
대만 411013 타이충 시티 타이핑 디스트릭트 종샨 로드 섹션 2 넘버 84
쳉, 치-링
대만 115 타이페이 시티 난강 디스트릭트 파크 스트리트 넘버 8 3플로어 룸 3
주오, 종 션
대만 231 뉴 타이페이 시티 신디안 디스트릭트 베이신 로드 섹션 3 라인 65 넘버 6
(74) 대리인
박장원

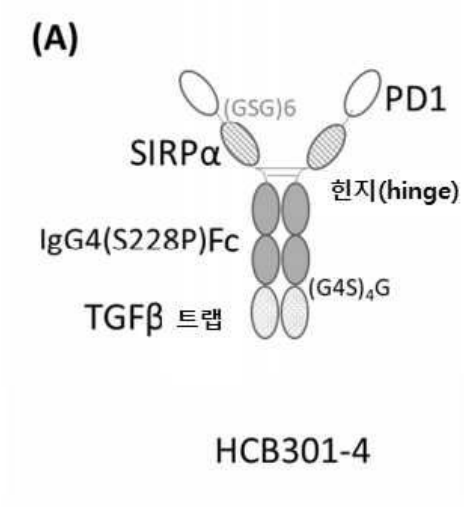
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 **CD47/PD-L1 표적화 단백질 복합체 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 CD47, PD-L1 및/또는 TGFβ를 표적화하는 단백질 복합체, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 일 양태에서, 단백질 복합체는 각각 SIRPα 세포외 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 하나 이상의 CD47-결합 도메인; 각각 PD-1 세포외 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 하나 이상의 PD-L1-결합 도메인; 및 임의로 각각 TGFBR2 세포외 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 하나 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70503 (2013.01)
C07K 14/70532 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

단백질 복합체로서,

(a) Fc;

(b) CD47-결합 도메인; 및

(c) PD-L1(프로그램화된 사멸 리간드 1)-결합 도메인을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, TGFβ(형질전환 성장 인자 베타)-결합 도메인을 추가로 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CD47-결합 도메인이 CD47을 발현하는 세포(예컨대, 암 세포)에 결합할 수 있고/있거나 CD47과 신호 조절 단백질 α(SIRPα) 사이의 상호작용을 차단할 수 있는, 단백질 복합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CD47-결합 도메인이 SIRPα 세포외 도메인(예컨대, 인간 SIRPα 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CD47-결합 도메인이 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)인, 단백질 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD47-결합 도메인이 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 PD-L1을 발현하는 세포(예컨대, 암 세포)에 결합할 수 있고/있거나 PD-L1과 프로그램화된 세포 사멸 단백질(PD-1) 사이의 상호작용을 차단할 수 있는, 단백질 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 PD-1 세포외 도메인(예컨대, 인간 PD-1 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)인, 단백질 복합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 11

제2항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 TGFβ를 캡쳐(capture)함으로써 면역 반응을 증가시키고/시키거나 종양 미세환경을 개선시킬 수 있는, 단백질 복합체.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 TGFBR2 세포외 도메인(예컨대, 인간 TGFBR2 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 13

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 항-TGFβ 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)인, 단백질 복합체.

청구항 14

제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, Fc가 인간 IgG4 Fc인, 단백질 복합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD47-결합 도메인이 임의로 힌지 영역(hinge region)을 통해, Fc내 CH2 도메인의 N-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 17

제16항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 임의로 링커 펩타이드를 통해, CD47-결합 도메인의 N-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1-결합 도메인이 임의로 힌지 영역을 통해, Fc 내 CH2 도메인의 N-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 19

제18항에 있어서, CD47-결합 도메인이 임의로 링커 펩타이드를 통해, PD-L1-결합 도메인의 N-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 힌지 영역이 임의로 EU 넘버링(EU numbering)에 따른 S228P 돌연변이를 지닌 인간 IgG4 힌지 영역인, 단백질 복합체.

청구항 21

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 임의로 링커 펩타이드를 통해, Fc 내 CH3 도메인의 C-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 복합체가 2개 이상의 CD47-결합 도메인을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 복합체가 2개 이상의 PD-L1-결합 도메인을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 복합체가 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 25

단백질 복합체로서,

(a) N-말단으로부터 C-말단까지: 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의의 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

(b) N-말단으로부터 C-말단까지: 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 26

제25항에 있어서, 제1 PD-L1 결합 도메인 및/또는 제2 PD-L1 결합 도메인이 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 제1 CD47-결합 도메인 및/또는 제2 CD47-결합 도메인이 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 TGFβ-결합 도메인 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인이 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 힌지 영역 및/또는 제2 힌지 영역이 서열 번호: 16에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역이 서열 번호: 17에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 링커 펩타이드 및/또는 제3 링커 펩타이드가 서열 번호: 8에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 펩타이드 및/또는 제4 링커 펩타이드가 서열 번호: 9에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드가 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드가 제3 PD-L1 결합 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩타이드가 제4 PD-L1 결합 도메인을 추가로 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 35

제34항에 있어서, 제3 PD-L1 결합 도메인 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인이 서열 번호: 5에 대해 적어도 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, PD-L1 결합 도메인이 임의로 제5 링커 펩타이드를 통해, 제1 PD-L1 결합 도메인의 N-말단에 연결되고, 제4 PD-L1-결합 도메인이 임의로 제6 링커 펩타이드를 통해, 제2 PD-L1-결합 도메인의 N-말단에 연결되는, 단백질 복합체.

청구항 37

제36항에 있어서, 제5 링커 펩타이드 및/또는 제6 링커 펩타이드가 서열 번호: 10에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드가 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 39

단백질 복합체로서,

(a) N-말단으로부터 C-말단까지: 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의의 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

(b) N-말단으로부터 C-말단까지: 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 40

제39항에 있어서, 제1 CD47-결합 도메인 및/또는 제2 CD47-결합 도메인이 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 제1 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인이 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 TGFβ-결합 도메인 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인이 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 힌지 영역 및/또는 제2 힌지 영역이 서열 번호: 16에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 44

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역이 서열 번호: 17에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 링커 펩타이드 및/또는 제3 링커 펩타이드가 서열 번호: 8에

대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 46

제39항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 링커 펩타이드 및/또는 제4 링커 펩타이드가 서열 번호: 9에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 47

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드가 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 48

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드가 제3 PD-L1-결합 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩타이드가 제4 PD-L1-결합 도메인을 추가로 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 49

제48항에 있어서, 제3 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인이 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 제3 PD-L1-결합 도메인이 임의로 제1 PD-L1 결합 도메인과 제3 PD-L1-결합 도메인 사이의 제5 링커 펩타이드를 통해, 제1 PD-L1-결합 도메인과 제1 힌지 영역 사이에서 융합되고, 제4 PD-L1-결합 도메인이 임의로 제2 PD-L1-결합 도메인과 제4 PD-L1-결합 도메인 사이의 제6 링커 펩타이드를 통해, 제2 PD-L1-결합 도메인과 제2 힌지 영역 사이에서 융합되는, 단백질 복합체.

청구항 51

제50항에 있어서, 제5 링커 펩타이드 및/또는 제6 링커 펩타이드가 서열 번호: 10에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드가 서열 번호: 4에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 단백질 복합체.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체를 암호화(encoding)하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산.

청구항 54

제53항에 있어서, 핵산이 DNA(예컨대, cDNA) 또는 RNA(예컨대, mRNA)인, 핵산.

청구항 55

제53항 또는 제54항의 핵산 중 하나 이상을 포함하는 벡터.

청구항 56

제55항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 세포가 CHO 세포인, 세포.

청구항 58

제53항 또는 제54항의 핵산 중 하나 이상을 포함하는 세포.

청구항 59

단백질 복합체를 생산하는 방법으로서, 방법이

(a) 세포가 단백질 복합체를 생산하기에 충분한 조건 하에서 제56항 내지 제58항 중 어느 한 항의 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 세포에 의해 생산된 단백질 복합체를 수집하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

치료제에 공유결합된, 제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체를 포함하는 단백질 접합체.

청구항 61

제60항에 있어서, 치료제가 세포독성제 또는 세포정지제(cytostatic agent)인, 단백질 접합체.

청구항 62

암을 가진 대상체를 치료하는 방법으로서, 방법이 제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체, 또는 제60항 또는 제61항의 단백질 접합체를 포함하는 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 대상체가 CD47 및/또는 PD-L1을 발현하는 암 세포를 갖고 있는, 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 암이 유방암(breast cancer), 전립선암(prostate cancer), 비-소 세포 폐암(non-small cell lung cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 중피종(mesothelioma), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 결장암(colon cancer), 흉막 종양(pleural tumor), 교모세포종(glioblastoma), 식도암(esophageal cancer), 위암(gastric cancer), 윤활막 육종(synovial sarcoma), 흉선 암종(thymic carcinoma), 자궁내막 암종(endometrial carcinoma), 위장암(stomach cancer), 담관암종(cholangiocarcinoma), 두경부암(head and neck cancer), 혈액암(blood cancer), 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 65

종양 성장의 속도를 감소시키는 방법으로서, 방법이

종양 세포를 유효량의 제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체, 또는 제60항 또는 제61항의 단백질 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 66

종양 세포를 사멸시키는 방법으로서, 방법이

종양 세포를 유효량의 제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체, 또는 제60항 또는 제61항의 단백질 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 67

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 단백질 복합체, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 개시내용은 2022년 1월 18일자로 출원된 미국 가특허원 일련 번호 제 63/300,440호에 대한 우선권 및 이의 이익을 주장하며, 이는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 52246-0002WO1_SL_ST26.xml이란 명칭의 XML 파일로서 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. 2022년 12월 15일자로 생성된, XML 파일은 크기가 24,297 바이트이다. XML 파일의 자료는 이의 전문이 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 개시내용은 CD47 및 PD-L1을 표적화(targeting)하는 단백질 복합체 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 신호 조절 단백질 α(SIRPα)는 SIRP 계열의 조절성 막 당단백질이다. 이는 주로 골수 세포에 의해 발현되며, 또한 줄기세포 또는 뉴우런에 의해서도 발현된다. SIRPα는 억제성 수용체로 작용하며 광범위하게 발현되는 막관통 단백질 CD47과 상호작용한다. 이러한 상호작용은 숙주 세포 식세포작용과 같은 선천성 면역 세포의 효과기 기능(effector function)을 부정적으로 제어한다. SIRPα는 대식세포 막에서 측방향으로 확산되어 식세포 시냅스에 축적되어 CD47에 결합하며, 이는 대식세포에 의한 식균작용의 세포골격-집약적 과정을 억제한다. CD47은 신호 조절 단백질 알파(SIRPα)의 N-말단에 결합하여 "먹지 마세요(do not eat)" 신호를 제공한다. CD47은 많은 다양한 종양 세포에서 과발현되는 것으로 밝혀졌다. CD47 및/또는 SIRPα를 표적화하는 것은 암 면역치료요법에 유용할 수 있다. 그러나, CD47은 또한 적혈 세포(red blood cell; RBC) 및 혈소판에서 또한 발현되기 때문에, CD47/SIRPα 상호작용을 억제하면 RBC 및 혈소판의 식세포작용을 유발할 수 있다. 프로그램화된 사멸-1(PD-1)은 면역 체크포인트이며, 조절성 T 세포에서 세포자멸사(apoptosis)를 동시에 감소시키면서 림프 절 내 항원-특이적인 T 세포에서 세포자멸사를 촉진하는 이중 메커니즘을 통해 자가면역성에 대해 보호한다. CD47/SIRPα 경로 및/또는 PD-1/PD-L1 경로를 표적화하는 치료요법을 개발할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 CD47 및 PD-L1을 표적화하는 단백질 복합체, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 일부 경우에, 단백질 복합체는 또한 TGFβ를 표적화할 수 있다.

[0009] 일 양태에서, 본 개시내용은 (a) Fc; (b) CD47-결합 도메인; 및 (c) PD-L1(프로그램화된 사멸-리간드 1)-결합 도메인을 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체는 TGFβ(형질전환 성장 인자 베타)-결합 도메인을 추가로 포함한다.

[0010] 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 CD47을 발현하는 세포(예컨대, 암세포)에 결합할 수 있고/있거나 CD47과 신호 조절성 단백질 α(SIRPα) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 SIRPα 세포외 도메인(예컨대, 인간 SIRPα 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 항-CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)이다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-L1을 발현하는 세포(예컨대, 암세포)에 결합할 수 있고/있거나 PD-L1과 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1(PD-1) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-1 세포외 도메인(예컨대, 인간 PD-1 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)이다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ를 포획(capture)함으로써 면역 반응을 증가시키고/시키거나 종양 미세환경을 개선시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFBR2 세포외 도메인(예컨대, 인간 TGFBR2 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-TGFβ 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH)이다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 서열 번호: 7에

대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 실시형태에서, Fc는 인간 IgG4 Fc이다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 임의로 힌지 영역(hinge region)을 통해, Fc 내 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 임의로 링커 펩타이드를 통해, CD47-결합 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 임의로 힌지 영역을 통해, Fc 내 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 임의로 링커 펩타이드를 통해, PD-L1-결합 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 임의로 EU 넘버링(EU numbering)에 따른 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 힌지 영역이다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 임의로 링커 펩타이드를 통해, Fc 내 CH3 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0014] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 PD-L1-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

[0015] 일 양태에서, 본 개시내용은 (a) N-말단으로부터 C-말단까지: 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의의 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (b) N-말단으로부터 C-말단까지: 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 단백질 복합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 제1 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 CD47-결합 도메인 및/또는 제2 CD47-결합 도메인은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 TGFβ-결합 도메인 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 힌지 영역 및/또는 제2 힌지 영역은 서열 번호: 16에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역은 임의로 C-말단에 첨가된 라이신 또는 알라닌 잔기와 함께, 서열 번호: 17에 해해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 링커 펩타이드 및/또는 제3 링커 펩타이드는 서열 번호: 8에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 링커 펩타이드 및/또는 제4 링커 펩타이드는 서열 번호: 9에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 제3 PD-L1 결합 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 제4 PD-L1-결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 PD-L1-결합 도메인은 임의로 제5 링커 펩타이드를 통해, 제1 PD-L1 결합 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제4 PD-L1-결합 도메인은 임의로 제6 링커 펩타이드를 통해, 제2 PD-L1-결합 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제5 링커 펩타이드 및/또는 제6 링커 펩타이드는 서열 번호: 10에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0017] 일 양태에서, 본 개시내용은 (a) N-말단으로부터 C-말단까지 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의의 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (b) N-말단으로부터 C-말단까지: 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 단백질 복합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 제1 CD47-결합 도메인 및/또는 제2 CD47-결합 도메인은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 TGFβ-결합 도메인 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 힌지 영역은 및/또는 제2 힌지 영역은 서열 번호: 16에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Fc 영역 및/또는 제2 Fc 영역은 임의로 C-말단에 첨가된 라이신 또는 알라닌 잔기를 지닌, 서열 번호: 17에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 링커 펩타이드 및/또는 제3 링커 펩타이드는 서열 번호: 8에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 링커 펩타이드 및/또는 제4 링커 펩타이드는 서열 번호: 9에 대해 적

어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 제3 PD-L1 결합 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 제4 PD-L1 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 PD-L1-결합 도메인 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 PD-L1-결합 도메인은 임의로 제1 PD-L1-결합 도메인과 제3 PD-L1-결합 도메인 사이의 제5 링커 펩타이드를 통해, 제1 PD-L1-결합 도메인과 제1 힌지 영역 사이에 융합되고, 일부 실시형태에서, 제4 PD-L1-결합 도메인은 임의로 제2 PD-L1-결합 도메인과 제4 PD-L1-결합 도메인 사이의 제6 링커 펩타이드를 통해, 제2 PD-L1-결합 도메인과 제2 힌지 영역 사이에 융합된다. 일부 실시형태에서, 제5 링커 펩타이드 및/또는 제6 링커 펩타이드는 서열 번호: 10에 대해 적어도 80% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 4에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0019] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체를 암호화(encoding)하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 DNA(예컨대, cDNA) 또는 RNA(예컨대, mRNA)이다.

[0020] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 핵산 중 하나 이상을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0021] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0022] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 핵산 중 하나 이상을 포함하는 세포에 관한 것이다.

[0023] 일 양태에서 본 개시내용은 단백질 복합체를 생산하는 방법으로서, 이러한 방법은 (a) 세포가 단백질 복합체를 생산하기에 충분한 조건 하에서 본원에 기술된 바와 같은 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 세포에 의해 생산된 단백질 복합체를 수집하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0024] 일 양태에서, 본 개시내용은 치료제에 공유결합으로 결합된, 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체를 포함하는 단백질 접합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 치료제는 세포독성제 또는 세포정지제(cytostatic agent)이다.

[0025] 일 양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 이러한 방법은 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체 또는 본원에 기술된 바와 같은 단백질 접합체를 포함하는 치료학적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 CD47 및/또는 PD-L1을 발현하는 암세포를 갖는다. 일부 실시형태에서, 암은 유방암(breast cancer), 전립선암(prostate cancer), 비-소 세포 폐암(non-small cell lung cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 중피종(mesothelioma), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 결장암(colon cancer), 흉막 종양(pleural tumor), 교모세포종(glioblastoma), 식도암(esophageal cancer), 위암(gastric cancer), 윤활막 육종(synovial sarcoma), 흉선 암종(thymic carcinoma), 자궁내막 암종(endometrial carcinoma), 위장암(stomach cancer), 담관암종(cholangiocarcinoma), 두경부암(head and neck cancer), 혈액암(blood cancer), 또는 이의 조합이다.

[0026] 일 양태에서, 본 개시내용은 종양 성장의 속도를 감소시키는 방법으로서, 이러한 방법은 종양 세포를 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체, 또는 본원에 기술된 바와 같은 단백질 접합체를 포함하는 조성물 유효량과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0027] 일 양태에서, 본 개시내용은 종양 세포를 사멸시키는 방법으로서, 이러한 방법은 종양 세포를 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체, 또는 본원에 기술된 바와 같은 단백질 접합체를 포함하는 조성물 유효량과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 바와 같은 단백질 복합체, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "단백질 복합체" 또는 "단백질 작제물(construct)"은 하나 이상의 폴리펩타이드를 갖는 복합체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 폴리펩타이드를 가지며, 여기서 폴리펩타이드는 서로 연합하여, 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "CD47-결합 도메인"은 CD47에 결합할 수 있는 단백질 도메인을 지칭한다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 항-CD47 항체, 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH), 또는 CD47 결합 단백질 또는 이의 일부일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 하나 이상의 자가-안정화 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 SIRPα 세포외 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. SIRPα는 야생형 SIRPα, 인간 SIRPα, 야생형 SIRPα로부터 유래된 폴리펩타이드(예컨대, 돌연변이를 지님), 또는 이의 일부(예컨대, SIRPα의 세포외 영역, 또는 SIRPα의 IgV 도메인)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 야생형 SIRPα로부터 유래된 폴리펩타이드는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 SIRPα 또는 이의 변이체의 전체 세포외 영역을 실질적으로 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 SIRPα의 IgV 도메인 또는 이의 변이체를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, IgV 도메인은 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 하나 이상의 돌연변이를 갖는다.

[0031] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "PD-L1 결합 도메인"은 PD-L1에 결합할 수 있는 단백질 도메인을 지칭한다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 항-PD-L1 항체, 이의 항원-결합 단편(예컨대, scFv 또는 VHH), 또는 PD-L1-결합 단백질 또는 이의 일부일 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 하나 이상의 자가-안정화 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-1 세포외 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. PD-1은 야생형 PD-1, 인간 PD-1, 야생형 PD-1로부터 유래된 폴리펩타이드(예컨대, 돌연변이를 가짐), 또는 이의 일부(예컨대, PD-1의 세포외 영역)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 야생형 PD-1로부터 유래된 폴리펩타이드는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-1 세포외 도메인은 PD-1의 전체 세포외 영역 또는 이의 변이체를 실질적으로 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, PD-1 세포외 도메인은 PD-1의 세포외 영역의 일부 또는 이의 변이체를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, PD-1 세포외 도메인은 하나 이상의 돌연변이를 갖는다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "암"은 자발적인 성장을 위한 능력을 갖는 세포를 지칭한다. 이러한 세포의 예는 빠르게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상적인 상태(abnormal state) 또는 병태(condition)를 갖는 세포를 포함한다. 이러한 용어는 암성 성장, 예컨대, 종양; 조직병리학적 유형이나 침습 단계에 관계없이, 종양 발생 과정(oncogenic process), 전이 조직 및 악성으로 변형된 세포, 조직 또는 기관을 포함함을 의미한다. 또한 다양한 기관계, 예를 들면, 호흡기계, 심혈관계, 신장계, 생식계, 혈액계, 신경계, 간계(hepatic system), 위장계 및 내분비계의 악성 종양 뿐만 아니라; 악성종양, 예를 들면, 대부분의 결장암(colon cancer), 신-세포 암종(renal-cell carcinoma), 전립선암(prostate cancer) 및/또는 고환 종양(testicular tumors), 폐의 비-소세포 암종(non-small cell carcinoma of the lung), 및 소장의 암(cancer of the small intestine)을 포함하는 선암종(adenocarcinoma)이 포함된다. "자연적으로 발생하는" 암은 암 세포를 대상체 내로 이식함에 의한 실험적으로 유도되지 않은 모든 암을 포함하며, 예를 들면, 자연 발생 암, 환자가 발암물질(들)에 노출되어 유발된 암, 형질전환 종양유전자(transgenic oncogene)의 삽입 또는 종양 억제인자 유전자(tumor suppressor gene)의 녹아웃(knockout)으로부터 야기되는 암, 및 감염, 예컨대, 바이러스 감염에 의해 유발된 암을 포함한다. 용어 "암종"은 당업계에 인식되어 있으며 상피 또는 내분비 조직의 악성종양을 지칭한다. 이러한 용어는 암성 조직과 육종성 조직으로 구성된 악성 종양을 포함하는 암육종(carcinosarcoma)를 포함한다. "선암종"은 선 조직(glandular tissue)으로부터 유래되거나 종양 세포가 인식가능한 선 구조를 형성하는 암종을 지칭한다. 용어 "육종"은 당업계에 인식되어 있으며 중간엽 유래의 악성 종양을 지칭한다. 용어 "조혈 신생물 장애(hematopoietic neoplastic disorder)"는 조혈 기원의 과형성(hyperplastic)/신생물 세포와 관련된 질환을 포함한다. 조혈 신생물 장애는 골수, 림프구 또는 적혈구 계통, 또는 이의 전구 세포(precursor cell)로부터 발생할 수 있다. 혈액암은 골수와 같은 혈액-형성 조직, 또는 면역계의 세포에서 시작되는 암이다. 혈액암의 예는 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma), 및 다발성 골수종(multiple myeloma)을 포함한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체" 및 "환자"는 명세서 전반에 걸쳐 상호교환적으로 사용되며, 본 발명의 방법에 따른 치료가 제공되는, 동물, 인간 또는 비-인간을 설명한다. 수의학적 및 비-수의학적 적용이 본 개시내용에서 고려된다. 인간 환자는 성인 인간 또는 청소년 인간(예컨대, 연령이 18세 미만인 인간)일 수 있다. 인간 외에, 환자는 마우스(mouse), 래트(rat), 햄스터(hamster), 기니-피그(guinea-pig), 토끼, 페럿(ferret), 고양이, 개 및 영장류를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 비-인간 영장류(예컨대, 원숭이, 침팬지, 고릴라 등), 설치류(예컨대, 래트, 마우스, 저빌(gerbil), 햄스터, 페럿, 토끼), 라고모프(lagomorph), 돼지과(swine)(예: 돼지, 미니어처 돼지(miniature pig)), 말과(equine), 개과(canine), 고양이과(feline), 소과(bovine) 및 기타 가축, 농장 동물 및 동물원 동물이 포함된다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 임의 길이의 적어도 2개의 아미노산의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "폴리뉴클레오타이드", "핵산 분자" 및 "핵산 서열"은 적어도 2개 뉴클레오타이드의 임의 길이의 뉴클레오타이드 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 제한 없이, DNA, RNA, DNA/RNA 하이브리드, 및 이의 변형을 포함한다.

[0036] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에 사용하기 위한 방법 및 재료가 본원에 기술되어 있고; 당업계에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 기타 참고문헌은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다.

[0037] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 도면, 그리고 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1a 내지 1d는 HCB301-4, HCB301-3, HCB301-2 및 HCB301-1 각각의 개략적인 구조를 나타낸다.

도 2는 CD47을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포에 대한 HCB301 단백질의 전체 세포 결합 결과를 나타낸다.

도 3은 PD-L1을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포에 대한 HCB301 단백질의 전체 세포 결합 결과를 나타낸다.

도 4는 CD47-발현 FaDu 세포에 대한 HCB301 단백질의 전체 세포 결합 결과를 나타낸다.

도 5a 내지 5b는 HCB301 단백질의 RBC 결합 결과를 나타낸다. 도 5b는 Hu5F9-G4의 곡선이 없는 결과를 나타낸다.

도 6a 및 6b는 HCB301 단백질의 혈소판 결합 결과를 나타낸다. 도 6b는 Hu5F9-G4의 곡선이 없는 결과를 나타낸다.

도 7a는 HCB301 단백질의 인간 TGFβ1 결합 결과 및 EC50 값을 나타낸다. IgG4-TGFβ 트랩을 양성 대조군으로 사용하였다.

도 7b는 HCB301 단백질의 인간 TGFβ2 결합 결과 및 EC50 값을 나타낸다. IgG4-TGFβ 트랩을 양성 대조군으로 사용하였다.

도 7c는 HCB301 단백질의 인간 TGFβ3 결합 결과 및 EC50 값을 나타낸다. IgG4-TGFβ 트랩을 양성 대조군으로 사용하였다.

도 8a는 형질감염되지 않은 OE19 세포 및 PD-L1을 발현하는 형질감염된 OE19 세포에 대한 32 pM 농도에서의 HCB301 단백질의 결합 퍼센트를 나타낸다.

도 8b 내지 8g는 형질감염되지 않은 OE19 세포 및 PD-L1을 발현하는 형질감염된 OE19 세포에 대한 SIRPα_G4, PD1_G4, HCB301-3, HCB301-4, HCB301-1, 및 HCB301-2의 결합 곡선을 나타낸다.

도 9는 HCB301 단백질의 RBC 혈구응집 결과를 나타낸다.

도 10은 CD47을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포에 대한 HCB301 단백질의 SIRPα/CD47 차단 결과를 나타낸다.

도 11은 PD-L1을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포에서 HCB301 단백질의 PD-1/PD-L1 차단 결과를 나타낸다. 바이오틴-PD1-ECD-Fc는 바이오티닐화된 PD1_G4를 나타낸다.

도 12a는 HCB301 단백질에 의해 억제된 TGFβ-1-매개 smad2 리포터 활성을 나타낸다.

도 12b는 HCB301 단백질에 의해 억제된 TGFβ-2-매개 smad2 리포터 활성을 나타낸다.

도 12c는 HCB301 단백질에 의해 억제된 TGFβ-3-매개 smad2 리포터 활성을 나타낸다.

도 13은 CD47-발현 저켓(Jurkat) 세포에 대한 Raw264.7 마우스 대식세포에 의한 HCB301 단백질의 유도된 식세포작용 활성을 나타낸다.

도 14a는 TGFβ1의 존재 하에 MLR 검정에서 HCB301 단백질-유도된 세포 증식을 나타낸다.

도 14b는 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 TGFβ1 존재하에 MLR 검정에서 HCB301 단백질-유도된 IL-2 분비를 나타낸다.

도 14c는 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 TGFβ1의 존재 하에 MLR 검정에서 HCB301 단백질-유도된 IFN-γ 분비를 나타낸다.

도 15a 및 15b는 시험관 내(*in vitro*) 검정 결과를 요약한 표를 나타낸다.

도 16은 본 개시내용에서 논의된 서열을 나열한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] **상세한 설명**

[0040] 본 개시내용은 CD47 및 PD-L1에 결합하는 단백질 복합체를 제공한다. 이러한 단백질 복합체는 CD47/SIRPα 경로 및 PD-1/PD-L1 경로를 동시에 표적화하는 데 사용될 수 있다. 결과는 단백질 복합체가 CD47-발현 암세포에 효과적으로 결합하여 내인성 SIRPα와 CD47 사이의 상호작용을 차단함으로써, 선천적 면역 반응(예컨대, 대식세포에 의한 암세포의 식세포작용)을 유도할 수 있음을 나타낸다. 반면에, 단백질 복합체는 RBC 세포 또는 혈소판에 대한 최소한의 결합을 나타냄으로써, 항-CD47 항체 마그롤리맙에 의해 관찰된 바와 같이 숙주 세포의 제거(clearance)를 억제하였다. 또한, 결과는 단백질 복합체가 PD-L1-발현 암세포에 선택적으로 결합하여 내인성 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 차단할 수 있음을 나타낸다. 추가로, 단백질 복합체는 TGFβ 트랩을 또한 포함함으로써, TGFβ-유도된 면역-억제 반응을 억제하고, T 세포 증식 및 사이토킨 분비를 증가시킬 수 있다.

[0041] 따라서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 대식세포에 의한 증가된 식균작용(예컨대, 식균작용의 CD47-매개된 억제의 불활성화에 의해); 및 PD-1/PD-L1 뿐만 아니라 TGFβ 신호전달 경로의 억제를 통한 향상된 T 세포 활성화를 통해 향상된 종양 면역원성 및 항원 제시(antigen presentation)로 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0042] **SIRPα 세포외 도메인**

[0043] 신호 조절 단백질 α(SIRPα, SIRPa, Sirpa 또는 CD172A)는 막관통 단백질이다. 이는 3개의 Ig-유사 도메인을 포함하는 세포외 영역 및 단백질 타이로신 포스파타제 SHP1 및 SHP2의 결합을 매개하는 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프(motif)를 함유하는 세포질 영역을 갖는다. SIRPα의 타이로신 포스포릴화는 다양한 성장 인자 및 사이토킨뿐만 아니라 세포외 매트릭스 단백질에 대한 인테그린-매개된 세포 접착에 의해서도 조절된다. SIRPα는 특히 골수 세포, 예를 들면, 대식세포 및 수지 세포에 풍부한 반면, 이는 T, B, NK 및 NKT 세포에서 단지 낮은 수준으로 발현된다.

[0044] SIRPα의 세포외 영역은 이의 리간드 CD47과 상호작용할 수 있다. 대식세포 상의 SIRPα와 적혈 세포 상의 CD47의 상호작용은 시험관 내 및 생체 내(*in vivo*)에서 대식세포에 의한 Ig-옵소닌화된(opsonized) 적혈 세포의 식세포작용을 방지한다. 이웃 세포에 발현된 CD47에 의해 대식세포에 SIRPα가 연결되면 SIRPα 세포질성 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프의 포스포릴화를 야기하여, SHP-1 및 SHP-2 포스파타제가 보충된다. 하나의 야기되는 하류 효과(downstream effect)는 대식세포 시냅스에서 미오신-IIA 축적의 방지 및 결과적으로 식세포작용의 억제이다. 따라서 CD47-SIRPα 상호작용은 건강한 자가 세포가 부적절하게 포식되지 않도록 보증하기 위해 "나를 먹지 마세요" 신호를 보내는 음성 면역 체크포인트로서 기능한다. 그러나, CD47의 과발현은 또한 거의 모든 유형의 종양에서 발견되었으며, 이들 중 일부는 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 방광암(bladder cancer) 및 유방암(breast cancer)을 포함한다. 이러한 대식세포의 음성 조절은 SIRPα에 대한 CD47의 결합을 차단함으로써 최소화할 수 있다. 따라서, CD47/SIRPα 상호작용을 차단하는 제제는 항체-의존성 세포 식균작용(antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP)을 촉진할 수 있고 일부 경우에, 항체-의존성 세포 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)을 유발할 수 있으므로 다양한 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0045] CD47/SIRPα 상호작용을 차단하면 세포 식균작용이 촉진되어 다양한 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 이는 선천 면역성에 의한 암 세포의 인식 및 제거를 유발한다. CD47 또는 SIRPα를 표적화하는 제제(agent)는 다양한 종양 및 암, 예컨대, 고형 종양(solid tumor), 혈액 악성종양(hematologic malignancy)(예컨대, 재발성 또는 불응성 혈액 악성종양), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 유방암, 방광암, 난소암(ovarian cancer), 및 소-세포 폐암 종양(small cell lung cancer tumor)을

치료하는 데 사용될 수 있다.

[0046] 또한, SIRPα는 대식세포에 의한, CD47-발현 숙주 세포, 예를 들면, 적혈 세포 및 혈소판의 생체 내 제거를 억제하는 데 작용한다. CD47-SIRPα 상호작용은 또한 조혈 줄기 세포의 생착에 필수적인 것으로 나타난다. CD47/SIRPα 상호작용을 차단하면 정상 적혈 세포가 우발적으로 사멸되어, 잠재적으로 빈혈(anemia)을 야기하고, 염증(inflammation)을 유발할 수 있다. 따라서, 예컨대, 적혈 세포에 대한 효과를 제한하거나 제어하면서, SIRPα 표적화제와 CD47의 상호작용을 조절하는 것이 중요하다.

[0047] SIRPα 및 이의 기능에 대한 상세한 설명은 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Yanagita et al. "Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy." JCI insight 2.1(2017); Seiffert et al. "Signal-regulatory protein α(SIRPα) but not SIRPβ is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34+ CD38-hematopoietic cells." Blood 97.9(2001):2741-2749에서 찾을 수 있다.

[0048] 인간 SIRPα는 신호 조절 단백질(SIRP)의 구성원이다. 신호 조절 단백질은 필수 세포 표면 단백질 상호작용 및 신호 변환(signal transduction)을 매개하는 세포 표면 Ig 상과 단백질(cell surface Ig superfamily protein)이다. SIRP는 모두 N-말단 세포외 영역, 단일 막관통 도메인 및 C-말단 세포내 영역을 함유한다.

[0049] 인간 SIRPα(UniProt 확인인자(identifier): P78324)의 세포외 영역은 IgV 도메인, Ig-유사 C1-유형 1 도메인, 및 Ig-유사 C1-유형 2 도메인을 갖는다. 이는 인간 SIRPα 단백질(서열 번호: 23; NP_542970.1)의 아미노산 32-137, 아미노산 148-247 및 아미노산 254-348에 상응한다. 아미노산 1 내지 30은 신호 펩타이드이다. 인간 SIRPα는 또한 2개의 추정 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)를 포함하는 긴 세포내 도메인을 갖는다. SIRPα ITIM의 활성화는 세포 반응을 부정적으로 조절하는 억제 신호를 전달한다.

[0050] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 하나 이상의 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 SIRPα 세포외 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 본원에 사용된 바와 같은, "SIRPα 세포외 도메인"은 SIRPα의 세포외 영역의 전체 또는 일부 또는 이의 변이체를 지칭하며, 여기서 세포외 영역의 일부는 CD47에 결합할 수 있다. SIRPα 세포외 도메인은 독립적으로 폴딩(folding)되어 자가-안정화 구조를 형성할 수 있는 하나 이상의 단백질 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 IgV 도메인, Ig-유사 C1-유형 1 도메인 및 Ig-유사 C1-유형 2 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 IgV 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 IgV 도메인 및 Ig-유사 C1-유형 1 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, SIRPα 세포외 도메인은 IgV 도메인, Ig-유사 C1-유형 1 도메인 및 Ig-유사 C1-유형 2 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0051] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 SIRPα 세포외 도메인은 인간 SIRPα 단백질의 31 내지 148번 아미노산(NCBI 수탁 번호: AAH26692.1; 서열 번호: 12)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 CD47-결합 도메인 또는 SIRPα 도메인은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CD47-결합 도메인 또는 SIRPα 세포외 도메인은 인간 SIRPα 단백질의 IgV 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 CD47-결합 도메인 또는 SIRPα 세포외 도메인은 마우스 SIRPα 단백질의 IgV 도메인을 포함한다.

[0052] **PD-1 세포외 도메인**

[0053] PD-1(프로그램화된 사멸-1)은 면역 체크포인트이고, 림프절의 항원-특이적 T-세포에서 세포 사멸(프로그램화된 세포 사멸)을 촉진하는 동시에 조절 T 세포(소염성, 억제 T 세포)에서 세포자멸사를 감소시키는 이중 메커니즘을 통해 자가면역성을 지킨다.

[0054] PD-1은 주로 T 세포와 1차 B 세포의 표면에서 발현되고; PD-1의 2개의 리간드(PD-L1 및 PD-L2)는 항원-제시 세포(APC)에서 널리 발현된다. PD-1과 이의 리간드의 상호작용은 면역 반응의 음성 조절에 중요한 역할을 한다. PD-1과 이의 리간드 사이의 결합을 억제하면 종양 세포가 면역 체계의 살상 효과에 노출되도록 할 수 있음으로써 종양 조직을 죽이고 암을 치료하는 효과에 도달할 수 있다.

[0055] PD-L1은 많은 상이한 암의 신생물 세포에서 발현된다. T 세포 상의 PD-1에 결합하여 이를 억제함으로써, PD-L1 발현은 종양 세포가 면역 공격을 회피할 수 있는 주요 메커니즘이다. PD-L1 과-발현은 개념적으로 2개의 메커니

즘, 즉, 내재적 메커니즘과 적응적 메커니즘에 기인할 수 있다. 암 세포에서 PD-L1의 고유한 발현은 이러한 신생물 세포에서 세포/유전적 이상과 관련되어 있다. AKT 및 STAT 경로를 포함하는 세포 신호전달의 활성화는 증가된 PD-L1 발현을 야기한다. 원발성 종격동 B-세포 림프종(primary mediastinal B-cell lymphoma)에서, MHC 제II 부류 전사활성인자(MHC class II transactivator; CIITA)와 PD-L1 또는 PD-L2의 유전자 융합이 발생하면, 이러한 단백질의 과발현이 야기된다. PD-L1 및 PD-L2가 위치한 염색체 9p23-24의 증폭은 고전적 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma)에서 단백질 둘 다의 증가된 발현을 이끈다. 적응적 메커니즘은 종양 미세환경에서 PD-L1 발현의 유도와 관련되어 있다. PD-L1은 인터페론 ɣ에 대한 반응 시 신생물 세포에서 유도될 수 있다. 미세부수체 불안정성 결장암(microsatellite instability colon cancer)에서, PD-L1은 종양내 골수 세포에서 주로 발현되며, 이는 이후 세포독성 T-세포 기능을 억제한다.

[0056] 항-종양 면역성을 향상시키기 위한 PD-1 차단의 사용은, 만성 감염 모델에서의 관찰로부터 비롯되었는데, 여기서 PD-1 상호작용을 방지하는 것은 T-세포 고갈을 역전시켰다. 유사하게, PD-1의 차단은 T-세포 PD-1/종양 세포 PD-L1 또는 T-세포 PD-1/종양 세포 PD-L2 상호작용을 방지하여, T-세포 매개된 항-종양 면역성의 회복을 이끈다.

[0057] PD-1에 대한 상세한 설명 및 암을 치료하기 위한 항-PD-1 항체의 용도는 예컨대, 문헌: Topalian, Suzanne L., et al. "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." New England Journal of Medicine 366.26 (2012): 2443-2454; Hirano, Fumiya, et al. "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity." Cancer research 65.3 (2005): 1089-1096; Raedler, Lisa A. "Keytruda (pembrolizumab): first PD-1 inhibitor approved for previously treated unresectable or metastatic melanoma." American health & drug benefits 8.Spec Feature (2015): 96; Kwok, Gerry, et al. "Pembrolizumab (Keytruda)." (2016): 2777-2789; US 20170247454; US 9,834,606 B; and US 8,728,474에 기술되어 있고, 이들 각각은 이의 전문이 참고로 포함되어 있다.

[0058] UniProt 확인인자 Q15116에 따르면, 인간 PD-1의 세포외 영역은 서열 번호: 11의 24 내지 170번 아미노산에 상응하고, 인간 PD-1의 막관통 영역은 서열 번호: 11의 171 내지 191번 아미노산에 상응하고, 인간 PD-1의 세포질 영역은 서열 번호: 11의 192 내지 288번 아미노산에 상응한다. PD-1 세포외 영역은 또한 인간 PD-1 단백질의 35 내지 145번 아미노산(서열 번호: 11; NP_005009.2)에 상응하는 IgV 도메인을 갖는다. 신호 펩타이드는 서열 번호 11의 1 내지 23번 아미노산에 상응한다. 인간 SIRPα의 세포질 영역은 또한 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM; 서열 번호 11의 221 내지 226번 아미노산에 상응) 및 면역수용체 타이로신-기반 스위치 모티프(Immunoreceptor tyrosine-based switch motif; ITSM; 서열 번호: 11의 241 내지 251번 아미노산에 상응)를 갖는다.

[0059] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 하나 이상의 PD-L1-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-1 세포외 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 본원에 사용된 바와 같은, "PD-1 세포외 도메인"은 PD-1의 세포외 영역의 전체 또는 일부 또는 이의 변이체를 지칭하고, 여기서 세포외 영역의 일부는 PD-L1에 결합할 수 있다. PD-1 세포외 도메인은 독립적으로 폴딩되어 자가-안정화 구조를 형성할 수 있는 하나 이상의 단백질 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-1 세포외 도메인은 IgV 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, PD-1 세포외 도메인은 신호 펩타이드를 포함하지 않는다.

[0060] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 PD-1 세포외 도메인은 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열 번호: 11)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 PD-L1-결합 도메인 또는 PD-1 세포외 도메인은 서열 번호 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 PD-L1-결합 도메인 또는 SIRPα 세포외 도메인은 인간 PD-1 단백질의 IgV 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 PD-L1-결합 도메인 또는 SIRPα 세포외 도메인은 마우스 PD-L1 단백질의 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0061] **TGFBR2 세포외 도메인**

[0062] TGF-베타 수용체 유형-2(TGFBR2)는 TGF-β 계열의 모든 구성원에 대한 리간드-결합 수용체이며 섬유아세포를 포함한 사실상 모든 세포 유형에서 발현된다. 리간드-유도된 세포 반응은 c-Jun N-말단 키나제, Akt, Src, 세포외 신호-조절된 키나제 및 p38 미토겐 활성화된 단백질 키나제 경로와 같은 정규(canonical), Smad-의존성 또는 비-정규, Smad-독립성 신호전달 경로를 통해 매개된다. TGFBR2에 대한 리간드 결합은 수용체의 이량체화 및 자가포스포릴화(autophosphorylation)를 유도하고, 이는 이후 TGF-베타 수용체 유형-1(TGFBR1) 또는 유형-

3(TGFBR3)에 결합한다. 새로이 형성된 이종사량체성 복합체(heterotetrameric complex)는, 이의 포스포릴화 상태에서 공-SMAD 분자 SMAD4에 결합하는, 조절성 SMAD(SMAD2 또는 SMAD3)를 다시 보충하고 포스포릴화한다. 조절성 SMAD/공-SMAD 복합체는 핵으로 이동하며, 여기서 이는 표적 유전자 발현을 조절하는 전사 인자로 작용한다.

[0063] TGFβ, TGFBR2, 및 암을 치료하기 위한 TGFβ 트랩의 용도에 대한 상세한 설명은 예컨대, 문헌: Bierie, B., et al. "TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." Nature Reviews Cancer 6.7 (2006): 506-520; Kim, B., et al. "Novel therapies emerging in oncology to target the TGF-β pathway." Journal of Hematology & Oncology 14.1 (2021): 1-20; and Lind, H., et al. "Dual targeting of TGF-β and PD-L1 via a bifunctional anti-PD-L1/TGF-βRII agent: status of preclinical and clinical advances." Journal for immunotherapy of cancer 8.1 (2020)에 기술되어 있고, 이들 각각은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0064] UniProt 확인인자 P37173에 따르면, 인간 TGFBR2의 세포외 영역은 서열 번호: 13의 23 내지 166번 아미노산에 상응하고, 인간 TGFBR2의 막관통 영역은 서열 번호: 13의 167 내지 187번 아미노산에 상응하고, 인간 TGFBR2의 세포질 영역은 서열 번호: 13의 188 내지 567번 아미노산에 상응한다. 신호 펩타이드는 서열 번호: 13의 1 내지 22번 아미노산에 상응한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 하나 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFBR2 세포외 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 본원에 사용된 바와 같은, "TGFBR2 세포외 도메인"은 TGFBR2 또는 이의 변이체의 세포외 영역 전체 또는 일부를 지칭하며, 여기서 세포 외 영역의 일부는 TGFβ에 결합할 수 있다. TGFBR2 세포외 도메인은 독립적으로 폴딩되어 자가-안정화 구조를 형성할 수 있는 하나 이상의 단백질 도메인을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, TGFBR2 세포외 도메인은 신호 펩타이드를 포함하지 않는다.

[0066] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 TGFBR2 세포외 도메인은 인간 TGFBR2 단백질의 24 내지 159번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_003233.4; 서열 번호: 13)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 TGFβ-결합 도메인 또는 TGFBR2 세포외 도메인은 서열 번호: 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 TGFβ-결합 도메인 또는 TGFBR2 세포외 도메인은 인간 TGFBR2 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 TGFβ-결합 도메인 또는 TGFBR2 세포외 도메인은 마우스 PD-L1 단백질의 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0067] **CD47, PD-L1 및/또는 TGFβ를 표적화하는 단백질 복합체**

[0068] 본 개시내용은 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 복합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 이들 단백질 복합체는 CD47/SIRPα 신호전달 경로를 차단함으로써 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들 단백질 복합체는 식세포작용을 개시할 수 있다.

[0069] 본 개시내용은 또한 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 복합체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 이들 단백질 복합체는 PD-1/PD-L1 신호전달 경로를 차단함으로써 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 이들 단백질 복합체는 T 세포 활성화, 증식 및/또는 사이토킨 방출을 유도할 수 있다.

[0070] 일 양태에서, 본 개시내용은 Fc, 하나 이상의 CD47-결합 도메인, 하나 이상의 PD-L1-결합 도메인, 및 임의로 하나 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진 단백질 복합체 또는 단백질 작제물을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "Fc"는 항체의 단편 결정화가능한 영역(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgA 또는 IgD)을 지칭한다. 용어 "Fc 영역" 또는 "Fc 영역 서열"은 Fc 영역을 형성하는 중쇄 펩타이드 내의 중쇄 불변 도메인(예컨대, CH2 및 CH3)을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체 또는 단백질 작제물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체 또는 단백질 작제물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 PD-L1-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체 또는 단백질 작제물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

[0071] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체 또는 단백질 작제물은 Fc, 분화 클러스터(cluster of differentiation) 47(CD47)에 특이적으로 결합하는 제1 도메인, 및 프로그램화된 사멸-리간드 1(PD-L1)에 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0072] 일부 실시형태에서, 제1 도메인은 CD47을 발현하는 세포(예컨대, 암 세포)에 결합하고/하거나 CD47과 신호 조절 단백질 α(SIRPα) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 도메인은 SIRPα의 세포외 영역의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRPα는 인간 SIRPα이다. 일부 실시형태에서, 제1 도메인

은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0073] 일부 실시형태에서, 제2 도메인은 PD-L1을 발현하는 세포(예컨대, 암 세포)에 결합하고/하거나 T 세포 활성화 및 증식을 자극할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 도메인은 프로그램화된 세포 사멸 단백질(programmed cell death protein) 1(PD-1)의 세포외 영역의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, PD-1은 인간 PD-1이다. 일부 실시형태에서, 제2 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 일부 실시형태에서, Fc는 인간 IgG4 Fc이다. 일부 실시형태에서, 제1 도메인은 임의로 힌지 영역을 통해, Fc 내 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 제2 도메인은 임의로 힌지 영역을 통해, Fc의 CH2 도메인의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 임의로 EU 넘버링에 따른 S228P 돌연변이를 지닌 인간 IgG4 힌지 영역이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체 또는 단백질 작제물은 형질전환 성장 인자 베타(TGFβ)에 특이적으로 결합하는 제3 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 도메인은 임의로 링커 펩타이드를 통해, Fc 내 CH3 도메인의 C-말단에 연결된다.

[0076] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 제1 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 제2 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 2개 이상의 제3 도메인을 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인, PD-L1-결합 도메인, 및 TGFβ-결합 도메인은 본원에 기술된 바와 같은 임의의 링커 펩타이드 또는 힌지 영역 서열을 통해 Fc 영역에 연결된다.

[0078] 단백질 복합체의 일부 실시형태가 **도 1a 내지 도 1d**에 나타나 있다. 이는 하기에 상세히 설명되어 있다.

[0079] *HCB301-4*

[0080] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 제1 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의로 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. HCB301-4 포맷을 갖는 예시적인 단백질 복합체의 개략적인 구조가 **도 1a**에 나타나 있다.

[0081] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 PD-1의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열번호: 11); 또는 서열 번호: 5를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0082] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 링커 펩타이드는 서열 번호: 8 내지 10 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 링커 펩타이드는 GGGGS(서열 번호: 18) 또는 GSGGSG(서열 번호: 19)의 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 반복체(repeat)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] *HCB301-2*

[0085] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 제1 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제3 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제5 링커 펩타이드, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의로 제1 링커 펩타이드, 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의로 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 바람직하

게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제4 PD-L1-결합 도메인, 임의로 제6 링커 펩타이드, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. HCB301-2 포맷을 갖는 예시적인 단백질 복합체의 개략적인 구조가 **도 1c**에 나타나 있다.

[0086] 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 PD-1의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열 번호: 11); 또는 서열 번호: 5를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1 결합 도메인은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0087] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및/또는 제6 링커 펩타이드는 서열 번호: 8 내지 10 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및/또는 제6 링커 펩타이드는 GGGGS(서열 번호: 18) 또는 GSGGSG(서열 번호: 19)의 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 반복체에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0089] *HCB301-3*

[0090] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 제1 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제1 CD47-결합 도메인, 임의의 제1 링커 펩타이드, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의로 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. HCB301-4 포맷을 갖는 예시적인 단백질 복합체의 개략적인 구조는 **도 1b**에 나타나 있다.

[0091] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 PD-1의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열 번호: 11); 또는 서열 번호: 5를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0092] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 링커 펩타이드는 아미노산 서열 8 내지 10 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 링커 펩타이드는 GGGGS(서열 번호: 18) 또는 GSGGSG(서열 번호: 19)의 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 반복체에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0094] *HCB301-1*

[0095] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 제1 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제1 CD47-결합 도메인, 임의로 제1 링커 펩타이드, 제1 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제5 링커 펩타이드, 제3 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제1 힌지 영역, 제1 Fc 영역, 임의로 제2 링커 펩타이드, 및 임의의 제1 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 바람직하게는 N-말단으로부터 C-말단까지, 제2 CD47-결합 도메인, 임의의 제3 링커 펩타이드, 제2 PD-L1-결합 도메인, 임의로 제6 링커 펩타이드, 제4 PD-L1-결합 도메인, 임의의 제2 힌지 영역, 제2 Fc 영역, 임의의 제4 링커 펩타이드, 및 임의의 제2 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. HCB301-2 포맷을 갖는 예시적인 단백질 복합체의 개략적인

구조는 **도 1d**에 나타나 있다.

[0096] 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 PD-1의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열 번호: 11); 또는 서열 번호: 5를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1 결합 도메인은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 PD-L1-결합 도메인은 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및/또는 제6 링커 펩타이드는 서열 번호: 8 내지 10 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및/또는 제6 링커 펩타이드는 GGGGS(서열 번호: 18) 또는 GSGGSG(서열 번호: 19)의 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 반복체에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드는 서열 번호: 4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0099] 본원에 기재된 임의의 단백질 복합체에서, 제1 및/또는 제2 CD47-결합 도메인은 SIRPα의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 SIRPα 단백질의 31 내지 148번 아미노산(NCBI 수탁 번호: AAH26692.1; 서열 번호: 12); 또는 서열 번호: 6을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 CD47-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 CD47-결합 도메인은 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 CD47-결합 도메인은 SIRPα(예컨대, 인간 SIRPα)의 IgV 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRPα IgV 도메인은 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 CD47-결합 도메인은 상이하다.

[0100] 본원에 기술된 임의의 단백질 복합체에서, 제1 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 TGFBR2의 세포외 도메인의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 TGFBR2 단백질의 24 내지 159번 아미노산(NCBI 수탁 번호: NP_003233.4; 서열번호: 13); 또는 서열 번호: 7을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 TGFβ-결합 도메인은 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0101] 본원에 기술된 임의의 단백질 복합체에서, 제1 및/또는 제2 힌지 영역은 면역글로불린의 힌지 영역의 전부 또는 일부, 예컨대, 인간 IgG4 힌지 영역(서열 번호: 16)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 힌지 영역은 서열 번호: 16에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 힌지 영역과 제2 힌지 영역은 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 힌지 영역과 제2 힌지 영역은 상이하다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 힌지 영역은 EU 넘버링에 따른 228번 위치에 프롤린을 포함한다.

[0102] 본원에 기술된 임의의 단백질 복합체에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 동일할 수 있고 Fc 단독이량체(homodimer)를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 면역글로불린의 Fc 영역, 예컨대, 인간 IgG4 Fc 영역(서열 번호: 17)의 전부 또는 일부를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 단백질 복합체에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 하나 이상의 돌연변이를 도입함으로써 Fc 헤테로이량체를 형성할 수 있다. 예를 들면, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 하나 이상의 놉-인투-홀(knob-into-hole; KIH) 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 영역은 당업계에 공지된 다른 기술을 사용하여 Fc 헤테로이량체를 형성할 수 있다. 헤테로이량체 Fc 기술에 대한 상세한 내용은 예컨대, 문헌: Ha, et al. "Immunoglobulin Fc heterodimer platform technology: from design to applications in therapeutic antibodies and proteins." Frontiers In Immunology 7 (2016): 394에서 찾을 수 있고, 이는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0103] 일 양태에서, 본 개시내용은 CD47-결합 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 CD47-결합 도메인) 및 PD-L1-결합 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 PD-L1-결합 도메인)을 포함하는 단백질 복합체에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 TGFβ-결합 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 TGFβ-결합 도메인)을 추가로 포

함한다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 SIRPα 세포외 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 SIRPα 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-1 세포외 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 PD-1 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFBR2 세포외 도메인(예컨대, 본원에 기술된 임의의 TGFBR2 세포외 도메인)이거나 또는 이를 포함한다.

[0104] **단백질 복합체의 특성**

[0105] 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 본원에 기술된 바와 같은 임의의 CD47-결합 도메인, PD-L1-결합 도메인 및/또는 TGFβ-결합 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 제공한다.

[0106] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 퍼센트(percent identity)를 결정하기 위해, 서열을 최적의 비교 목적을 위해 정렬한다(예컨대, 최적의 정렬을 위해 갭(gap)을 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에 도입시킬 수 있고 비-상동성 서열을 비교 목적을 위해 무시할 수 있다). 비교 목적을 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 80%이며, 일부 실시형태에서는 적어도 90%, 95% 또는 100%이다. 이후에, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열 내 위치가 제2 서열 내 상응하는 위치에서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유되는 경우, 분자는 해당 위치에서 동일하다. 두 서열 사이의 동일성 퍼센트는 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는, 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 서열이 공유하는 동일한 위치 수의 함수이다. 예를 들면, 서열의 비교 및 2개의 서열 사이의 동일성 퍼센트의 결정은 갭 페널티(gap penalty) 12, 갭 확장 페널티(gap extend penalty) 4 및 프레임시프트 갭 페널티(frameshift gap penalty) 5를 사용한 Blossum 62 스코어링 매트릭스(Blossum 62 scoring matrix)를 사용하여 달성할 수 있다.

[0107] 본원에 기술된 단백질 복합체는 항체의 Fc를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 특정 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(class) 또는 하위 부류(subclass)(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE1, IgE2)일 수 있다. 일부 실시형태에서, Fc 영역은 인간 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역(예컨대, 인간 IgG4 Fc 영역)이다.

[0108] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항체 힌지 영역(예컨대, IgG, IgE 힌지 영역)을 통해 Fc 영역에 연결된다. 또한, Fc 영역은 목적한 효과기 기능 또는 혈청 반감기를 제공하도록 변형시킬 수 있다.

[0109] 본원에 기술된 단백질 복합체는 CD47과 면역 세포에서 발현되는 내인성 SIRPα 사이의 결합을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD47에 결합함으로써, 본원에 기술된 단백질 복합체는 면역 세포(예컨대, 골수 세포, 대식세포 및 수지상 세포)에서 발현되는 내인성 SIRPα에 대한 CD47(예컨대, 종양 세포에서 발현되는)의 결합을 억제함으로써, CD47/SIRPα 경로를 차단하고, 면역 반응을 상향조절하며 식세포작용을 촉진할 수 있다.

[0110] 본원에 기술된 단백질 복합체는 PD-L1과 면역 세포에서 발현되는 내인성 PD-1 사이의 결합을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, PD-L1에 결합함으로써, 본원에 기술된 단백질 복합체는 면역 세포(예컨대, T 세포)에서 발현되는 내인성 PD-1에 대한 PD-L1(예컨대, 종양 세포에서 발현됨)의 결합을 억제함으로써, PD-1/PD-L1 경로를 차단하고, 면역 반응을 상향 조절하고, T 세포 증식 및 사이토킨 방출을 활성화할 수 있다.

[0111] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 면역 세포(예컨대, 골수 세포, 대식세포, 수지상 세포, 항원 제시 세포)의 면역 반응, 활성 또는 수를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배, 또는 20배까지 증가시킬 수 있다.

[0112] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 CD47(예컨대, 인간 CD47, 원숭이 CD47 또는 마우스 CD47), PD-L1(예컨대, 인간 PD-L1, 원숭이 PD-L1 또는 마우스 PD-L1), 또는 TGFβ(예컨대, 인간 TGFβ, 원숭이 TGFβ, 또는 마우스 TGFβ)에, 0.1 s^{-1} 미만, 0.01 s^{-1} 미만, 0.001 s^{-1} 미만, 0.0001 s^{-1} 미만, 또는 0.00001 s^{-1} 미만의 해리 속도(koff)로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 해리 속도(koff)는 0.01 s^{-1} 초과, 0.001 s^{-1} 초과, 0.0001 s^{-1} 초과, 0.00001 s^{-1} 초과, 또는 0.000001 s^{-1} 초과이다. 일부 실시형태에서, 동적 결합 속도(kinetic association rate; kon)는 1 x 10^2/Ms 초과, 1 x 10^3/Ms 초과, 1 x 10^4/Ms 초과, 1 x 10^5/Ms 초과, 또는 1 x 10^6/Ms 초과이다. 일부 실시형태에서, 동적 결합 속도(kon)은 1 x 10^5/Ms 미만, 1 x 10^6/Ms 미만, 또는 1 x 10^7/Ms미만이다. 동적 속도 상수(KD=koff/kon)의 몫(quotient)으로부터 친화도(affinity)를 추론할 수 있다. 일

부 실시양에서, KD는 1 x 10^{-6} M 미만, 1 x 10^{-7} M 미만, 1 x 10^{-8} M 미만, 1 x 10^{-9} M 미만, 또는 1 x 10^{-10} M 미만이다. 일부 실시형태에서, KD는 300nM, 200nM, 100nM, 50nM, 30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, 1nM, 900pM, 800pM, 700pM, 600pM, 500pM, 400pM, 300pM, 200pM, 100pM, 90pM, 80pM, 70pM, 60pM, 50pM, 40pM, 30pM, 20pM 또는 10pM 미만이다. 일부 실시형태에서, KD는 1 x 10^{-7} M 초과, 1 x 10^{-8} M 초과, 1 x 10^{-9} M 초과, 1 x 10^{-10} M 초과, 1 x 10^{-11} M 초과, 또는 1 x 10^{-12} M 초과이다.

[0113] 친화도를 측정하기 위한 일반적인 기술은 예컨대, ELISA, RIA 및 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 CD47 및/또는 마우스 CD47에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 CD47 및/또는 마우스 CD47에 결합할 수 없다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 PD-L1 및/또는 마우스 PD-L1에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 PD-L1, 및/또는 마우스 PD-L1에 결합할 수 없다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 TGFβ 및/또는 마우스 TGFβ에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 원숭이 TGFβ 및/또는 마우스 TGFβ에 결합할 수 없다.

[0114] 일부 실시형태에서, 열적 안정성이 결정된다. 본원에 기술된 단백질 복합체는 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95℃ 초과의 Tm을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, Tm은 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95℃ 미만이다.

[0115] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 종양 성장 억제 퍼센트(TGI%)가 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% 또는 200% 초과이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 미만인 종양 성장 억제 퍼센트를 갖는다. TGI%는 예컨대, 치료 시작 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 차에, 또는 치료 시작 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 차에 결정될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 종양 성장 억제 퍼센트(TGI%)는 다음 식을 사용하여 계산된다:

[0116] TGI(%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100

[0117] Ti는 i일 차에 치료 그룹의 평균 종양 용적이다. T0는 0일차에 치료 그룹에서 평균 종양 용적이다. Vi는 i일 차에 대조군 그룹에서 평균 종양 용적이다. V0는 0일차에 대조군 그룹에서 평균 종양 용적이다.

[0118] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 항-CD47 참고 항체, 예컨대, Hu5F9-G4, 또는 항-SIRPα 항체, 예컨대, CC-95251과 비교가능하다. Hu5F9-G4는 예컨대, 이의 전문이 참고로 본원에 포함된 문헌: Sikic et al. "First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers." Journal of Clinical Oncology 37.12(2019): 946에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 항-CD47 참고 항체, 예컨대, Hu5F9-G4 또는 항-SIRPα 항체, 예컨대, CC-95251 보다 적어도 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는 5배 더 높다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 SIRPα_G4보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는 5배 더 높다. SIRPα_G4(또는 hSIRPα-G4Fc-wt(트릴리움(Trillium)), TTI-622)의 세부사항은 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허원 공보 제US20150329616A1호에서 찾을 수 있다. SIRPα_G4의 아미노산 서열은 서열 번호: 14에 나타낸다.

[0119] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 항-PD-L1 참고 항체, 예컨대, MPDL3280A(아테졸리주맙), 또는 항-PD-1 항체, 예컨대, 펨브롤리주맙과 비교가능하다. MPDL3280A는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Powles, T. et al. "MPDL3280A(anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer." Nature 515.7528(2014): 558-562에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 항-PD-L1 참고 항체, 예컨대, MPDL3280A, 또는 항-PD-1 항체, 예컨대, 펨브롤리주맙보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는 5배 더 높다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 PD1_G4보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는5배 더 높다. PD1_G4는 HCB301 융합 단백질(HCB301

단백질)에 대한 대조군 단백질로서 사용된다. PD1_G4의 아미노산 서열은 서열 번호: 15에 나타낸다.

[0120] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 TGFβ 트랩 단백질(trap protein), 예컨대, IgG4-TGFβ 트랩, 또는 항-PD-L1 항체 × TGFβ 트랩 M7824와 비교가능하다. M7824는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Gatti-Mays, M. E., et al. "M7824: a promising new strategy to combat cancer immune evasion." Oncoscience 5.11-12(2018): 269에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 IgG4-TGFβ 트랩 또는 M7824보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는 5배 더 높다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 종양 억제 효과는 IgG4-TGFβ 트랩보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1배, 2배, 또는 5배 더 높다. IgG4-TGFβ 트랩은 HCB301 융합 단백질(HCB301 단백질)에 대한 대조군 단백질로 사용된다. IgG4-TGFβ 트랩의 아미노산 서열은 서열 번호: 20에 나타낸다.

[0121] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 기능성 Fc를 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc는 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 기능성 Fc의 효과기 기능은 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)이다. 일부 실시형태에서, 기능성 Fc의 효과기 기능은 식세포작용이다. 일부 실시형태에서, 기능성 Fc의 효과기 기능은 ADCC 및 식세포작용이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 작제물은 효과기 기능이 없는 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시형태에서, Fc는 인간 IgG4 Fc이다. 일부 실시형태에서, Fc는 기능성 Fc 영역을 갖지 않는다. 예를 들어, Fc 영역은 LALA 돌연변이(EU 넘버링에서 L234A 및 L235A 돌연변이) 또는 LALA-PG 돌연변이(EU 넘버링에서 L234A, L235A, P329G 돌연변이)를 갖는다.

[0122] Fc 영역에 대한 일부 다른 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기(들)가 Fc 영역에 도입되어, 이 영역에서 쇄간(interchain) 디설파이드 결합이 형성될 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체성 융합 단백질은 시험관 내 및/또는 생체 내에서 임의의 증가된 반감기를 가질 수 있다.

[0123] 일부 실시형태에서, IgG4는 S228P 돌연변이(EU 넘버링)를 갖는다. S228P 돌연변이는 생체 내 및 시험관 내 IgG4 Fab-아암(arm) 교환을 방지한다.

[0124] 일부 실시형태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 갖는 Fc 영역이 제공된다. 예를 들어, 이러한 Fc 영역 조성 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들면, WO 2008/077546에 기술된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분광법으로 측정한 것으로서 Asn 297에 부착된 모든 당구조(예컨대, 복합체, 하이브리드 및 고 만노스 구조)의 합에 대해, Asn297에서의 당 사슬 내 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 297번 위치(Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링; 또는 Kabat 넘버링의 314번 위치)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 Fc 영역 서열 내 사소한 서열 변화로 인해, 297번 위치의 상류 또는 하류로 약 ±3개 아미노산에, 즉, 294번과 300번 위치 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 글리칸 이질성을 감소시키기 위해, 297번 위치에서 아스파라긴을 알라닌으로 대체(N297A)하도록 Fc 영역을 추가로 가공할 수 있다.

[0125] 일부 실시형태에서, HPLC-SEC의 주요 피크는 단백질 A-기반 친화성 크로마토그래피 및/또는 크기-배제 크로마토그래피에 의한 정제 후 본원에 기술된 단백질 복합체의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5%를 차지한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4) 또는 SIRPα_G4와 비교하여, 적어도 10%, 적어도 20%, 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 110%, 또는 적어도 120%인 친화성으로 인간 CD47-발현 종양 세포(예컨대, 인간 CD47 tf CHO-S 세포, 또는 FaDu 세포)에 결합할 수 있다.

[0127] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 PD1_G4와 비교하여 인간 PD-L1-발현 종양 세포(예컨대, 인간 PD-L1을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포)에 적어도 10%, 적어도 20%, 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 110% 또는 적어도 120%인 친화성으로 결합할 수 있다.

[0128] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 IgG4-TGFβ 트랩과 비교하여 인간 TGFβ(예컨대, TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3)에 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 110%, 또는 적어도 120%인 친화성으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 TGFβ(예컨대, TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3)에 결합하는 단백질 복합체의 EC50 값은 IgG4-TGFβ 트랩의 것과 비교

하여 10% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 40% 미만, 50% 미만, 60% 미만, 70% 미만, 80% 미만, 90% 미만, 1배 미만, 2배 미만, 3배 미만, 4배 미만, 5배 미만, 또는 10배 미만이다.

[0129] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4)의 것과 비교하여 RBC 세포 또는 혈소판(예컨대, 인간 공여자로부터의)에 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 3% 미만 또는 1% 미만인 친화성으로 결합할 수 있다.

[0130] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 적혈구응집을 유도하지 않는다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4)의 것과 비교하여 500배, 2000배, 5000배, 20000배 또는 50000배 초과인 최소 농도에서 혈구응집을 유도할 수 있다.

[0131] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 CD47(예컨대, 인간 CD47 또는 이의 단편)과 SIRPα(예컨대, 인간 SIRPα 또는 이의 단편) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 인간 CD47-발현 세포(예컨대, CD47 tf CHO-S 세포 또는 FaDu 세포)와 인간 SIRPα 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 차단 능력은 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4) 또는 SIRPa_G4와 비교하여 적어도 30%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 또는 적어도 150%이다.

[0132] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 PD-L1(예컨대, 인간 PD-L1 또는 이의 단편)과 PD-1(예컨대, 인간 PD-1 또는 이의 단편) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 인간 PD-L1 발현 세포(예컨대, PD-L1 tf CHO-S 세포)와 인간 PD-1 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체의 차단 능력은 항-PD-L1 참고 항체(예컨대, MPDL3280A) 또는 PD1_G4와 비교하여 적어도 30%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 또는 적어도 150%이다.

[0133] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 마우스 대식세포(예컨대, Raw264.7 세포)에 의해 CD47-발현 종양 세포(예컨대, 저켓(Jurkat) 세포)의 식세포작용을 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD47-발현 종양 세포의 식세포작용을 유도하기 위한 본원에 기술된 단백질 복합체의 EC50 값은 30nM 미만, 20nM 미만, 10nM 미만, 5nM 미만, 4nM 미만, 3nM 미만, 2nM 미만, 1nM 미만이다. 일부 실시형태에서, CD47-발현 종양 세포의 식세포작용을 유도하기 위한 본원에 기술된 단백질 복합체의 EC50 값은 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4) 또는 SIRPα_G4의 값과 비교가능하다. 일부 실시형태에서, 마우스 대식세포에 의한 CD47-발현 종양 세포의 식균작용을 유도하는 본원에 기술된 단백질 복합체의 능력은 Hu5F9-G4 또는 SIRPα_G4의 것과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예: Hu5F9-G4)보다 마우스 대식세포(예컨대, Raw264.7 세포)에 의한 RBC 세포 또는 혈소판의 식세포작용을 유도하는 데 더 약한 능력(예컨대, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 미만)을 갖는다.

[0134] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 인간 대식세포(예컨대, MDM 세포)에 의해 CD47-발현 종양 세포(예컨대, 저켓 세포)의 식세포작용을 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 대식세포에 의한 CD47-발현 종양 세포의 식균작용을 유도하는 본원에 기술된 단백질 복합체의 능력은 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4) 또는 SIRPα_G4의 것과 비교하여 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%이다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예: Hu5F9-G4)보다 사람 대식세포(예: MDM 세포)에 의한 RBC 세포 또는 혈소판의 식세포작용을 유도하는 데 더 약한 능력(80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 미만)을 갖는다.

[0135] 적혈구를 포함한 다양한 세포 유형에서 CD47의 내인성 발현은 CD47-표적 치료법의 효능을 제한할 수 있는 강력한 "항원 싱크(antigen sink)"를 생성한다. 따라서, RBC 세포 및/또는 혈소판의 식세포작용을 유도하기 위한 본원에 기술된 단백질 복합체의 보다 약한 능력은 단백질 복합체의 생체 내 효능을 증가시킬 수 있다. 또한, 단백질 복합체는 항-CD47 참고 항체(예컨대, Hu5F9-G4)와 유사한 효능으로 더 낮은 용량 수준 및/또는 덜 빈번한 투여 스케쥴로 투여될 수 있다.

[0136] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 TGFβ-유도된 하류 경로, 예컨대, smad2 리포터 경로를 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 TGFβ1-매개된 smad2 리포터 활성을 IgG4-TGFβ 트랩, 항-TGFβ, 또는 M7824와 비교하여 150% 미만, 140% 미만, 130% 미만, 120% 미만, 110% 미만, 100% 미만, 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 또는 50% 미만으로 억제할 수 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 T 세포 반응을 향상시킬 수 있다(예컨대, MLR 검정에서). 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR)의 원리는 한 공여체로부터의 T 세포가 다른 공여체로부터의 APC의 존재 하에 증식할 것이라는 것이다. 이는 관련되지 않은 2명의 공여체 사이에 HLA 불일치의 인식에 의해 유발되며, 이는 T 세포로부터의 면역 반응을 유발한다. MLR은 배양에서 T 세포의 일반화된 자극/활성화를 유도하는 수단으로 흔히 사용된다. 일부 실시형태에서, 단백질 복합체는 T 세포 증식을 본원에 사용된 대조군 분자 또는 이의 조합보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%까지 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 사이토킨(예컨대, IFN-γ 및/또는 IL-2) 생산을 본원에 사용된 대조군 분자 또는 이의 조합보다 적어도 1배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배, 2000배, 또는 10000배까지 증가시킬 수 있다.

[0138] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 인간에서 사이토킨 폭풍(cytokine storm)을 유도하지 않는다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 초작용제(superagonist)가 아니다. 사이토킨 폭풍 및 초작용제에 대한 자세한 내용은 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Shimabukuro-Vornhagen, A. et al. "Cytokine release syndrome." Journal for ImmunoTherapy of Cancer 6.1 (2018): 1-14에서 찾을 수 있다.

[0139] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 단백질 복합체는 종양 성장을 억제할 수 있다.

[0140] **단백질 복합체의 제조 방법**

[0141] 본원에 기술된 단백질 복합체의 변이체는 폴리펩타이드 또는 이의 일부를 암호화하는 DNA 내로 적절한 뉴클레오타이드 변화를 도입하거나 펩타이드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변이체는 예를 들면, 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다.

[0142] CD47-결합 도메인과 PD-L1-결합 도메인의 결합 친화성을 증가시키기 위해 스크리닝(screening)을 수행할 수 있다. 결실, 삽입 및/또는 조합의 임의의 조합을 통해 표적에 대한 결합 친화도가 증가된 변이체에 도달할 수 있다. 변이체 내로 도입된 아미노산 변화는 또한 폴리펩타이드 내로 새로운 해독-후 변형을 변경시키거나 또는 도입할 수 있는데, 예를 들면, 글리코실화 부위의 수를 변화(예컨대, 증가 또는 감소)시키거나, 글리코실화 부위의 유형을 변화(예컨대: 아미노산을 변화시킴으로써 상이한 당이 세포 내에 존재하는 효소에 의해 부착되도록 함)시키거나, 또는 새로운 글리코실화 부위를 도입할 수 있다.

[0143] CD47-결합 도메인 및/또는 PD-L1-결합 도메인은 포유동물을 포함한, 모든 종의 동물로부터 유래될 수 있다. 결합 도메인 변이체의 비-제한적인 예는 인간, 영장류, 예컨대, 원숭이 및 유인원, 소, 돼지, 말, 양, 낙타류(예: 낙타 및 라마), 닭, 염소 및 설치류(예: 래트, 마우스, 햄스터 및 토끼)로부터 유래된 서열을 포함한다.

[0144] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 본원에 개시된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)를 포함하는 재조합 벡터(예컨대, 발현 벡터), 재조합 벡터가 도입된 숙주 세포(즉, 숙주 세포가 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 함유하도록 함), 재조합 기술에 의한 재조합 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 생산을 제공한다.

[0145] 본원에 사용된 바와 같이, "벡터"는 벡터가 숙주 세포에 도입될 때 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오타이드(들)를 숙주 세포에 전달할 수 있는 임의의 작제물이다. "발현 벡터"는 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에서 암호화된 폴리펩타이드로서 관심있는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 전달하고 발현할 수 있다. 따라서, 발현 벡터에서, 관심있는 폴리뉴클레오타이드는 벡터 내에서 또는 숙주 세포의 게놈 내에서 프로모터, 인핸서, 및/또는 폴리-A 테일(poly-A-tail)과 같은 조절 성분과 작동 가능하게 연결되거나, 또는 관심있는 폴리뉴클레오타이드의 통합 부위와 플랭킹(flanking)됨으로써 벡터에서 발현을 위해 위치하여 관심있는 폴리뉴클레오타이드가 발현 벡터와 함께 도입된 숙주 세포에서 해독되도록 한다.

[0146] 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 전기천공(electroporation), 화학적 형질감염(예: DEAE-덱스트란), 형질전환, 형질감염 및 감염 및/또는 형질도입(예: 재조합 바이러스 사용)에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 따라서, 벡터의 비제한적 예는 바이러스 벡터(이는 재조합 바이러스를 생성하는 데 사용될 수 있다), 네이키드(naked) DNA 또는 RNA, 플라스미드, 코스미드(cosmid), 파아지 벡터 및 양이온 축합제와 연관된 DNA 또는 RNA 발현 벡터를 포함한다.

[0147] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 본원에 개시된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)는 바이러스 발현 시스템(예컨대, 백시니아 또는 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데

노바이러스)을 사용하여 도입시키며, 이는 비-병원성(결함성), 복제 능력이 있는 바이러스(replication competent virus)의 사용을 포함할 수 있거나, 또는 복제 결함성 바이러스(replication defective virus)를 사용할 수 있다. 이러한 발현 시스템에 DNA를 혼입시키는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. DNA는 "네이키드"일 수도 있다. 네이키드 DNA의 흡수는 세포 내로 효율적으로 수송되는 생분해성 비드 위에 DNA를 코팅함으로써 증가시킬 수 있다.

[0148] 발현을 위해, 본원에 개시된 폴리펩타이드-암호화 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 삽입물을 적절한 프로모터(예컨대, 이종 프로모터), 예를 들어, 몇몇을 열거하면, 파아지 람다 PL 프로모터, 이. 콜라이(E. *coli*) lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 얼리(early) 및 레이트(late) 프로모터 및 레트로 LTR의 프로모터 등에 작동가능하게 연결시킬 수 있다. 다른 적합한 프로모터는 당업자에게 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터이다. 발현 작제물은 전사 개시, 종료를 위한 부위 및 전사된 영역에서, 해독을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 수 있다. 작제물에 의해 발현된 성숙한 전사체의 암호화 부위는 해독될 폴리펩타이드의 말단에 적절하게 위치한 개시 및 종결 코돈(UAA, UGA, 또는 UAG)에서 해독 개시를 포함할 수 있다.

[0149] 나타낸 바와 같이, 발현 벡터는 적어도 하나의 선택가능한 마커를 포함할 수 있다. 이러한 마커는 진핵 세포 배양을 위한 디하이드로폴레이트 리덕타제 또는 네오마이신 내성 및 이. 콜라이 및 다른 세균에서 배양하기 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예는 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 및 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*) 세포; 진균 세포, 예를 들면, 효모 세포; 곤충 세포, 예를 들면, 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도프테라(Spodoptera) Sf9 세포; 동물 세포, 예를 들면, CHO, COS, 바우스 흑색종(Bowes melanoma), 및 HK 293 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본원에 기술된 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다.

[0150] 세균에 사용하기 위한 비-제한적 벡터는 Qiagen으로부터 이용가능한 pQE70, pQE60 및 pQE-9; Stratagene으로부터 이용가능한 pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 Pharmacia로부터 이용가능한 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5를 포함한다. 비-제한적인 진핵세포 벡터는 Stratagene으로부터 이용가능한 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG를 포함하고; Pharmacia로부터 이용가능한 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL를 포함한다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

[0151] 사용하기에 적합한 비-제한적인 세균 프로모터는 이. 콜라이 lacI 및 lacZ 프로모터, T3 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, 람다 PR 및 PL 프로모터 및 trp 프로모터를 포함한다. 적합한 진핵세포 프로모터는 CMV 이미디어트 얼리 프로모터(immediate early promoter), HSV 티미딘 키나제 프로모터, 얼리 및 레이트 SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR의 프로모터, 예를 들면, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus; RSV), 및 메탈로티오네인 프로모터, 예를 들면, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터를 포함한다.

[0152] 효모 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에는, 구성적 또는 유도성 프로모터, 예를 들면, 알파 인자, 알코올 옥시다제, 및 PGH를 함유하는 다수의 벡터를 사용할 수 있다.

[0153] 숙주 세포 내로 작제물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 양이온성 지질-매개된 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 방법은 이의 전문이 참고로 본원에 포함된 문헌: Davis *et al.*, Basic Methods In Molecular Biology(1986)와 같은 많은 표준 실험실 매뉴얼에 기재되어 있다.

[0154] 고등 진핵세포에 의한 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 전사는 인핸서 서열(enhancer sequence)을 벡터에 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서는 주어진 숙주 세포 유형에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키기 위해 작용하는, 일반적으로 약 10 내지 300bp인, DNA의 시스-작용 성분이다. 인핸서의 예는 100 내지 270번 염기쌍에서 복제 오리진(replication origin)의 레이트 부위(late side)에 위치한, SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 얼리 프로모터 인핸서, 복제 오리진의 레이트 부위 상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.

[0155] 해독된 단백질을 소포체의 내강, 주변세포질 공간 또는 세포외 환경으로 분비하기 위해, 적절한 분비 신호를 발현된 폴리펩타이드에 포함시킬 수 있다. 신호는 폴리펩타이드에 대해 내인성일 수도 있거나 또는 이종성 신호일 수 있다.

[0156] 폴리펩타이드는 융합 단백질(예컨대, GST-융합)과 같은 또는 히스티딘-태그를 지닌 변형된 형태로 발현될 수 있

고, 분비 신호뿐만 아니라, 추가적인 이종성 기능 영역도 포함할 수 있다. 예를 들면, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역을 폴리펩타이드의 N-말단에 가하여 정제 동안, 또는 후속 취급 및 저장 동안 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선시킬 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하기 위해 펩타이드 모이어티(moiety)를 폴리펩타이드에 가할 수 있다. 이러한 영역은 폴리펩타이드의 최종 제조 전에 제거할 수 있다. 다른 것들 중에서도 분비 또는 배설을 일으키고, 안정성을 개선하고, 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩타이드에 펩타이드 모이어티를 가하는 것은 당업계에서 친숙하고 일상적인 기술이다.

[0157] **치료 방법**

[0158] 본 개시내용의 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드는 다양한 치료학적 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0159] 일 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법, 시간에 걸쳐 대상체에서 종양 용적의 증가 속도를 감소시키는 방법, 전이가 진행될 위험을 감소시키는 방법, 또는 대상체에서 추가의 전이가 진행될 위험을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 치료는 암의 진행을 정지시키거나, 느리게 하거나, 지연시키거나 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료는 대상체에서 암의 하나 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소를 야기할 수 있다.

[0160] 일 양태에서, 본 개시내용은 이의 치료가 필요한 대상체(예컨대, 암을 갖고 있거나 암을 갖는 것으로 확인되거나 진단된 대상체), 예컨대, 유방암(예컨대, 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer)), 카르시노이드암(carcinoid cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 신경교종(glioma), 두경부암(head and neck cancer), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 소세포폐암(small cell lung cancer), 림프종(lymphoma), 흑색종(melanoma), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 위암(gastric cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 방광암(bladder cancer), 요도암(urethral cancer) 또는 혈액학적 악성종양(hematologic malignancy) 환자에게 치료학적 유효량의 본원에 개시된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 암은 절제불가능한 흑색종(unresectable melanoma) 또는 전이성 흑색종(metastatic melanoma), 비소세포폐암종(non-small cell lung carcinoma; NSCLC), 소세포폐암(small cell lung cancer; SCLC), 방광암(bladder cancer), 또는 전이성 호르몬 불응성 전립선암(metastatic hormone-refractory prostate cancer)이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 고형 종양을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 암은 두경부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the head and neck; SCCHN), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma; RCC), 삼중 음성 유방암(TNBC) 또는 결장직장 암종이다. 일부 실시형태에서, 암은 흑색종(melanoma), 췌장 암종(pancreatic carcinoma), 중피종(mesothelioma), 혈액학적 악성종양(hematological malignancy), 특히 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 또는 진행성 고형 종양(advanced solid tumor)이다.

[0161] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 암 위험이 있는 환자의 치료에 사용될 수 있다. 암 환자는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 확인될 수 있다.

[0162] 본원에 사용된 "유효량"은 질환, 예를 들어 암의 진행을 정지하거나, 늦추거나, 지연시키거나, 또는 억제하는 것을 포함하여 유익하거나 원하는 결과를 가져오기에 충분한 양 또는 투여량을 의미한다. 유효량은 예컨대, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및/또는 이의 조성물이 투여될 대상체의 연령 및 체중, 증상의 중증도 및 투여경로에 따라 달라질 것이며, 따라서 투여는 개별 기준으로 결정될 수 있다.

[0163] 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 예로서, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드의 유효량은 환자의 암 진행을 개선, 중지, 안정화, 역전, 억제, 늦춤 및/또는 지연시키기에 충분한 양이거나, 시험실 내에서 세포(예컨대, 생검된 세포, 본원에 기술된 임의의 암 세포, 또는 세포주(예컨대, 암 세포주))의 증식을 개선, 정지, 안정화, 역전, 늦춤 및/또는 지연시키기에 충분한 양이다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, 유효량은 특히 환자 이력뿐만 아니라 다른 요인, 예를 들면, 사용된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드의 유형(및/또는 투여량)에 따라 상이할 수 있다.

[0164] 본원에 개시된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및/또는 조성물을 투여하기에 유효한 양 및 스케쥴은 경험적으로 결정될 수 있고, 그러한 결정을 내리는 것은 당업계의 기술 내에 있다. 당업자는 투여되어야 하는 투여량이 예를 들면, 사용되는 본원에 개시된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 조성물을 수용할 포유동물, 투여 경로, 폴리뉴클

레오타이드의 특정 유형 및/또는 본원에 개시된 조성물 및 포유동물에게 투여되는 다른 약물에 따라 변할 것임을 이해할 것이다.

[0165] 단백질 작제물 및/또는 폴리펩타이드의 유효량의 대표적인 1일 투여량은 0.1mg/kg 내지 100mg/kg(환자 체중 kg당 mg)이다. 일부 실시형태에서, 투여량은 100 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg 또는 0.1mg/kg 미만이다. 일부 실시형태에서, 투여량은 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 또는 0.1mg/kg 미만일 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여량은 약 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg 또는 1mg/kg이다. 일부 실시형태에서, 투여량은 약 1 내지 10 mg/kg, 약 1 내지 5 mg/kg, 또는 약 2 내지 5 mg/kg이다.

[0166] 본원에 기술된 임의의 방법에서, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드는 1주일에 적어도 1회(예컨대, 1주일에 1회, 1주일에 2회, 1주일에 3회, 1주일에 4회, 1일에 1회, 1일에 2회, 또는 1일에 3회)로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0167] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가 치료제를 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 투여하기 전, 또는 후에 대상체에게 투여할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가 치료제는 대상체에서 하나 이상의 추가 치료제와 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드의 생활성 기간이 겹치도록 대상체에게 투여된다.

[0168] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에게 투여될 수 있다. 추가적인 치료제는 B-Raf의 억제제, EGFR 억제제, MEK의 억제제, ERK의 억제제, K-Ras의 억제제, c-Raf의 억제제, 역형성 림프종 키나제(anaplastic lymphoma kinase; ALK) 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K)의 억제제, Akt의 억제제, mTOR의 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤 타이로신 키나제(BTK)의 억제제 및 이소시트레이트 데하이드로게나제 1(IDH1) 및/또는 이소시트레이트 데하이드로게나제 2(IDH2)의 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가의 치료제는 인돌아민 2,3-디옥시게나제-1)(IDO1)(예컨대, 에파카도스타트)의 억제제이다.

[0169] 일부 실시형태에서, 추가 치료제는 HER3의 억제제, LSD1의 억제제, MDM2의 억제제, BCL2의 억제제, CHK1의 억제제, 활성화된 고습도치의 신호전달 경로의 억제제, 및 에스트로겐 수용체를 선택적으로 분해하는 제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다.

[0170] 일부 실시형태에서, 추가의 치료제는 트라벡테딘, nab-파클리탁셀, 트레바나닙, 파조파닙, 세디라닙, 팔보시클립, 에베로리무스, 플루오로피리미딘, IFL, 레고라페닙, 레올리신, 알림타, 자이카디아, 수텐트, 템시롤리무스, 액시티닙, 에베로리무스, 소라페닙, 보트리엔트, 파조파닙, IMA-901, AGS-003, 카보잔티닙, 빈플루닌, Hsp90 억제제, Ad-GM-CSF, 테마졸로마이드, IL-2, IFNa, 빈블라스틴, 탈로마이드, 다카르바진, 사이클로포스파미드, 레날리도마이드, 아자시티딘, 레날리도마이드, 보르테조미드, 암루비신, 카르필조밉, 프랄라트렉세이트 및 엔자스타우린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0171] 일부 실시형태에서, 추가 치료제는 애주반트(adjuvant), TLR 작용제, 종양 괴사 인자(TNF) 알파, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, IL-17 길항제, HVEM 길항제, ICOS 작용제, CX3CL1 표적 치료제, CXCL9 표적 치료제, CXCL10 표적 치료제, CCL5 표적 치료제, LFA-1 작용제, ICAM1 작용제 및 셀렉틴 작용제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0172] 일부 실시형태에서, 카보플라틴, 납-파클리탁셀(nab-paclitaxel), 파클리탁셀, 시스플라틴, 페메트렉세드, 젬시타빈, FOLFOX 또는 FOLFIRI가 대상체에게 투여된다.

[0173] 일부 실시형태에서, 추가 치료제는 항-OX40 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-SIRPα 항체, 항-CD47 항체, 항-LAG-3 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA 항체, 항-CTLA-4 항체, 또는 항-GITR 항체이다. 일부 실시형태에서, 추가 치료제는 항-CD20 항체(예컨대, 리툭시맙) 또는 항-EGF 수용체 항체(예: 세툭시맙)이다.

[0174] **약제학적 조성물 및 투여 경로**

[0175] 또한, 본원에 기술된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 함유하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 임의의 방식으로 제형화될 수 있다.

[0176] 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로(예컨대, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내)에 적합하도록 제형화된다. 조성물은 멸균 희석제(예: 멸균수 또는 식염수), 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매, 항세균제 또는 항진균제(예: 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤, 클로로부탄올, 페

놀, 아스코르브산, 티메로살 등), 항산화제, 예를 들면, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨, 킬레이팅제(chelating agent), 예를 들면, 에틸렌디아민테트라아세트산, 완충제, 예를 들면, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 등장성 제제, 예를 들면, 당(예컨대, 덱스트로스), 다가알코올(예컨대, 만니톨 또는 소르비톨), 염(예컨대, 염화나트륨), 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 리포솜 현탁액을 또한 약제학적으로 허용되는 담체로 사용할 수 있다. 조성물의 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 제형화되고 봉입될 수 있다. 필요한 경우(예를 들어 주사 가능한 제제에서와 같이), 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅 또는 계면활성제를 사용하여 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 흡수를 지연시키는 제제(예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)을 포함시켜 제제의 흡수를 연장시킬 수 있다. 대안적으로, 조절된 방출은 생분해성, 생체적합성 중합체(예컨대, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산)를 포함할 수 있는, 임플란트 및 미세캡슐화된 전달 시스템에 의해 달성될 수 있다.

[0177] 본원에 기재된 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 투여 단위 형태(즉, 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 예정된 양의 활성 화합물을 함유하는 물리적으로 분리된 단위)로 비경구(예컨대, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내) 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0178] 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균되고 실질적으로 등장성이며 우수 제조관리 기준(Good Manufacturing Practice; GMP) 조건 하에 제조된다. 약제학적 조성물은 단위 투여량 형태(즉, 단일 투여를 위한 투여량)로 제공될 수 있다. 약제학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 선택한 투여 경로에 의존한다. 주사의 경우, 제제는 주사 부위의 불편함을 줄이기 위해 수용액, 바람직하게는 생리학적으로 적합한 완충액 속에서 제형화될 수 있다. 용액은 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드는 사용 전에 적합한 비히클, 예컨대, 발열원이 없는 멸균수로 구성하기 위한 동결건조된 형태일 수 있다.

[0179] 조성물의 독성 및 치료학적 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물(예컨대, 원숭이)에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, LD50(집단의 50%까지 치사하는 용량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량): LD50:ED50의 비인 치료 지수(therapeutic index)을 결정할 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 제제가 선호된다. 제제가 바람직하지 않은 부작용을 나타내는 경우, 잠재적 손상을 최소화하기(즉, 원치 않는 부작용을 감소시키기) 위해 주의를 기울여야 한다. 독성 및 치료학적 효능은 다른 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다.

[0180] 예시적인 용량은 대상체의 체중 킬로그램당 본원에 기술된 임의의 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드의 밀리그램 또는 마이크로그램 양(예컨대, 약 1 μg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 100 μg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 100 μg/kg 내지 약 50mg/kg; 약 10 μg/kg 내지 약 5mg/kg; 약 10 μg/kg 내지 약 0.5mg/kg; 약 1 μg/kg 내지 약 50 μg/kg; 약 1mg/kg 내지 약 10mg/kg; 또는 약 1mg/kg 내지 약 5mg/kg)을 포함한다. 이들 용량은 넓은 범위를 포괄하지만, 당업자는 치료학적 제제가 이의 효능이 다양할 수 있고 유효량이 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 전형적으로, 처음에는 상대적으로 낮은 용량을 투여하고 담당 의료 전문가, 수의사(치료학적 적용의 경우) 또는 연구자(아직 개발 단계에서 작업 중인 경우)는 적절한 반응이 수득될 때까지 후속적으로 및 점차적으로 용량을 증가시킬 수 있다. 또한, 임의의 특정 대상에 대한 특정 용량 수준은 사용된 특정 화합물의 활성, 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별 및 식이(diet), 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 및 생체 내 반감기를 포함하는 다양한 요인에 의존할 것이라는 것이 이해된다.

[0181] 약제학적 조성물은 투여 설명서와 함께 용기, 팩(pack) 또는 디스펜서(dispenser)에 포함될 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 기술된 바와 같은 다양한 용도를 위한 단백질 작제물 또는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[0182] **실시예**

[0183] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기술되며, 이는 청구범위에 기술된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0184] **실시예 1. PD1 x SIRPα x TGFβ 트랩 포맷을 사용한 Fc-기반 디자이너 생물학적 제제(FBDB™)의 설계**

[0185] FBDB™의 상이한 삼중-표적화 포맷은 (1) PD-L1^{+} 종양 세포에 대해 치료제를 지시하고; (2) 선천적 면역성(예컨대, SIRPα/CD47 경로의 표적화) 및 적응 면역성(adaptive immunity)(예컨대, PD-1/PD-L1 경로 표적화)의 힘을 합하고; (3) TGFβ-유도된 면역억제를 역전시키기 위해, 설계하고 개발하였다.

[0186] 각 포맷은 IgG(예컨대, 인간 IgG4)의 Fc 영역에 직접 또는 간접적으로 연결된 적어도 3개의 상이한 유형의 면역

모듈(immune module)을 포함한다. 3개의 면역 모듈: (1) 식세포작용을 유도하여 항원-제시를 자극할 수 있는 하나 이상의 SIRPα 세포외 도메인; (2) PD-1/PD-L1 경로를 차단하여 T 세포 기능을 향상시키고 SIRPα x PD-1 x TGFβ-트랩 분자를 PD-L1 발현 종양으로 안내할 수 있는 하나 이상의 PD-1 세포외 도메인; 및 (3) 면역-억제성 TGFβ를 포획하고 종양 미세환경을 개선하여 면역 반응을 증강시킬 수 있는 하나 이상의 TGFβ-트랩 분자(예컨대, TGF-베타 수용체 유형-2(TGFBR2)의 세포외 도메인)이다. 예를 들면, SIRPα 세포외 도메인은 종양 세포에서의 CD47과 대식세포에서의 SIRPα 사이의 상호작용을 차단함으로써 대식세포에 대해 "나를 먹지 마세요" 브레이크를 방출할 수 있고; PD-1 세포외 도메인은 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 차단함으로써 효과기 T 세포에 대한 억제 브레이크를 방출할 수 있고; TGFβ-트랩 분자는 종양 미세환경(TME)에서 TGFβ 기능을 억제할 수 있다.

[0187] FBDB™의 4개의 삼중-표적화 포맷은 **도 1a 내지 1d**에 도시된 바와 같이 설계되었다. HCB301-4(또는 PST_v2; **도 1a**에 나타낸 개략적인 구조)는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 구체적으로, 각각의 폴리펩타이드 쇄는, N-말단으로부터 C-말단까지, PD-1 세포외 도메인(서열 번호: 5; 인간 PD-1 단백질의 26 내지 170번 아미노산과 동일한 서열(NCBI 수탁 번호: NP_005009.2; 서열 번호: 11)을 지님), SIRPα 세포외 도메인(서열 번호: 6; 인간 SIRPα 단백질의 31 내지 148번 아미노산과 동일한 서열(NCBI 수탁 번호: AAH26692.1; 서열 번호: 12)을 지님), 인간 IgG4 힌지 영역(EU 넘버링에 따른 S228P 돌연변이를 지님), 인간 IgG4 Fc 및 TGFBR2 세포외 도메인(서열 번호 7; NCBI 수탁 번호 NP_003233.4의 24 내지 159번 아미노산과 동일한 서열; 서열번호: 13을 지님)을 포함한다. PD-1 세포외 도메인 및 SIRPα 세포외 도메인은 $(GSG)_6$ 링커 펩타이드(서열 번호: 8)를 통해 연결된다. TGFBR2 세포외 도메인은 $(G4S)_4G$ 링커 펩타이드(서열 번호: 9)를 통해 인간 IgG4 Fc의 C-말단에 연결된다.

[0188] HCB301-3(또는 SPT_v2; **도 1b**에 나타낸 개략적 구조)은 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 구체적으로, 각각의 폴리펩타이드 쇄는, N-말단을부터 C 말단까지, SIRPα 세포외 도메인(서열 번호: 6), PD-1 세포외 도메인(서열 번호: 5), 인간 IgG4 힌지 영역(EU 넘버링에 따른 S228P 돌연변이를 지님), 인간 IgG4 Fc, 및 TGFBR2 세포외 도메인(서열 번호: 7)을 포함한다. SIRPα 세포외 도메인 및 PD-1 세포외 도메인은 $(GSG)_6$ 링커 펩타이드(서열 번호: 8)를 통해 연결된다. TGFBR2 세포외 도메인은 $(G4S)_4$ G 링커 펩타이드(서열 번호: 9)를 통해 인간 IgG4 Fc의 C-말단에 연결된다.

[0189] HCB301-2(또는 P2ST_v2; **도 1c**에 나타낸 개략적 구조)는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 구체적으로, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 N-말단으로부터 C-말단까지, $(G4S)_3$ 링커(서열 번호 10)를 통해 연결된 2개의 동일한 PD-1 세포외 도메인(서열 번호 5), SIRPα 세포외 도메인(서열 번호 6), 인간 IgG4 힌지 영역(EU 넘버링에 따른 S228P 돌연변이를 지님), 인간 IgG4 Fc, 및 TGFBR2 세포외 도메인(서열 번호: 7)을 포함한다. 2개의 PD-1 세포외 도메인은 $(GSG)_6$ 링커 펩타이드(서열 번호: 8)를 통해 SIRPα 세포외 도메인의 N-말단에 연결된다. TGFBR2 세포외 도메인은 $(G4S)_4G$ 링커 펩타이드(서열 번호: 9)를 통해 인간 IgG4 Fc의 C-말단에 연결된다.

[0190] HCB301-1(또는 SP2T_v2; **도 1d**에 나타낸 개략적인 구조)은 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 구체적으로, 각각의 폴리펩타이드 쇄는, N-말단으로부터 C-말단까지, SIRPα 세포외 도메인(서열 번호: 6), $(G4S)_3$ 링커(서열 번호: 10)를 통해 연결된 2개의 동일한 PD-1 세포외 도메인(서열 번호: 5), 인간 IgG4 힌지 영역(EU 넘버링에 따른 S228P 돌연변이를 지님), 인간 IgG4 Fc 및 TGFBR2 세포외 도메인(서열 번호: 7)을 포함한다. SIRPα 세포외 도메인은 $(GSG)_6$ 링커 펩타이드(서열 번호: 8)를 통해 2개의 PD-1 세포외 도메인 중 하나에 연결된다. TGFBR2 세포외 도메인은 $(G4S)_4$ G 링커 펩타이드(서열 번호: 9)를 통해 인간 IgG4 Fc의 C-말단에 연결된다.

[0191] 발현된 단백질을 단백질 A 컬럼에 이어, HPLC-SEC(크기-배제 크로마토그래피와 커플링된 고-성능 액체 크로마토그래피, Agilent)로 정제하고, 고-분자량 피크의 퍼센트(HMW%), 주요 피크의 퍼센트(Main%), 저분자량 피크의 백분율(LMW%)을 측정하였다.

[0192] 구체적으로, HCB301 단백질은 CHO-S 세포에서 발현되었다. 배양 상층액을 수집하여 단백질 A 정제에 적용하였다. 배양 상층액 pH는 농축된 평형 완충제(250mM 트리스, 1500mM NaCl, pH 8.0)을 첨가하여 8.0으로 조정하였다. 다음으로, 단백질 A 컬럼을 10× 컬럼 용적의 평형화 완충제(25mM 트리스, 150mM NaCl, pH 8.0)으로 평형화한 후, 배양 상층액을 평형화된 단백질 A 컬럼에 로딩하였다. 그런 다음 컬럼을 6×컬럼 용적의 세척 완충제(100mM 시트르산, 500mM NaCl)으로 세척하였다. 단백질 샘플은 6×컬럼 용적의 용출 완충제(100mM 아세테이

트, 200mM NaCl, pH 3.0)으로 용출하였고, 1M Hepes를 함유한 완충제, pH 8.0로 pH를 6.5 내지 7로 조정하였다. 하기 표에 나타낸 바와 같이, HCB301-3 및 HCB301-4의 발현 수준(역가)은 HCB301-1 또는 HCB302-2와 비슷하고 더 높았다. 단백질 A 정제 후, HCB301 단백질의 주요 피크 퍼센트(Main%)는 87.88% 내지 94.38%의 범위이었고; HCB301 단백질의 고분자량 피크의 퍼센트(HMW%)는 1.35% 내지 5.43의 범위이었고; HCB301 단백질의 저분자량 피크의 퍼센트(LMW%)는 1.27% 내지 10.78%의 범위이었다. 결과는 4개의 HCB301 단백질(HCB301-1, HCB301-2, HCB301-3 및 HCB301-4) 모두가 고 순도로 발현 및 수확(harvesting)될 수 있음을 나타낸다.

[0193] [표 1]

포맷	MW (kDa)	pI	역가(mg/mL)	단백질 A 정제 후 HCB301 (CHO-S)의 HPLC-SEC (Agilent) 프로파일		
				HMW%	Major%	LMW%
HCB301-4	145.11	5.77	177.15	4.35	94.38	1.27
HCB301-3	145.11	5.77	179.87	5.43	92.35	2.22
HCB301-2	179.27	6.05	62.07	1.35	87.88	10.78
HCB301-1	179.27	6.05	109.21	2.57	91.22	6.22

[0194]

[0195] 또한, HCB301-1, HCB301-2, HCB301-3, 및 HCB301-4의 아미노산 서열을 탈면역화 도구(deimmunization tool)(Immune Epitope Database And Analysis Resource; Dhanda et al. "Development of a strategy and computational application to select candidate protein analogues with reduced HLA binding and immunogenicity." Immunology 153.1(2018): 118-132)를 사용하여 분석함으로써 면역원성 영역을 확인하였다. 면역원성은 확인되지 않았다.

[0196] **실시예 2. CD47 tf CHO-S 세포에 대한 전체 세포 결합 능력의 결정**

[0197] 세포 표면에 발현된 CD47에 대한 HCB301 단백질의 전체 세포 결합 능력을 결정하기 위해, 인간 CD47을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포(CD47 tf CHO-S)를 표적 세포로서 사용하였다. 5 x 10^4개의 세포를 FACS 완충제(4% 소 태아 혈청(FBS)이 보충된 포스페이트-완충된 염수(PBS)) 속에서 나타낸 농도(6.4 pM, 32 pM, 160 pM, 0.8 nM, 4 nM, 20 nM, 100 nM 및 500 nM)로 연속 희석된 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피로에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분간 배양하였다. 샘플을 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. SIRPα_G4는 양성 대조군으로 사용하였다. SIRPα_G4는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. PD1_G4를 음성 대조군으로 사용하였다. PD1_G4는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 서열 번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0198] **도 2**에 도시된 바와 같이, 4개의 HCB301 단백질 모두는 CD47 tf CHO-S 세포에 결합할 수 있다. 구체적으로, 양성 대조군 SIRPα_G4는 가장 높은 CD47 결합 능력을 나타내었고, HCB301-3 및 HCB301-1이 그 뒤를 이었다. HCB301-4 및 HCB301-2는 또한 CD47-발현 세포에 결합할 수 있다. 대조적으로, 음성 대조군 PD1_G4에 대해서는 결합 신호가 검출되지 않았다.

[0199] **실시예 3. PDL1 tf CHO-S 세포에 대한 전체 세포 결합 능력의 결정**

[0200] PD-L1에 대한 HCB301 단백질의 결합 능력을 결정하기 위해, 인간 PD-L1을 발현하는 형질감염된 CHO-S 세포(PDL1 tf CHO-S)를 표적 세포로서 사용하였다. 3×10^4개의 세포를 FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(6.4pM, 32pM, 160pM, 0.8nM, 4nM, 20nM 및 100nM)로 연속 희석된 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피코에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분간 배양하였다. 샘플은 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. PD1_G4는 양성 대조군으로 사용하였다. Hu5F9-G4(항-CD47 참고 항체) 및 SIRPα_G4를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0201] **도 3**에 나타낸 바와 같이, 4개의 HCB301 단백질 모두는 PDL1 tf CHO-S 세포에 결합할 수 있다. 구체적으로, HCB301-1과 HCB301-2는 양성 대조군인 PD1_G4에 비해 더 높은 결합능력을 나타내었고, PD1_G4는 HCB301-4와 HCB301-3에 비해 더 높은 결합 능력을 나타내었다. 대조적으로, 음성 대조군 Hu5F9-G4 및 SIRPα_G4에 대해서는

결합 신호가 검출되지 않았다.

[0202] **실시예 4. CD47-발현 종양 세포에 대한 전체 세포 결합 능력의 결정**

[0203] 종양 세포 표면에 발현된 CD47에 대한 HCB301 단백질의 전체 세포 결합 능력을 결정하기 위해, 내인성 CD47을 발현하는 하인두 암종(hypopharyngeal carcinoma) FaDu 세포를 표적 세포로서 사용하였다. 3 x 10^4 개의 FaDu 세포를 FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(6.4 pM, 32 pM, 160 pM, 0.8 nM, 4 nM, 20 nM 및 100 nM)로 일련 희석된 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피코에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson Immu noResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 샘플은 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. Hu5F9-G4 및 SIRPα_G4를 양성 대조군으로 사용하였다. PD1_G4는 음성 대조군으로 사용하였다.

[0204] **도 4**에 나타낸 바와 같이, 4개의 HCB301 단백질 모두는 FaDu 세포에 결합할 수 있다. 구체적으로 HCB301-1은 가장 높은 결합능력을 나타내었고, HCB301-3, HCB301-4, HCB301-2 순으로 나타났다. 대조적으로, 음성 대조군 PD1_G4에 대해서는 결합 신호가 검출되지 않았다.

[0205] **실시예 5. RBC에 대한 전체 세포 결합 능력의 결정**

[0206] 적혈구(RBC)에 대한 HCB301 단백질의 결합 능력을 결정하기 위해, 1 x 10^5개의 인간 RBC를 FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(6.4pM, 32pM, 160pM, 0.8nM, 4nM, 20nM, 100nM, 및 500nM)로 연속 희석시킨 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, RBC를 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피코에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 샘플을 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. Hu5F9-G4를 양성 대조군으로 사용하였다. PD1_G4는 음성 대조군으로 사용하였다.

[0207] **도 5a 및 5b**에 나타낸 바와 같이, 양성 대조군 Hu5F9-G4는 적혈구에 대해 강한 결합 능력을 나타냈다. 대조적으로, 4개의 HCB301 단백질 모두는 RBC에 대해 약한 결합을 나타내었다. 구체적으로, HCB301-3은 HCB301-1 보다 높은 RBC 결합능력을 나타내었고, HCB301-3 및 HCB301-1 둘 다의 결합은 SIRPα_G4의 것보다 더 높았다. HCB301-4 및 HCB301-2는 보다 낮은 RBC 결합 능력을 나타내었고, 이는 PD1_G4의 것과 비교가능하였다.

[0208] **실시예 6. 혈소판에 대한 전체 세포 결합 능력의 결정**

[0209] 혈소판에 대한 HCB301 단백질의 결합 능력을 결정하기 위해, 5 x 10^5개의 인간 혈소판을 FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(6.4pM, 32pM, 160pM, 0.8nM, 4nM, 20nM, 100nM, 및 500 nM)로 일련 희석시킨 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 혈소판을 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피코에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 샘플을 CytoFLEX 유세포 분석기(flow cytometer)(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. Hu5F9-G4는 양성 대조군으로 사용하였다. PD1_G4 및 SIRPα_G4는 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0210] **도 6a 및 6b**에 나타낸 바와 같이, 양성 대조군 Hu5F9-G4는 혈소판에 대해 강한 결합 능력을 나타내었다. 대조적으로, 모든 HCB301 단백질은 혈소판에 대해 약한 결합을 나타내었다. 구체적으로, HCB301-3은 HCB301-2 및 HCB301-1보다 더 높은 혈소판 결합 능력을 나타내었다. HCB301-4는 보다 낮은 RBC 결합 능력을 나타내었고, 이는 SIRPα_G4의 것과 비교가능하였다.

[0211] **실시예 7. hTGFβ1, hTGFβ2 및 hTGFβ3에 대한 결합 능력의 결정**

[0212] 인간 TGFβ에 대한 HCB301 단백질의 결합 능력을 결정하기 위해, 결합 적정 ELISA 검정을 나타낸 농도(25.4pM, 76.2pM, 228.6pM, 685.8pM, 2.1nM, 6.2nM, 18.5nM, 55.6nM, 166.7nM, 또는 500nM)에서 HCB301 단백질을 사용하여 수행하였다. IgG4-TGFβ 트랩을 양성 대조군으로 사용하였다. SIRPα_G4는 음성 대조군으로 사용하였다. 96-웰 EIA 마이크로플레이트를 1μg/ml의 인간 TGFβ(TGFβ1, TGFβ2, 또는 TGFβ3)로 밤새 4℃에서 코팅하였다. 5% 탈지유를 함유한 1×PBS로 차단한 후, 희석된 HCB301 단백질을 가하고 실온(RT)에서 1시간 동안 배양하였다. 웰을 1x PBST(0.1% Tween 20을 함유하는 1x PBS)로 3회 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. HRP-접합된 2차 항체(1:5000)를 실온에서 1시간 동안 웰에 가하였다. 배양 후, 웰을 1x PBST로 3회 세척하여 과도한 2차 항체를 제거하였다. 최종적으로 발색에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 발색현상에 가하였다. 반응을 중단하

고 HRP 활성을 450nm에서 분광광도계를 사용하여 측정하였다.

[0213] **도 7a 내지 7c**에 나타낸 바와 같이, EC50 값을 또한 결합 곡선에 따라 결정하였다. 결과는 HCB301 단백질이 hTGFβ1 및 hTGFβ3에 결합할 수 있지만 hTGFβ2에 대해 약한 결합 능력을 나타내었음을 나타낸다. 구체적으로, hTGFβ3에 결합하는 HCB301-1, HCB301-3 및 HCB301-4의 EC50 값은 hTGFβ1에 결합하는 이의 각각의 EC50 값보다 낮았다.

[0214] **실시예 8. PD-L1-발현 세포에 대한 선택적 결합**

[0215] PD-L1 발현 세포에 대한 HCB301 단백질의 선택적 결합 능력을 다음과 같이 결정하였다. OE19 세포를 CellTrace™ CFSE(Thermo, 제품 번호: C34554)로 표지하고, PD-L1(PD-L1 tf OE19)을 발현하는 형질감염된 OE19 세포를 제조업자가 제공한 설명서에 따라 Celltrace ™ 바이올렛(Thermo, 제품 번호: C34557)으로 표지하였다. 2 × 10^4개의 세포/웰의 CellTrace™ CFSE-표지된 OE19 세포(OE19-CFSE) 및 2 × 10^4개의 PD-L1 tf OE19 세포를 발현하는 CellTrace™ 바이올렛-표지된 형질감염된 OE19 세포(OE19-violet)를 FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(6.4pM, 32pM, 160pM, 0.8nM, 4nM, 20nM, 100nM, 및 500nM)로 일련 희석된 HCB301 단백질과 함께 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척한 다음, R-피코에리트린-AffiniPure 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, 제품 번호: 109-115-098)와 함께 4℃에서 30분간 배양하였다. 샘플은 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아 주 소재)를 사용하여 분석하였다. 이후에, PE 신호에 따라 세포를 게이트(gate)하여 Kaluza 분석 소프트웨어(Beckman Coulter Inc.)로 상이한 세포 유형의 퍼센트를 계산하였다. PD1_G4는 양성 대조군으로 사용하였고 SIRPα_G4는 음성 대조군으로 사용하였다.

[0216] **도 8a**에 나타낸 바와 같이, 32 pM에서, 모든 HCB301 단백질은 OE19-CFSE 세포에 비해 PD-L1을 발현하는 OE19-violet 세포에 대해 선택적인 결합을 나타내었다. **도 8b 내지 8g**는 2개의 세포 유형에 대한 SIRPα_G4, PD1_G4, 및 4개의 HCB301 단백질(HCB301-1, HCB301-2, HCB301-3 및 HCB301-4)의 결합 곡선을 각각 나타낸다.

[0217] **실시예 9. 적혈구응집(HA) 활성**

[0218] HCB301 단백질에 의해 유도된 HA 활성을 결정하기 위해, 건강한 공여체의 전혈로부터 10% RBC 용액을 제조하였다. RBC를 0.9% NaCl 완충제로 2회 세척한 다음, 0.9% NaCl 완충제에 10 용적%로 희석하였다. HCB301 단백질을 8.4pM, 25.4pM, 76.2pM, 228.6pM, 685.8pM, 2.1nM, 6.2nM, 18.5nM, 55.6nM, 166.7nM, 또는 500nM의 최종 농도로 일련 희석(3배)하였다. 희석된 단백질을 환저 96-웰 플레이트(round-bottom 96-well plate) 속에서 12μl의 10% RBC 용액과 함께 실온에서 밤새 배양하였다. 응집된 RBC는 웰을 균일하게 코팅한 반면, 응집되지 않은 세포는 웰의 바닥에 뚜렷한 적색 점을 형성하였다. Hu5F9-G4를 양성 대조군 PC로 사용하였다. SIRPα_G4, PD1_G4, 및 IgG4-TGFβ 트랩을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0219] 플레이트의 영상은 **도 9**에 나타낸 바와 같이, 다음날 캡쳐되었다. 영상은 Hu5F9-G4 만이 고 농도에서 HA 활성을 유도한 반면, 4개의 HCB301 단백질을 포함한, 다른 시험한 분자 중 어느 것도 위에 나타낸 농도 범위 내에서 HA 활성을 유도하지 않았음을 나타낸다.

[0220] **실시예 10. SIRPα/CD47 상호작용에 대한 차단 효과의 결정**

[0221] HCB301 단백질의 SIRPα 리간드 차단 능력을 결정하기 위해, CD47 tf CHO-S 세포를 표적 세포로 사용하여 유세포 분석-기반 검정을 수행하였다. 구체적으로, 3 x 10^4개의 세포/웰의 CD47 tf CHO-S 세포를 고정된 농도의 바이오티닐화된 SIRPα_G4와 함께, FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(0.2pM, 1.9pM, 15.2pM, 122.1pM, 876.6pM, 7.8nM, 62.5nM, 및 500 nM)에서 일련 희석시킨 HCB301 단백질과 4℃ 30분 동안 배양하였다. 세척 후, 스트렙타비딘-PE(eBioscience, 제품 번호: EBS12-4317-87)를 웰당 0.3μg에서 가하고, 세포로부터의 PE 신호를 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc.)를 사용하여 분석하였다. Hu5F9 및 SIRPa_G4를 양성 대조군으로 사용하였다. 항-PD-1 항체(인간 IgG4 Fc 포함)를 동형 대조군으로 사용하였다.

[0222] **도 10에** 나타낸 바와 같이, Hu5F9-G4는 가장 강한 차단 효과를 나타내었고, SIRPα_G4, 및 4개의 HCB301 단백질이 그 뒤를 이었다. 보다 구체적으로, 4개의 HCB301 단백질의 차단 효과는 강한 것으로부터 약한 것까지: HCB301-3, HCB301-1, HCB301-4, 및 HCB301-2로서 순위가 매겨질 수 있다.

[0223] **실시예 11. PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 차단 효과의 결정**

[0224] PD-1과 PD-L1 tf CHO-S 세포 사이의 상호작용에 대한 HCB301 단백질의 차단 효과를 다음과 같이 결정하였다. 3

x 10^4개의 세포/웰의 PD-L1 tf CHO-S 세포를 고정된 농도의 바이오티닐화된 PD1_G4와 함께, FACS 완충제(4% FBS가 보충된 PBS) 속에서 나타낸 농도(0.2pM, 1.9pM, 15.2pM, 122.1pM, 876.6pM, 7.8nM, 62.5nM, 및 500 nM)로 일련 희석된 HCB301 단백질과 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 세척 후, 스트렙타비딘-PE(eBioscience, 제품 번호: EBS12-4317-87)를 웰당 0.3μg에서 가하고, 세포로부터의 PE 신호를 CytoFLEX 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc.)를 사용하여 분석하였다. MPDL3280A(항-PD-L1 항체) 및 PD1_G4를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0225] **도 11**에 나타낸 바와 같이, MPDL3280A는 가장 강한 차단 효과를 나타내었다. HCB301-1과 HCB301-2는 PD1_G4보다 더 강력한 차단 효과를 나타내었다. HCB301-4는 PD1_G4에 비해 보다 약한 차단효과를 나타내었지만, HCB301-3보다는 보다 강한 차단효과를 나타내었다. 결과는 각각의 폴리펩타이드 쇄 내에 2개의 PD-1 세포외 도메인을 갖는 HCB301 단백질이 각각의 폴리펩타이드 쇄 내에 1개의 PD-1 세포외 도메인을 갖는 것보다 PD-1/PD-L1 상호작용을 더 효율적으로 차단할 수 있음을 나타낸다.

[0226] **실시예 12. TGFβ-유도된 smad2 리포터 활성의 억제**

[0227] TGFβ1-유도된 smad2 리포터 활성을 억제하는 HCB301 단백질의 능력을 다음과 같이 결정하였다. HCB301 단백질을 6.4pM, 32pM, 160pM, 0.8nM, 4nM, 20nM, 100nM 및 500nM의 최종 농도로 일련 희석(5배)하였다. M7824(항-PD-L1 × TGFβ 트랩), 항-TGFβ(항-TGFβ 항체, BioXcell, 제품 번호: BE0057) 및 IgG4-TGFβ 트랩을 양성 대조군으로 사용하였다. SIRPα_G4는 음성 대조군으로 사용하였다. smad2 리포터를 발현하는 4 x 10^3개의 형질감염된 HEK293T 세포를 20 ng/ml의 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3, 각각과 함께, 희석된 HCB301 단백질과 배양하였다. 5%의 CO_2 배양기에서 37℃에서 24시간 동안 배양한 후, Varioskan™ LUX 다중모드 마이크로플레이트 판독기(multimode microplate reader)(Thermo)로 발광 신호를 검출하였다.

[0228] **도 12a**에 나타낸 바와 같이, 4개의 HCB301 단백질 모두는 TGFβ1-매개된 smad2 리포터 활성을 억제할 수 있다. 각각의 HCB301 단백질은 M7824 및 IgG4-TGFβ 트랩보다 더 강한 억제 능력을 나타내었다. 구체적으로, HCB301-3, HCB301-4, 및 HCB301-1은 HCB301-2의 것보다 더 강한 억제능을 나타내었다. **도 12b 및 도 12c**에 나타낸 바와 같이, HCB301-3, HCB301-4, 및 HCB301-1은 TGFβ3-매개된 smad2 리포터 활성을 억제할 수 있지만, TGFβ2-매개된 smad2 리포터 활성은 억제할 수 없다. 특히, HCB301-3, HCB301-4, 및 HCB301-1은 IgG4-TGFβ 트랩 또는 M7824와 비교하여 비교가능한 TGFβ3 억제 능력을 나타내었다.

[0229] **실시예 13. 식균작용 CD47-발현 종양 세포에 대한 대식세포의 유도**

[0230] 암 세포에서 HCB301 단백질에 의해 유도된 대식세포-매개된 식균작용을 결정하기 위하여, 다음과 같이 식균작용 검정을 수행하였다. CD47-발현 저켓 세포를 5nM CellTrace™ CFSE(Thermo, 제품 번호: C34554)로 37℃에서 10분 동안 표지한 다음, 완전 RPMI-1640 배지로 세척하였다. 1 x 10^5개의 세포/웰 CFSE-표지된 저켓 세포(표적 세포)를 낮은 결합 96-웰 U-자형 바닥 플레이트(low binding 96-well U-shaped bottom plate) 속에서 나타낸 농도(10pM, 100pM, 1nM, 10nM, 100nM, 및 1μM)로 연속 희석된 HCB301 단백질과 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 이후에, 5×10^4개의 Raw264.7 마우스 대식세포를 각각의 웰에 가하고 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. Raw264.7 세포를 PE-시아닌 7 접합된 F4/80 항체(eBioscience, 제품 번호: 25-4801-82)로 염색하였다. HCB301 단백질의 식세포작용 능력은 CytoFlex 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc.)에 의해 대식세포로부터의 총 F4/80 신호에 걸쳐 대식세포로부터 CFSE + F4/80+의 퍼센트(대식세포가 식세포작용한 CFSE-표지된 저켓 세포를 나타냄)를 계산함으로써 평가하였다. Hu5F9-G4 및 SIRPα_G4를 양성 대조군으로 사용하였다. PD1_G4는 음성 대조군으로 사용하였다. 항-PD-1 항체(인간 IgG4 Fc를 지님)은 동형 대조군으로 사용하였다.

[0231] **도 13**에 나타난 바와 같이, Hu5F9-G4는 CD47-발현 저켓 세포에서 Raw264.7-매개된 식세포작용을 유도하는 가장 강력한 능력을 나타내었고, 이어서 SIRPα_G4이었다. HCB301-3, HCB301-1, 및 HCB301-4는 또한 대식세포가 저켓 세포를 식균작용하도록 유도하였다. 대조적으로, PD1_G4 및 동형 대조군은 시험한 농도에서 식세포작용을 유도하지 않았다.

[0232] **실시예 14. TGFβ1의 존재 하에 MLR 검정에서 T 세포 반응의 향상**

[0233] TGFβ1 존재 하에 혼합된 림프구 반응(MLR) 검정을 수행하여 HCB301 단백질에 의한 T 세포 반응의 향상을 결정하였다. T 세포를 5nM CellTrace™ 바이올렛(Thermo, 제품 번호: C34557)으로 37℃에서 10분간 표지한 다음, 완전 RPMI-1640 배지로 2회 세척하였다. 1 x 10^5개의 CellTrace™ violet-표지된 CD4+ T 세포 및 1 x 10^4개의 수지 세포(DC)를 2 nM, 20 nM, 또는 200 nM에서 HCB301 단백질과 함께 배양하였다. 대조군 분자 또는 이의

조합, 예컨대, PDGFR-Fc, SIRPα_G4, PD1_G4, IgG4-TGFβ 트랩, M7824, SIRPα_G4+PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩, SIRPα_G4+PD1_G4, SIRPα_G4+IgG4-TGFβ 트랩, 및 PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩을 또한 배양에 사용하였다. PDGFR-Fc는 음성 대조군으로 사용하였다. PDGFR-Fc는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 Fc에 융합된 PDGFR 세포외 도메인을 갖는다. 이후에, NC1-H650 세포로부터의 TGFβ1-함유 조건 배지를 가하고 5일 동안 공-배양(co-incubating)하였다. 공-배양 후, 세포를 수거하고 세포 증식을 CytoFLEX-S 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc.)로 분석하였다. 배양 상층액을 또한 수집하고, IL-2 분비와 IFN-γ 분비를 인간 IL-2 ELISA MAX 디럭스 키트(Deluxe kit)(BioLegend, 제품 번호; 431805) 및 인간 IFNγ ELISA MAX 디럭스 키트(BioLegend, 제품 번호: 430105)를 사용하여 측정하였다.

[0234] **도 14a**에 도시된 바와 같이, MLR 검정에서 세포 증식은 CellTrace™ violet 세포 증식 키트(Thermo, 제품 번호: C34557)를 사용하여 결정하였다. 구체적으로, CD3+/7-ADD-세포(전체 T 세포를 나타냄)에 비해 약한 CellTrace™ violet-표지된 세포(증식 세포를 나타냄)의 퍼센트를 계산하였다. 결과는 HCB301-3, HCB301-4 및 HCB301-1로 처리된 세포가 대조군 분자 또는 이의 조합의 세포 증식과 비교하여 세포 증식을 유의적으로 변화시키지 않았음을 나타낸다.

[0235] **도 14b**에 나타낸 바와 같이, MLR 검정에서 IL-2 분비는 인간 IL-2 ELISA MAX Deluxe 키트를 사용하여 결정하였다. 결과는, M7824가 가장 높은 IL-2 분비 수준을 나타내었고, HCB301-1, HCB301-3, 및 HCB301-4가 그 뒤를 이었음을 나타내었다. 특히, HCB301-4를 처리한 세포는 IgG4-TGFβ 트랩 및 SIRPα_G4+PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩의 것과 비교하여 유사한 IL-2 분비 수준을 가졌다. SIRPα_G4+IgG4-TGFβ 트랩 또는 PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩으로 처리된 세포는 IL-2 분비 수준이 낮았다.

[0236] **도 14c**에 나타낸 바와 같이, MLR 검정에서 IFN-γ 분비는 인간 IFNγ ELISA MAX Deluxe 키트를 사용하여 결정하였다. 결과는 HCB301-1이 가장 높은 IFN-γ 분비 수준을 나타내었고, M7824, PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩, HCB301-3, 및 HCB301-4가 그 뒤를 이었다. PD1_G4, SIRPα_G4, SIRPα_G4+PD1_G4, SIRPα_G4+PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩, SIRPα_G4+PD1_G4, 및 SIRPα_G4+IgG4-TGFβ 트랩으로 처리된 세포는 유사하고 낮은 IFN-γ 분비 수준을 가졌다.

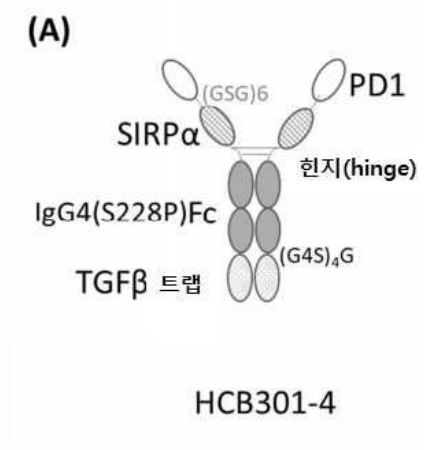
[0237] 요약하면, **도 15a 및 15b**는 상기 논의한 바와 같은 시험관 내 검정 결과를 나타낸다. HCB301-3은 부분적으로 HCB301-1 및 HCB301-2에 비해 상대적으로 단순한 구조뿐만 아니라 시험관 내 검정에서 나타난 바와 같은 이의 강력한 기능 때문에, 후속 실험을 위해 선택하였다.

[0238] **기타 실시형태**

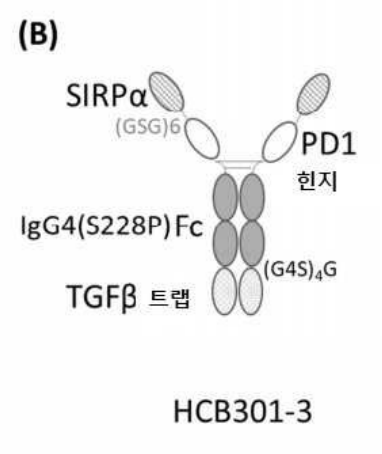
[0239] 본 발명을 이의 상세한 설명과 함께 기술하였지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 영역에 의해 정의되는, 본 발명의 영역을 설명하기 위한 것이지 제한하려는 것이 아니라는 것이 이해되어야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 다음 청구범위의 영역 내에 있다.

도면

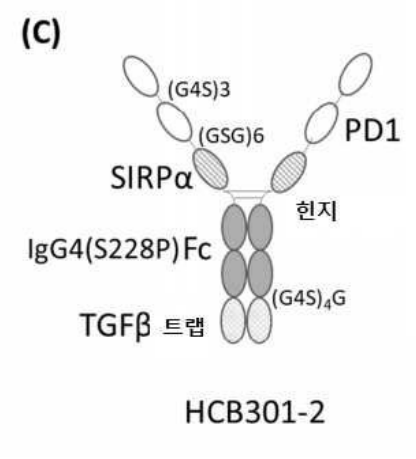
도면1a



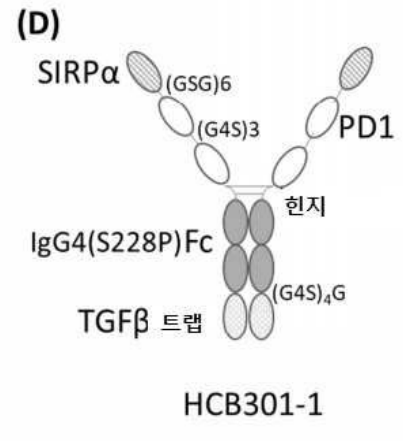
도면1b



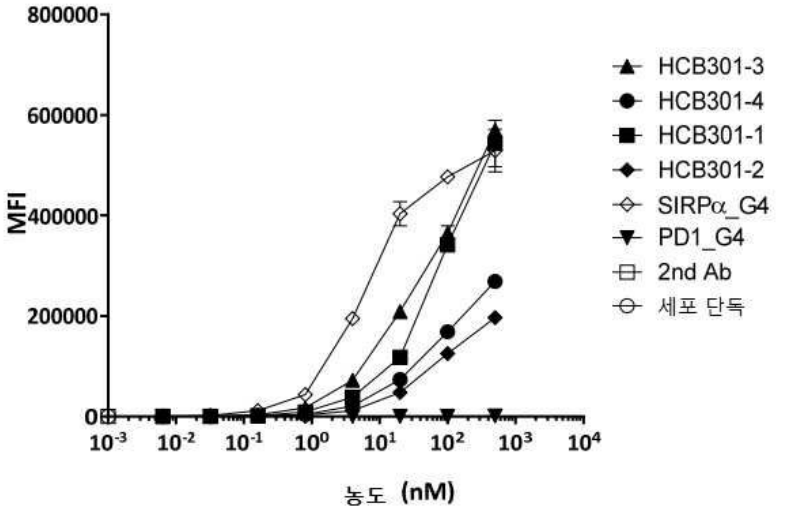
도면1c



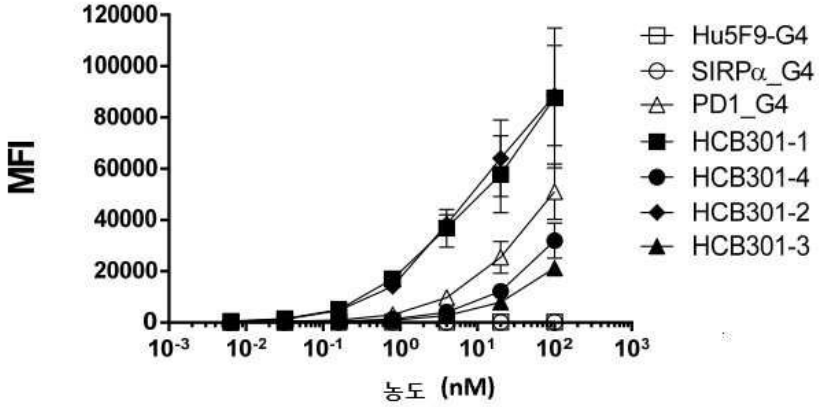
도면1d



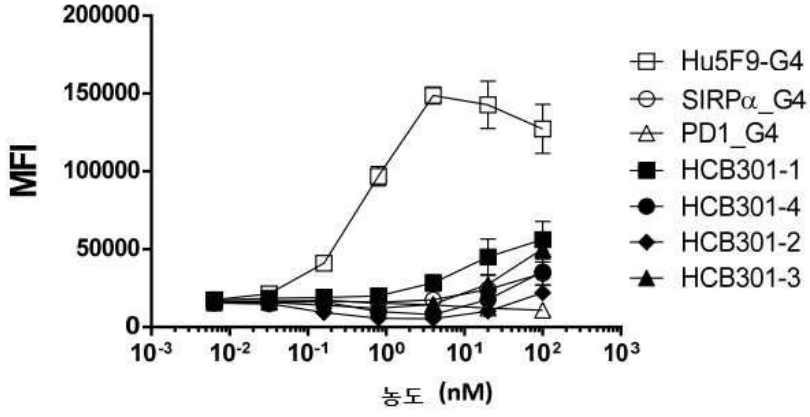
도면2


800000
600000
400000
200000
0
MFI
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (nM)
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
HCB301-2
SIRPα_G4
PD1_G4
2nd Ab
세포 단독

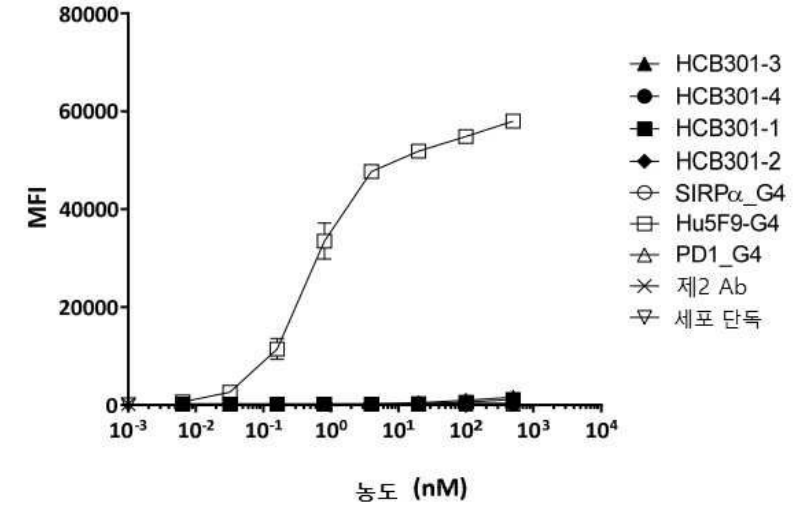
도면3


120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
농도 (nM)
Hu5F9-G4
SIRPα_G4
PD1_G4
HCB301-1
HCB301-4
HCB301-2
HCB301-3

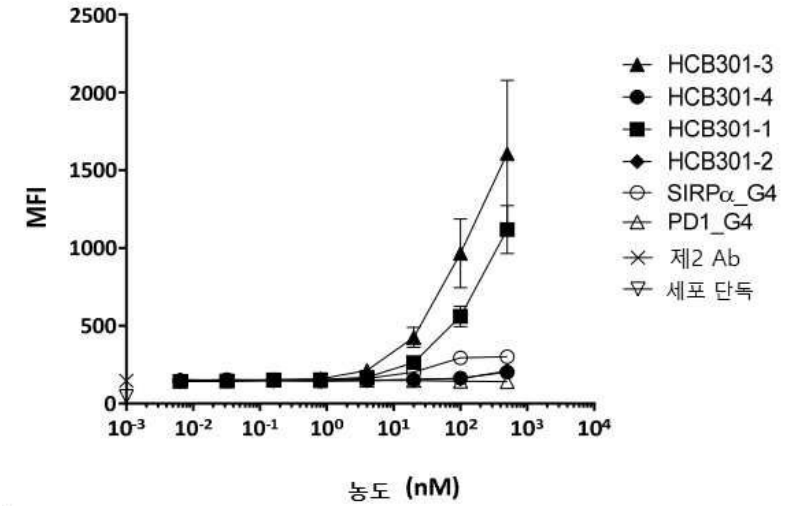
도면4


200000
150000
100000
50000
0
MFI
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
농도 (nM)
Hu5F9-G4
SIRPα_G4
PD1_G4
HCB301-1
HCB301-4
HCB301-2
HCB301-3

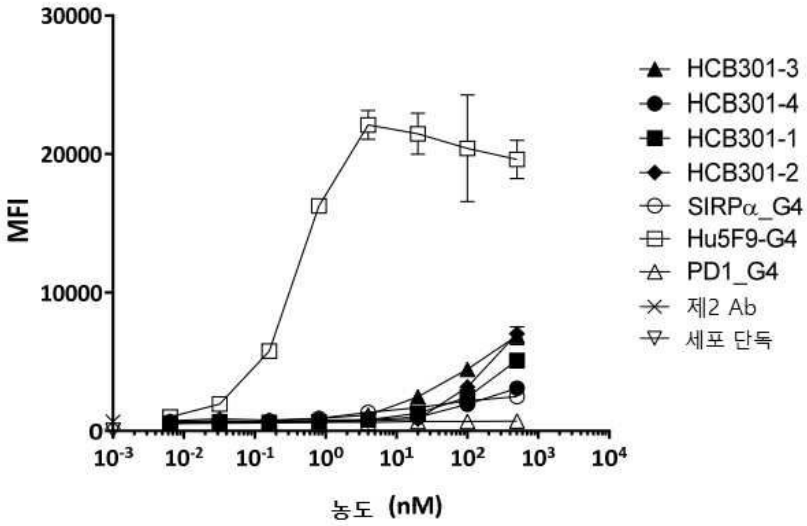
도면5a


80000
60000
40000
20000
0
MFI
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (nM)
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
HCB301-2
SIRPα_G4
Hu5F9-G4
PD1_G4
제2 Ab
세포 단독

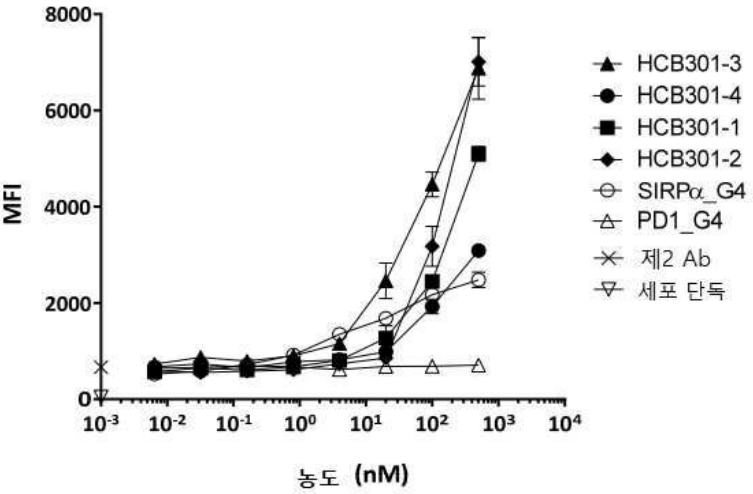
도면5b


2500
2000
1500
1000
500
0
MFI
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
농도 (nM)
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
HCB301-2
SIRPα_G4
PD1_G4
제2 Ab
세포 단독

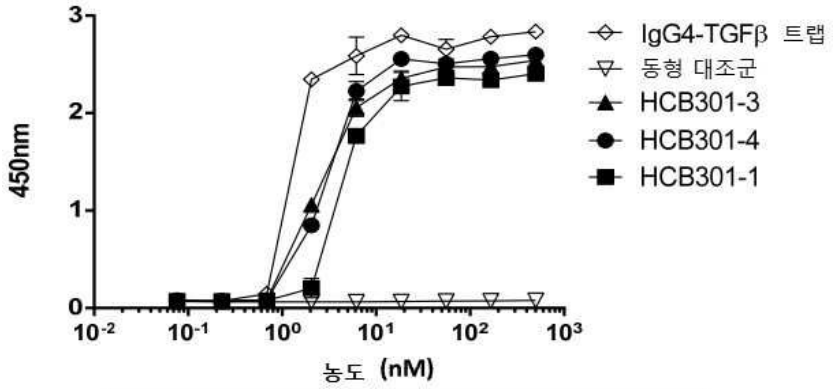
도면6a



도면6b

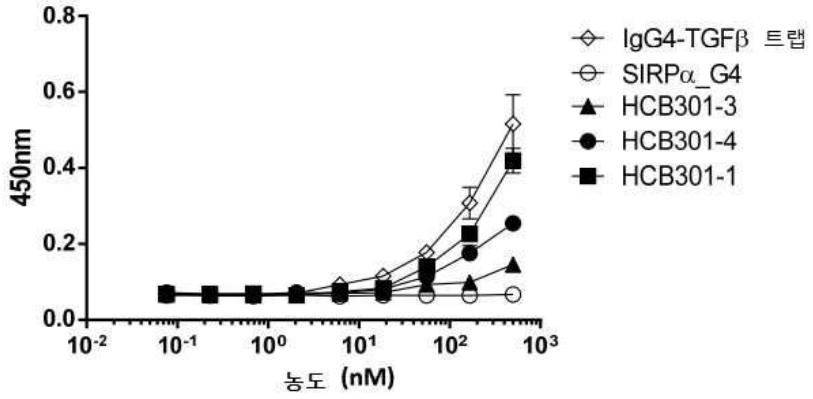


도면7a



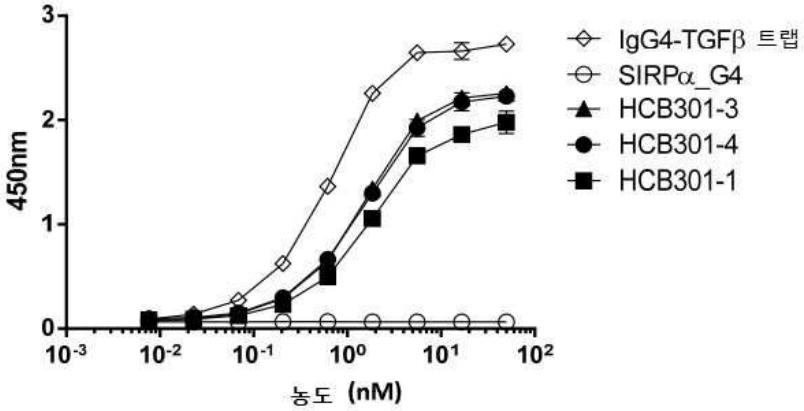
hTGFβ1	IgG4_TGFβ 트랩	HCB301-3	HCB301-4	HCB301-1
EC50 (nM)	1.42	2.54	2.83	4.53

도면7b



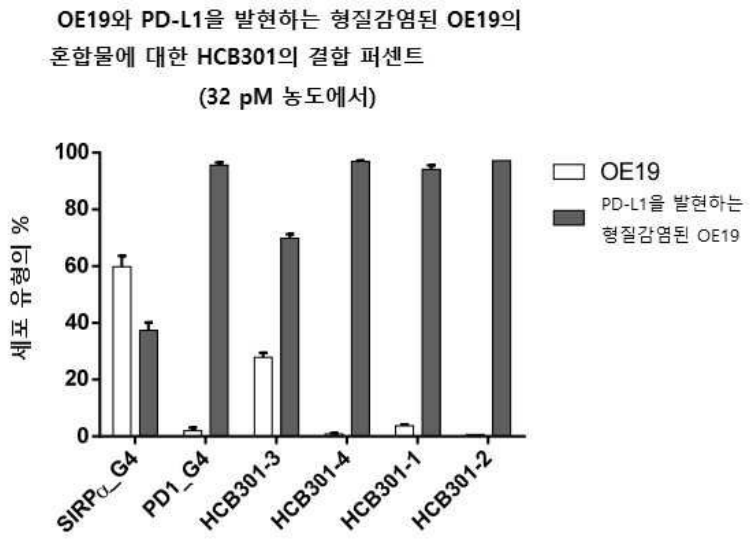
hTGFβ2	IgG4_TGFβ 트랩	HCB301-3	HCB301-4	HCB301-1
EC50 (nM)	989.5	N.D.	217.3	1131

도면7c

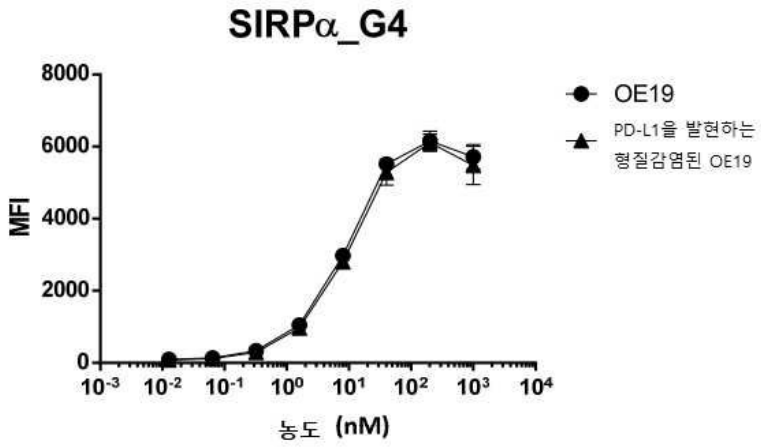


hTGFβ3	IgG4_TGFβ 트랩	HCB301-3	HCB301-4	HCB301-1
EC50 (nM)	0.63	1.45	1.50	1.76

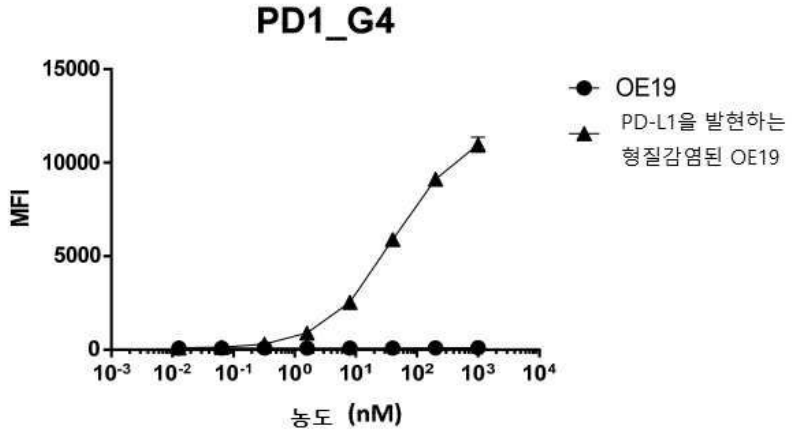
도면8a



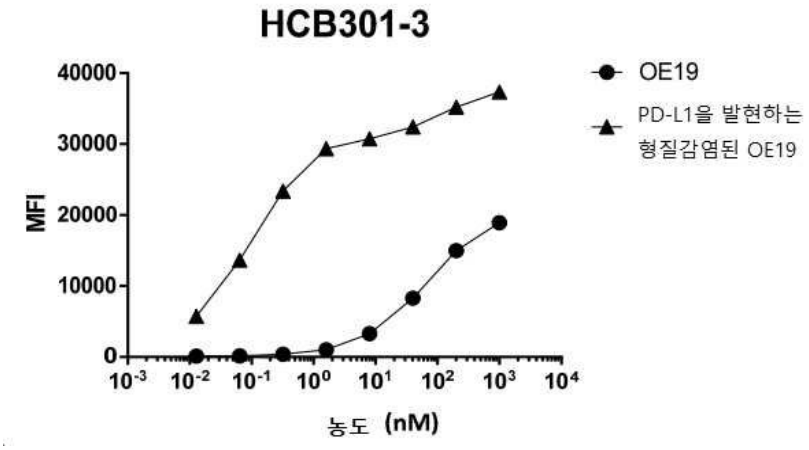
도면8b



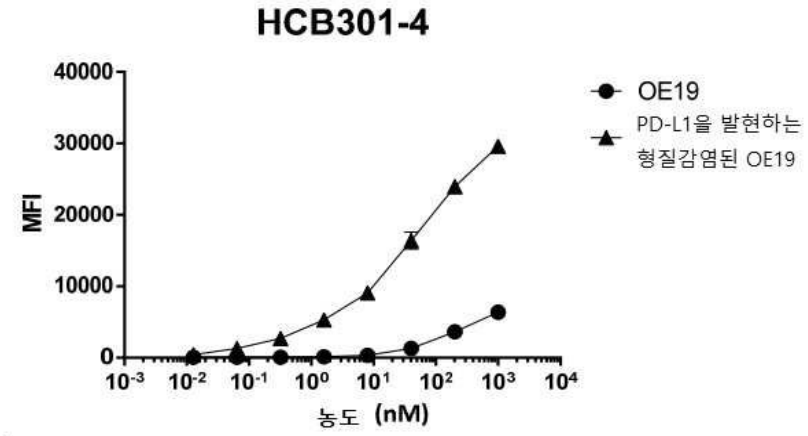
도면8c



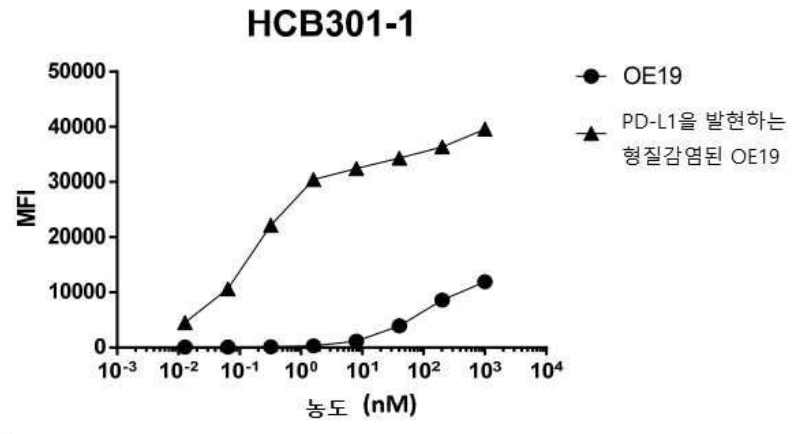
도면8d



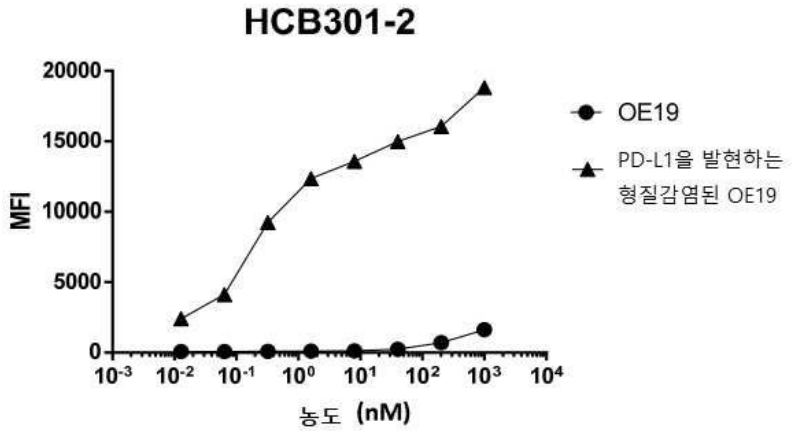
도면8e



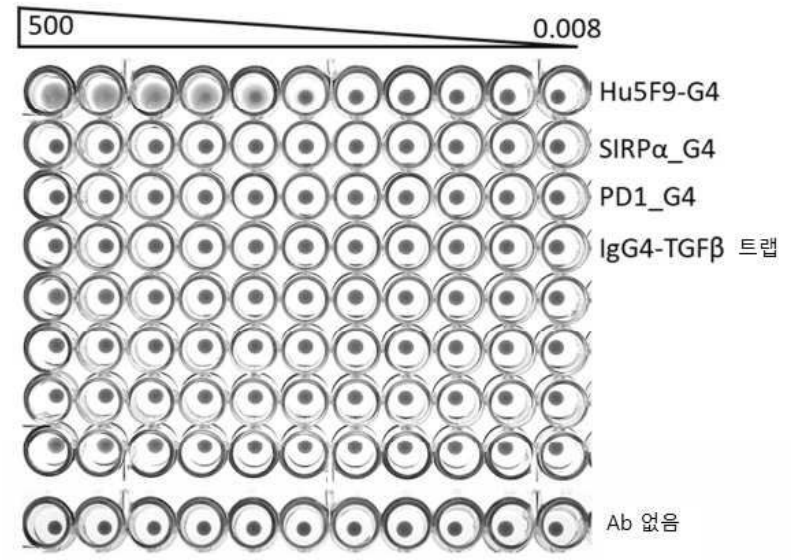
도면8f



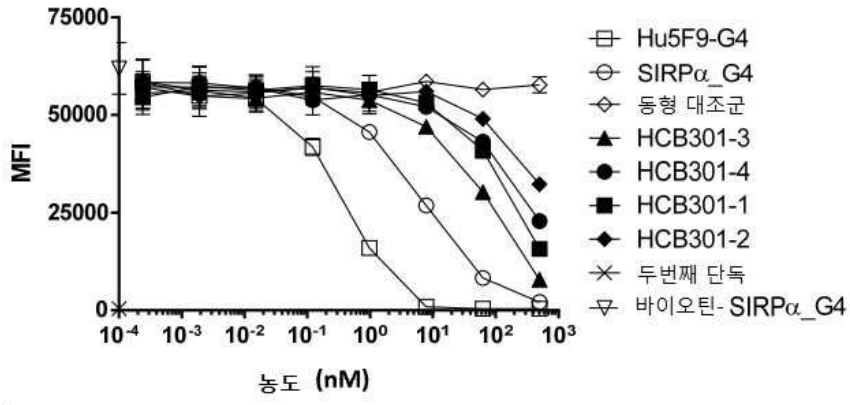
도면8g



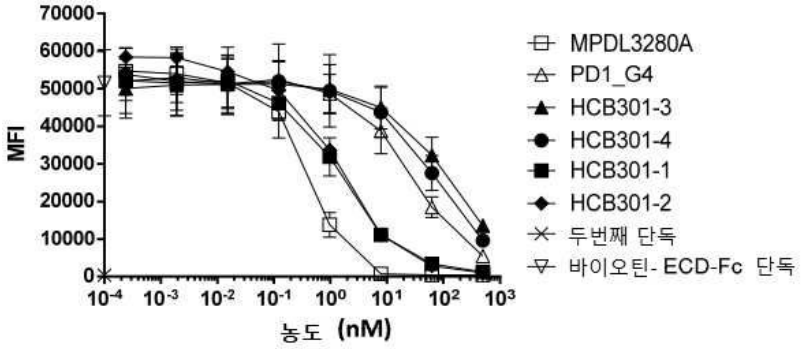
도면9



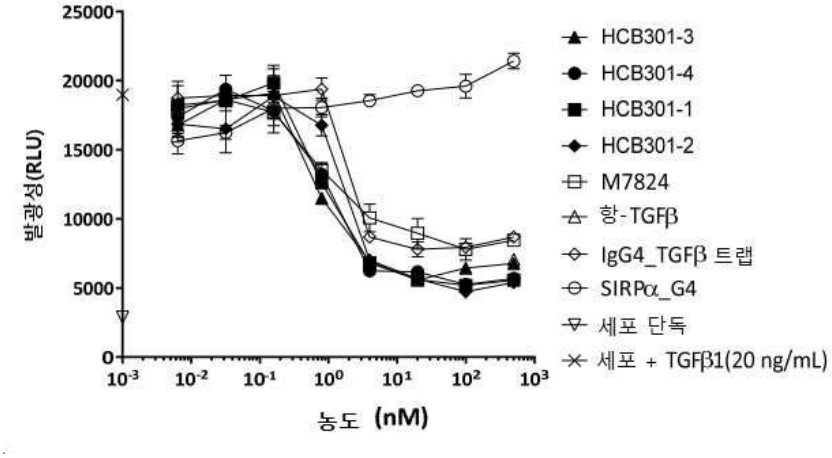
도면10



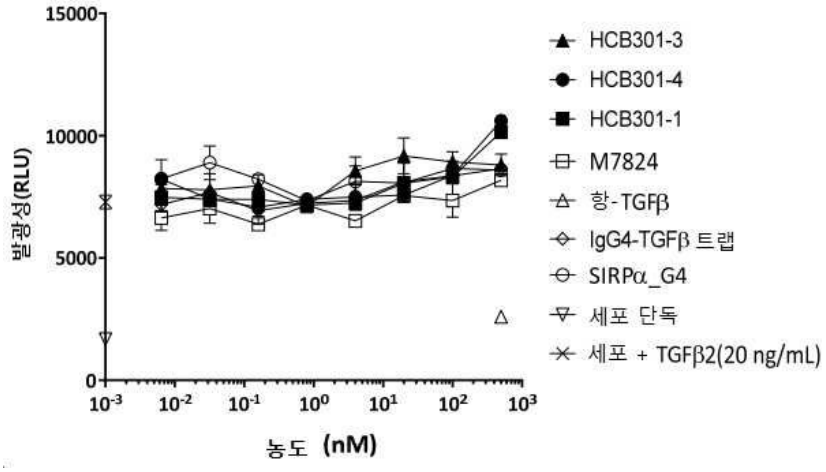
도면11



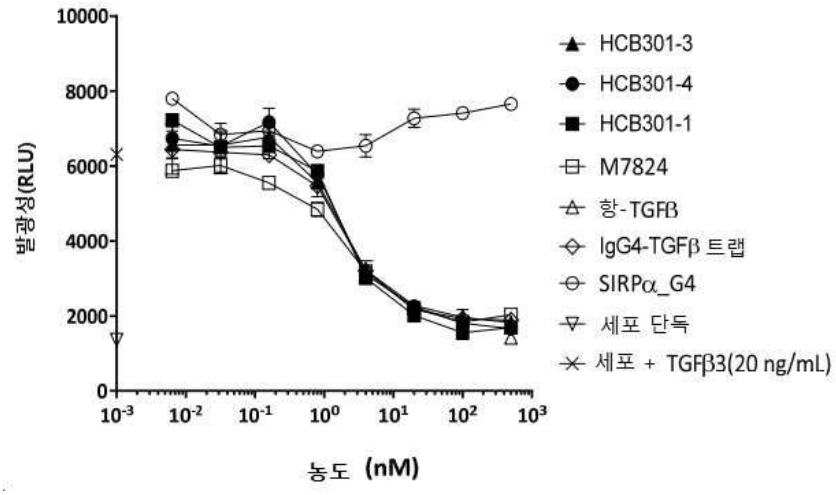
도면12a



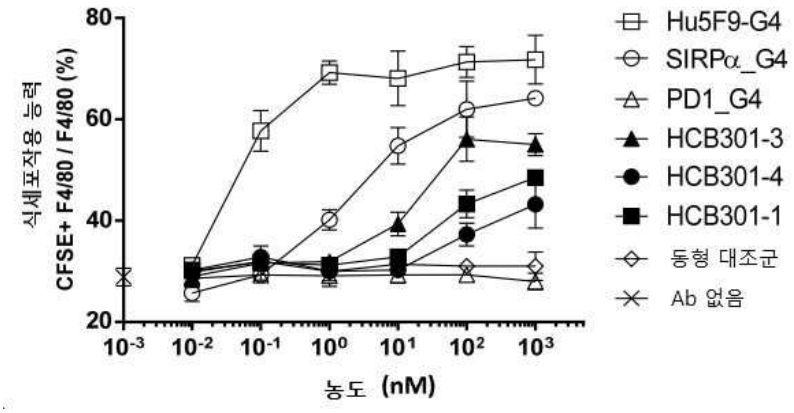
도면12b



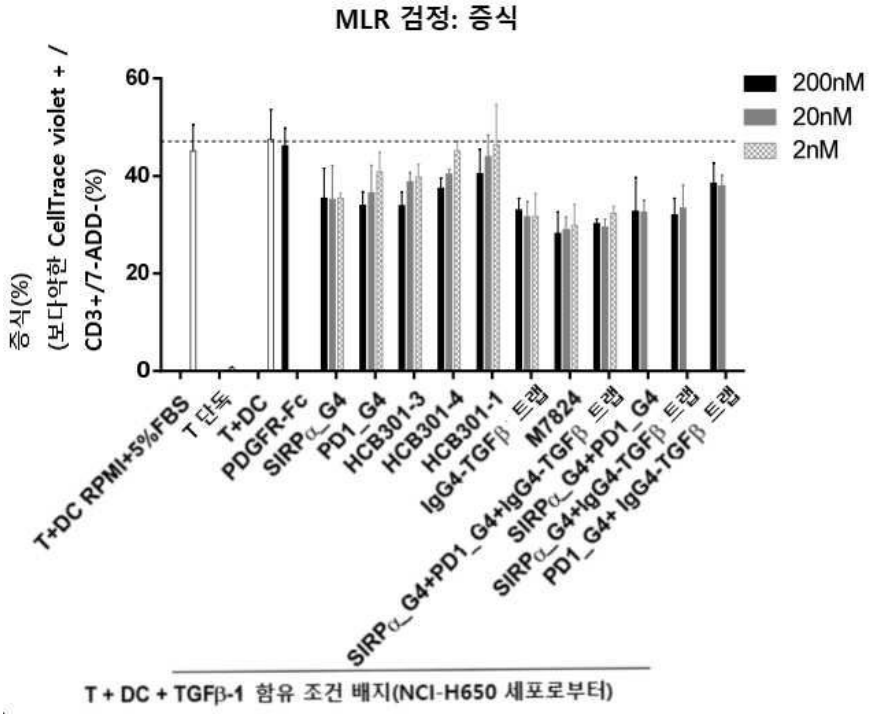
도면12c


10000
8000
6000
4000
2000
0
발광성(RLU)
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
농도 (nM)
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
M7824
항-TGFβ
IgG4-TGFβ 트랩
SIRPα_G4
세포 단독
세포 + TGFβ3(20 ng/mL)

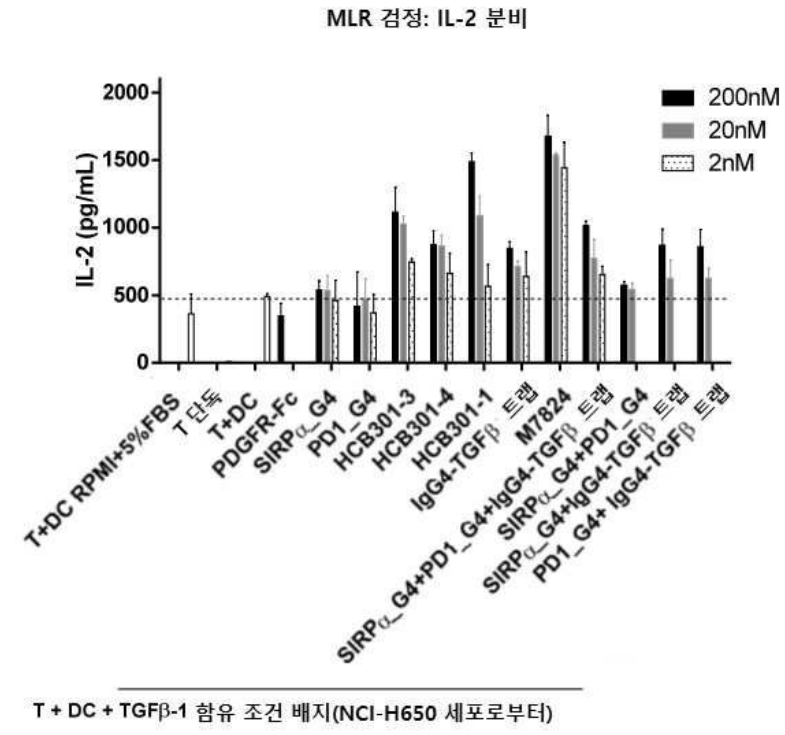
도면13


80
60
40
20
식세포작용 능력
CFSE+ F4/80 / F4/80 (%)
10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
농도 (nM)
Hu5F9-G4
SIRPα_G4
PD1_G4
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
동형 대조군
Ab 없음

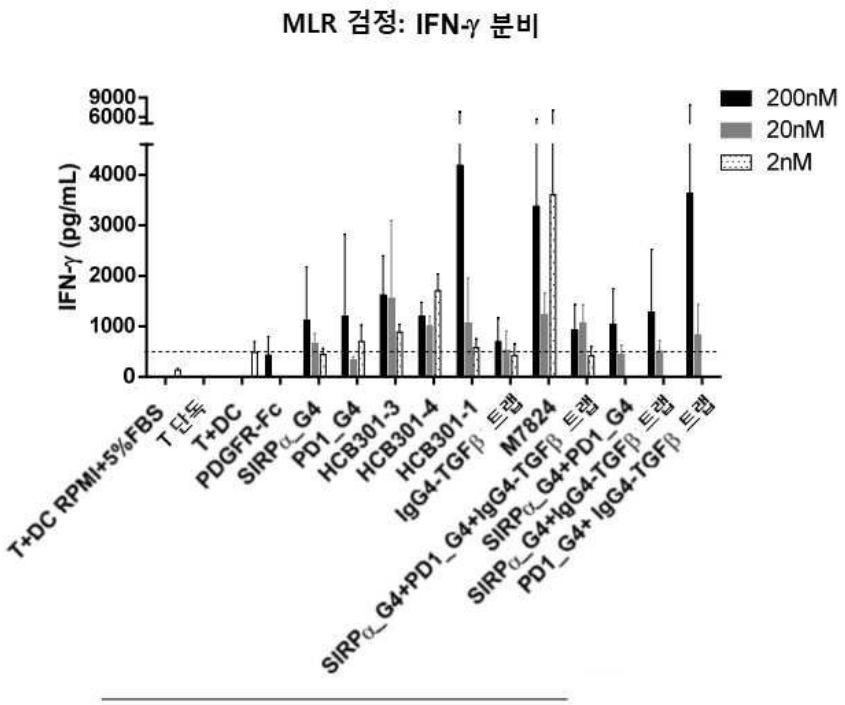
도면14a


MLR 검정: 증식
증식(%)
(보다약한 CellTrace violet + / CD3+/7-ADD-(%)
60
40
20
0
200nM
20nM
2nM
T+DC RPMI+5%FBS
T 단독
T+DC
PDGFR-Fc
SIRPα_G4
PD1_G4
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
IgG4-TGFβ 트랩
M7824
SIRPα_G4+PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩
SIRPα_G4+PD1_G4
SIRPα_G4+IgG4-TGFβ 트랩
PD1_G4+ IgG4-TGFβ 트랩
T + DC + TGFβ-1 함유 조건 배지(NCI-H650 세포로부터)

도면14b


MLR 검정: IL-2 분비
IL-2 (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
200nM
20nM
2nM
T+DC RPMI+5%FBS
T 단독
T+DC
PDGFR-Fc
SIRPα_G4
PD1_G4
HCB301-3
HCB301-4
HCB301-1
IgG4-TGFβ 트랩
M7824
SIRPα_G4+PD1_G4+IgG4-TGFβ 트랩
SIRPα_G4+PD1_G4
SIRPα_G4+IgG4-TGFβ 트랩
PD1_G4+ IgG4-TGFβ 트랩
T + DC + TGFβ-1 함유 조건 배지(NCI-H650 세포로부터)

도면14c



T + DC + TGFβ-1 함유 조건 배지(NCI-H650 세포로부터)

도면15a

			HCB301-1	HCB301-2	HCB301-3	HCB301-4	SIRPα_G4	PD1_G4	IgG4-TGFβ 트랩	항-PDL1 x TGFβRII M7824	항-CD47 Hu5F9-G4	항-PDL1 MPDL3280A
차단 (IC50, nM)	PD-1-아암(Arm)	PD-L1-CHO-S	1.6	133.6	1.4	89.21	n.d.	27.7	n.d.	n.d.	n.d.	0.4
	SIRP-α-아암	CD47-CHO-S	++	+++	+	++	++++	n.d.	n.d.	n.d.	+++++	n.d.
		저켓	95.98	30.38	n.d.	382.7	5.20	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	n.d.
		FaDu	135.9	46.79	n.d.	196.2	12.98	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.
		NCI-H441	++	+++	n.d.	++	++++	-	n.d.	n.d.	+++++	n.d.
식세포작용 (Raw264.7 대 저켓)	SIRP-α-아암	최대 식세포작용 능력(%)	48.5	55.02	n.d.	43.21	64.20	n.d.	n.d.	n.d.	71.96	n.d.
HA	RBC (D028)		-	-	-	-	-	-	-	n.d.	++++	n.d.
Smad2 리포터 검정에서 억제 능력 (IC50, nM)	TGFβRII-아암	TGFβ1	0.84	0.78	2.18	0.97	n.d.	n.d.	2.94	0.91	n.d.	n.d.
		TGFβ2	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	-
		TGFβ3	2.06	1.98	n.d.	2.00	-	n.d.	2.08	1.95	n.d.	n.d.

도면15b

			HCB301-1	HCB301-2	HCB301-3	HCB301-4	SIRPα_G4	PD1_G4	IgG4-TGFβ 트랩	항-PDL1 x TGFβRII M7824	항-CD47 Hu5F9-G4	항-PDL1 MPDL3280A
차단 (IC50, nM)	PD-1-아암(Arm)	PD-L1-CHO-S	1.6	133.6	1.4	89.21	n.d.	27.7	n.d.	n.d.	n.d.	0.4
	SIRP-α-아암	CD47-CHO-S	++	+++	+	++	++++	n.d.	n.d.	n.d.	+++++	n.d.
		저켓	95.98	30.38	n.d.	382.7	5.20	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	n.d.
		FaDu	135.9	46.79	n.d.	196.2	12.98	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.
		NCI-H441	++	+++	n.d.	++	++++	-	n.d.	n.d.	+++++	n.d.
식세포작용 (Raw264.7 대 저켓)	SIRP-α-아암	최대 식세포작용 능력(%)	48.5	55.02	n.d.	43.21	64.20	n.d.	n.d.	n.d.	71.96	n.d.
HA	RBC (D028)		-	-	-	-	-	-	-	n.d.	++++	n.d.
Smad2 리포터 검정에서 억제 능력 (IC50, nM)	TGFβRII-아암	TGFβ1	0.84	0.78	2.18	0.97	n.d.	n.d.	2.94	0.91	n.d.	n.d.
		TGFβ2	-	-	n.d.	-	-	n.d.	-	-	-	-
		TGFβ3	2.06	1.98	n.d.	2.00	-	n.d.	2.08	1.95	n.d.	n.d.

도면16a

HCB301-4의 아미노산 서열(PST_V2) (서열 번호: 1)

DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV**GSGGSGGSGGSGGSGGSG**EEELQVIQPDKSVSV
AAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFK
SGAGTELSVRAKPS**ESKYGPPCPPCP**APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**IPP
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED
AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

HCB301-3의 아미노산 서열(SPT_V2) (서열 번호: 2)

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY
YCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS**GSGGSGGSGGSGGSGGSG**DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP
SPSPRPAGQFQTLV**ESKYGPPCPPCP**APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**IPP
HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED
AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

HCB301-2의 아미노산 서열(P2ST_V2) (서열 번호: 3)

DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV**GGGGSGGGGSGGGGS**DSPDRPWNPPTFSPALLV
VTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKA
QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV**GSGGSGGSGGSGGSGGSG**EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPV
GPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS**ESKY**
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

도면16b

HCB301-1의 아미노산 서열(SP2T_V2) (서열 번호: 4)

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY
YCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS**GSGGSGGSGGSGGSGGSG**DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNW
YRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP
SPSPRPAGQFQTLV**GGGGSGGGGSGGGGS**DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED
RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV**ESKY**
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETF
FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

PD-1 모듈의 아미노산 서열 (서열 번호: 5)

DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV

SIRPα 모듈의 아미노산 서열 (서열 번호: 6)

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY
YCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

TGFβ-트랩 분자의 아미노산 서열(서열 번호: 7)

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFI
LEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

링커 펩타이드 (GSG)$_6$ (서열 번호: 8)

GSGGSGGSGGSGGSGGSG

링커 펩타이드 (G4S)$_4$G (서열 번호: 9)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG

링커 펩타이드 (G4S)$_3$ 서열 번호: 10)

GGGGSGGGGSGGGGS

도면16c

인간 PD-1 아미노산 서열 NP_005009.2 (서열 번호: 11)

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQP
GQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLL
GSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS
ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

인간 SIRPα 아미노산 서열 AAH26692.1 (서열 번호: 12)

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPR
VTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRD
ITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQ
VNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAHPKEQG
SNTAAENTGSNERNIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQVQSLDTNDITYADLNLPKGKKPAP
QAAEPNNHTEYASIQTSPQPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK

인간 TGFBR2 아미노산 서열 NP_003233.4 (서열 번호: 13)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWR
KNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGV
AISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDDRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNT
SEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLAR
GIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQT
DVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCETLTECWDHDPEARLTAQCV
AERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

SIRPα_G4 의 아미노산 서열 (서열 번호: 14)

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTY
YCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

PD1_G4 의 아미노산 서열 (서열 번호: 15)

DSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

도면16d

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

인간 IgG4 힌지 영역 (S228P) (서열 번호: 16)
ESKYGPPCPPCP

인간 IgG4 Fc 영역 (서열 번호: 17)
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

링커 펩타이드 1 (서열 번호: 18)
GGGGS

링커 펩타이드 2 (서열 번호: 19)
GSGGSG

IgG4-TGFβ 트랩 아미노산 서열 (서열 번호: 20)
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTD
NNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKP
GETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

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.