(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0118749
(43) 공개일자 2024년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7013820
(22) 출원일자(국제) 2022년10월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/078160
(87) 국제공개번호 WO 2023/064929
국제공개일자 2023년04월20일
(30) 우선권주장
63/256,417 2021년10월15일 미국(US)
63/370,897 2022년08월09일 미국(US)

(71) 출원인
싸이톰스 테라퓨틱스, 인크.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원 암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
부스타니 레일라 엠.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
파이드헌가트 마단 엠.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

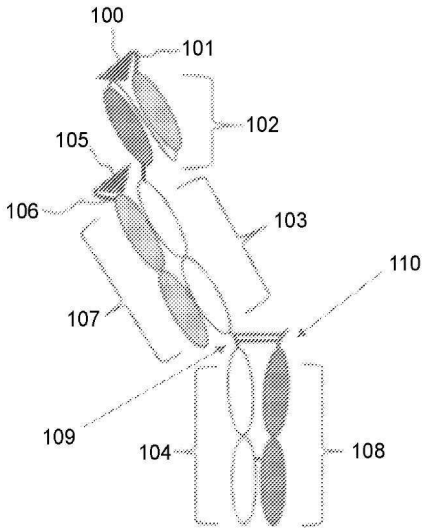
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **활성화 가능한 폴리펩타이드 복합체**

(57) 요 약

본 개시내용은 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC) 그리고 이의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자
폭스 일레인 앤 마리아노
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
미트라 사얀탄
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
캐버노 더블유. 마이클
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
브리엔트 라파엘라
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스위트 400 오이스터 포인트 블러바드 151 싸이톰스 테라퓨틱스, 인크. 내
스티븐스 제니트 리앤
미국 캘리포니아 91320 사우전드 오크 원 암젠 센터 드라이브 암젠 인크 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(activatable heteromultimeric bispecific polypeptide complex: HBPC)로서,

(a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, 상기 VH1과 상기 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제1 마스킹 모이어티(masking moiety)(MM1), (iii) 제1 절단성 모이어티(cleavable moiety)(CM1); (iv) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (v) 및 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는 제1 폴리펩타이드;

(b) (i) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, 상기 VH2와 상기 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2) 및 (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2)를 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

(c) (i) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 (ii) 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드

를 포함하되; MM1은 상기 제1 표적에 대한 상기 제1 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드이고, MM2는 상기 제2 표적에 대한 상기 제2 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드인, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 표적은 T 세포 항원 폴리펩타이드이고, 상기 제2 표적은 암세포 표면 항원인, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 표적은 암세포 표면 항원이고, 상기 제2 표적은 T 세포 항원 폴리펩타이드인, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 항원 폴리펩타이드는 CD3의 엡실론 사슬인, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 상기 암세포 표면 항원 표적화 도메인 VH2와 상기 단량체 Fc 도메인 사이에 중쇄 CH1 도메인을 추가로 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 상기 CH1 도메인과 상기 제1 단량체 Fc 도메인 사이에 면역글로불린 힌지 영역(HR1)을 추가로 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로,

MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결인, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 경쇄 불변 도메인 CL1을 추가로 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 힌지 영역(HR2)을 추가로 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 12

제6항 또는 제10항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 HR1 및 상기 제2 폴리펩타이드 HR2는 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 13

제6항 또는 제10항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드 HR1 및 상기 제2 폴리펩타이드 HR2는 상이한 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드는 하나 이상의 링커를 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 다음 위치 중 하나 이상에 링커를 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체:

(a) MM1과 CM1 사이;

(b) MM2와 CM2 사이;

(b) scFv의 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이;

(c) 중쇄 가변 도메인과 CH1 도메인 사이;

(d) CH1 도메인과 힌지 영역 사이;

(e) 힌지 영역과 Fc 도메인 사이;

(g) CM2와 경쇄 가변 도메인 사이;

(h) 경쇄 가변 도메인과 CL 사이;

(i) CH1 도메인과 제2 Fc 도메인 사이;

(j) CH1 도메인과 힌지 영역 사이; 및/또는

(k) 힌지 영역과 제2 Fc 도메인 사이.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 링커(들)는 약 1개 내지 약 20개의 아미노산을 포함하는, 활성화 가능한 이

중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, MM1은 링커인 L1을 통해 CM1에 연결되는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, MM2는 링커인 L2를 통해 CM2에 연결되는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 L1과 L2를 둘 다 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 20

제19항에 있어서, MM2는 링커인 L3을 통해 CM2에 연결되고, CM2는 링커인 L4를 통해 상기 scFv에 연결되는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, L1, L2, L3 및/또는 L4의 아미노산 서열은 동일한, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 22

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, L1, L2, L3 및/또는 L4 중 적어도 하나의 아미노산 서열은 상이한, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CM1의 아미노산 서열 및 상기 CM2의 아미노산 서열은 동일한, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CM1의 아미노산 서열 및 상기 CM2의 아미노산 서열은 상이한, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 25

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및 CM2는 각각 종양 미세환경에 존재하는 프로테이스에 대한 기질을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 동일한 프로테이스에 대한 기질을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및 CM2는 상이한 프로테이스에 대한 기질을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 표 3에 나타낸 프로테이스의 군으로부터 선택되는 프로테이스에 대한 기질을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 29

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및 CM1 중 적어도 하나는 세린 프로테이스 또는 매트릭스 메탈로펩티데이스(matrix metallopeptidase: MMP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테이스에 대한 기질을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, CM1 및/또는 CM2는 서열번호 2, 서열번호 14, 서열번호 73 내지 111 또는 서열번호 156 내지 159의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MM1 및/또는 상기 MM2는 약 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산을 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 32

제15항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각 링커는 독립적으로 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체:

(i) (GS)n(여기서, n은 1 내지 10의 정수임), (GGS)n(여기서, n은 적어도 1의 정수임), (GGGS)n(서열번호 40), (GGGGS)n(서열번호 126)(여기서, n은 적어도 1의 정수임), (GSGGS)n(서열번호 41)(여기서, n은 적어도 1의 정수임), GSSGGSGGSG(서열번호 12), GGSG(서열번호 42), GGSGG(서열번호 43), GSGSG(서열번호 44), GSGGG(서열번호 45), GGGSG(서열번호 46) 및 GSSSG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGS(서열번호 48), GGGGSGS(서열번호 49), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 51), GGGGS(서열번호 52), GGGGSGGGGS(서열번호 53), GGGS(서열번호 54), GGGSGGGS(서열번호 55), GGGSGGGSGGGS(서열번호 56), GSSGGSGGSG(서열번호 57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 58), GGGSSGGS(서열번호 127) 및 GS로 이루어진 군으로부터 선택되는 글리신-세린 기반 링커; 및 (ii) 글리신 및 세린과, GSTSGSGKPGSSEGST(서열번호 59), SKYGPPCPPCPAPEFLG(서열번호 60), GGSLDPKGGGGS(서열번호 61), PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(서열번호 62), GKSSGSGSESKS(서열번호 63), GSTSGSGKSSEGKG(서열번호 64), GSTSGSGKSSEGSGSTKG(서열번호 65) 및 GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 66)로 이루어진 군으로부터 선택되는 라이신, 트레오닌 또는 프롤린 중 적어도 하나를 포함하는 링커.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 힌지(힌지1)를 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드는 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 힌지(힌지2)를 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 36

물 및 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체를 포함하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 99%의 물을 포함하는, 조성물.

청구항 38

제35항의 약제학적 조성물 또는 제36항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 39

핵산으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 제1 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드 및/또는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 40

핵산으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 41

핵산으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 42

핵산으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 핵산.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 44

제43항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 45

활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체를 생산하는 방법으로서,

(a) 제44항의 숙주 세포를 활성화 가능한 HBPC를 생산하기에 충분한 조건하에 액체 배양 배지에서 배양하는 단계; 및

(b) 상기 활성화 가능한 HBPC를 회수하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 46

대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 치료학적 유효량의 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체 또는 제35항 또는 제36항의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 질환은 암인, 방법.

청구항 49

종양 성장의 저해를 필요로 하는 대상체에서 종양 성장을 저해하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체 또는 제35항의 약제학적 조성물 또는 제36항의 조성물.

청구항 50

암을 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체 또는 제35항의 약제학적 조성물 또는 제36항의 조성물의 용도.

청구항 51

활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체로서,

(a) (i) 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, 상기 scFv는 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하고, VH1과 VL1은 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 T 세포 항원 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1) 및 (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); (iv) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2), (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (vi) 중쇄 CH1 도메인 및 (vii) CH1 도메인과 Fc1 사이의 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는 제1 폴리펩타이드;

(b) (i) 상기 VH2와 쌍을 이룰 때 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 제2 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

(c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역(HR2)을 포함하는 제3 폴리펩타이드로서, 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는, 상기 제3 폴리펩타이드를 포함하되;

상기 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 갖고;

상기 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 갖고; 그리고

상기 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결인, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 52

활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)로서,

(a) (i) 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1) 및 (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); (iv) 중쇄 가변 도메인(VH2), (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (vi) 중쇄 CH1 도메인 및 (vii) CH1 도메인과 제1 단량체 Fc 도메인 사이의 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는, 암세포 표면 항원 표적화 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드;

(b) (i) 상기 제1 폴리펩타이드 VH2와 쌍을 이룰 때 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

(c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는 제3 폴리펩타이드

를 포함하되;

상기 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 갖고;

상기 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 갖고; 그리고

상기 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 53

활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)로서,

(a) (i) 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1) 및 (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); 및 중쇄 가변 도메인(VH2), (iv) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (v) 중쇄 CH1 도메인과 상기 CH1 도메인 사이의 면역글로불린 힌지 영역 및 (vii) 상기 제1 단량체 Fc 도메인을 포함하는 제1

폴리펩타이드;

(b) (i) 제1 폴리펩타이드 VH2와 쌍을 이룰 때 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

(c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역으로 이루어지는 제3 폴리펩타이드

를 포함하되;

상기 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 갖고;

상기 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 갖고; 그리고

상기 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이고, 상기 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

청구항 54

이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)로서,

(a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, 상기 VH1과 상기 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (iii) 및 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는 제1 폴리펩타이드;

(b) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, 상기 VH2와 상기 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함)을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

(c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드

를 포함하는, 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2021년 10월 15일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/256,417호 및 2022년 8월 9일자로 출원된 제63/370,897호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이들 기초출원은 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0003] EFS 웹을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원에 제출된 전자적으로 제출된 서열 목록(4681_002PC02_Seqlisting_ST26.xml; 크기: 190,193바이트; 및 작성일: 2022년 10월 13일)의 내용은 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 개시내용은 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(heteromultimeric bispecific polypeptide complex: HBPC) 그리고 이의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 종양 항원 특이적 T 세포의 생성 및 활성화는 면역 매개성 발달 조절 및 종양 퇴행의 중재에 관여한다. 이를 위해서는 T 세포 활성화, 증식 및 효과기 기능의 획득 또는 상실을 제어하기 위해 함께 작용하는 T 세포 공동자극 수용체 및 T 세포 음성 조절인자 또는 공동저해 수용체가 필요하다. 그러나, 종양 특이적 T 세포 반응은 종양 세포의 수많은 면역 회피 메커니즘으로 인해 암 환자에서 증가하고 유지하기가 어렵다. 그러나, 암 요법을 위해 T 세포를 활용하려는 시도가 있었다. 이러한 접근법은 암세포 상의 표면 표적 항원에 결합하고 T 세포 상의 CD3와 같은 T 세포 표면 폴리펩타이드에도 결합하는 T 세포 관여 이중특이성 항체(T cell engaging bispecific antibody)를 사용하는 것을 포함한다. 일반적으로, 각 표적에 결합함으로써, T 세포 관여 이중특이성 물질은 T

세포를 암세포와 물리적으로 가깝게 만들고, 세포독성 T 세포 단백질과 효소가 종양 세포를 공격하고 세포자멸사를 유발하여 암세포를 죽이도록 한다.

[0008] 암의 치료를 위한 잠재적으로 유망한 종류의 치료법이기는 하지만, 제조상의 어려움뿐만 아니라 표적 적중 종양외 독성(on-target off-tumor toxicity)과 같은 극복해야 할 장애물도 있다. 따라서, 개선된 안전성 프로파일뿐만 아니라 개선된 제조가능성을 갖춘 면역치료 옵션이 필요하다.

발명의 내용

[0009] 다음을 포함하는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)가 본 명세서에 제공된다: (a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, VH1과 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제1 마스킹 모이어티(masking moiety)(MM1), (iii) 제1 절단성 모이어티(cleavable moiety)(CM1); (iv) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) (i) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, VH2와 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2) 및 (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2)를 포함하는, 제2 폴리펩타이드; 및 (c) (i) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 (ii) 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드. 일부 양태에서, 제1 표적은 T 세포 항원 폴리펩타이드이고, 제2 표적은 암세포 표면 항원이다. 일부 양태에서, 제1 표적은 암세포 표면 항원이고, 제2 표적은 T 세포 항원 폴리펩타이드이다. 일부 양태에서, T 세포 항원 폴리펩타이드는 CD3의 엡실론 사슬이다.

[0010] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 항원 표적화 도메인 VH2와 단량체 Fc 도메인 사이에 중쇄 CH1 도메인을 추가로 포함한다.

[0011] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 CH1 도메인과 제1 단량체 Fc 도메인 사이에 면역글로불린 힌지 영역(HR1)을 추가로 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다.

[0013] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는 경쇄 불변 도메인 CL1을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다.

[0014] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 힌지 영역(HR2)을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 "-"는 직접 또는 간접 연결이다.

[0015] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 HR1 및 제2 폴리펩타이드 HR2는 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 HR1 및 제2 폴리펩타이드 HR2는 상이한 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드는 하나 이상의 링커를 포함한다.

[0017] 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 다음 위치 중 하나 이상에 링커를 포함한다: (a) MM1과 CM1 사이; (b) MM2와 CM2 사이; (b) scFv의 중쇄와 경쇄 가변 도메인 사이; (c) 중쇄 가변 도메인과 CH1 도메인 사이; (d) CH1 도메인과 힌지 영역 사이; (e) 힌지 영역과 Fc 도메인 사이; (g) CM2와 경쇄 가변 도메인 사이; (h) 경쇄 가변 도메인과 CL 사이; (i) CH1 도메인과 제2 Fc 도메인 사이; (j) CH1 도메인과 힌지 영역 사이; 및/또는 (k) 힌지 영역과 제2 Fc 도메인 사이. 일부 양태에서, 링커(들)는 약 1개 내지 약 20개의 아미노산을 포함한다.

[0018] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, MM1은 링커 L1을 통해 CM1에 연결된다. 일부 양태에서, MM2는 링커 L2를 통해 CM2에 연결된다. 일부 양태에서, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 L1과 L2를 둘 다 포함한다. 일부 양태에서, MM2는 링커 L3을 통해 CM2에 연결되고, CM2는 링커 L4를 통해 scFv에 연결된다. 일부 양태에서,

[0019] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, L1, L2, L3 및/또는 L4의 아미노산 서열은 동일하다. 일부 양태에서, L1, L2, L3 및/또는 L4 중 적어도 하나의 아미노산 서열은 상이하다.

[0020] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, CM1의 아미노산 서열 및 CM2의 아미노산 서열은 동일하다. 일부 양태에서, CM1의 아미노산 서열 및 CM2의 아미노산 서열은 상이하다.

[0021] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 각각 종양 미세환경에 존재하는 프로테이스에 대한 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 동일한 프로테이스에 대한 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 상이한 프로테이스에 대한 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 표 3에 나타낸 프로테이스의 군으로부터 선택되는 프로테이스의 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2 중 적어도 하나는 세린 프로테이스 및 매트릭스 메탈로펩티데이스(matrix metallopeptidase: MMP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로테이스에 대한 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및/또는 CM2는 서열번호 2, 서열번호 14, 서열번호 73 내지 111 또는 서열번호 156 내지 159의 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, MM1 및/또는 MM2는 약 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산을 포함한다.

[0023] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 각 링커는 독립적으로 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: (i) (GS)n(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGS)n(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGGS)n(서열번호 40)(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGGGS)n(서열번호 126)(여기서, n은 적어도 1의 정수임), (GSGGS)n(서열번호 41)(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), GSSGGSGGSG(서열번호 12), GGSG(서열번호 42), GGSGG(서열번호 43), GSGSG(서열번호 44), GSGGG(서열번호 45), GGGSG(서열번호 46) 및 GSSSG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGS(서열번호 48), GGGGSGS(서열번호 49), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 51), GGGGS(서열번호 52), GGGGSGGGGS(서열번호 53), GGGS(서열번호 54), GGGSGGGS(서열번호 55), GGGSGGGSGGGS(서열번호 56), GSSGGSGGSGG(서열번호 57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 58), GGGSSGGS(서열번호 127) 및 GS로 이루어진 군으로부터 선택되는 글리신-세린 기반 링커; 및 (ii) 예를 들어, GSTSGSGKPGSSEGST(서열번호 59), SKYGPPCPPCPAPEFLG(서열번호 60), GGSLDPKGGGGS(서열번호 61), PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(서열번호 62), GKSSGSGSESKS(서열번호 63), GSTSGSGKSSEGKG(서열번호 64), GSTSGSGKSSEGSGSTKG(서열번호 65) 및 GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 66)로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커와 같은, 글리신과 세린 및 라이신, 트레오닌 또는 프롤린 중 적어도 하나를 포함하는 링커.

[0024] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 힌지(HR)(힌지1)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 힌지(HR)(힌지2)를 포함한다.

[0025] 또한, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 조성물은 물 및 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 일부 양태에서, 조성물은 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최대 99%의 물을 포함한다.

[0026] 또한, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다.

[0027] 또한, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 제1 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드 및/또는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC의 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다. 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC의 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다. 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC의 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다. 또한, 본 명세서에 기재된 핵산을 포함하는 벡터가 본 명세서에 제공된다. 또한, 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다.

[0028] 또한, (a) 활성화 가능한 HBPC를 생산하기에 충분한 조건하에 액체 배양 배지에서 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 활성화 가능한 HBPC를 회수하는 단계를 포함하는, 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0029] 또한, 치료학적 유효량의 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC) 또는 이의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 양태에서, 질환은 암이다.

[0030] 또한, 종양 성장의 저해가 필요한 대상체에서 종양 성장을 저해하는 데 사용하기 위한 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC) 및 이의 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0031] 또한, 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC) 및 이의 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0032] 또한, (a) (i) 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, scFv는 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하고, VH1과 VL1은 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 T 세포 항원 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1) 및 (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); (iii) 경쇄 가변 도메인(VL2)과 쌍을 이룰 때 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인(VH2), (iv) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (v) 중쇄 CH1 도메인 및 (vi) CH1 도메인과 Fc1 사이의 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) (i) VH2와 쌍을 이룰 때 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는, 제2 폴리펩타이드; 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역(HR2)을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)가 본 명세서에 제공되되, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않고, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 포함하고, 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖고, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다.

[0033] 또한, (a) (i) 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1), (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); 및 (iv) 제2 폴리펩타이드 경쇄 가변 도메인(VL2)과 쌍을 이룰 때 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 중쇄 가변 도메인(VH2), (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (vi) 중쇄 CH1 도메인 및 (vii) CH1 도메인과 제1 단량체 Fc 도메인 사이의 면역글로불린 힌지 영역(HR1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) (i) 제1 폴리펩타이드 VH2와 쌍을 이룰 때 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는, 제2 폴리펩타이드; 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역(HR2)을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)가 본 명세서에 제공되되, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 포함하고; 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 포함하고; 제3 폴리펩타이드는 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 가지며, 각각의 "-"는 직접 또는 간접 연결이고, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는다.

[0034] 또한, (a) (i) 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1) 및 (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); 및 중쇄 가변 도메인(VH2), (iii) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), 중쇄 CH1 도메인 및 CH1 도메인과 제1 단량체 Fc 도메인 사이의 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) (i) 제1 폴리펩타이드 VH2와 쌍을 이룰 때 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 경쇄 가변 도메인(VL2), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2)와 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는, 제2 폴리펩타이드; 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)가 본 명세서에 제공되되, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 갖고; 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL1의 구조적 배열을 갖고; 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖고, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이고, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는다.

[0035] 또한, (a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, VH1과 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (iii) 및 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)을 포함하는 제2 폴리펩타이드(여기서, VH2와 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함); 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드를 포함하는 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)가 본 명세서에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 개략도이다.

도 2a는 CI106(활성화 가능한 이중 암(arm), 2가 항-CD3, 항-EGFR 이중특이성 항체 대조군), 복합체-57(활성화 가능한 HBPC) 및 복합체-67(활성화 가능한 HBPC)뿐만 아니라 활성화된 CI106, 활성화된 복합체-57 및 활성화된 복합체-67에 의한 EGFR에 대한 결합을 보여준다.

도 2b는 CI106(대조군), 복합체-57(활성화 가능한 HBPC), 복합체-67(활성화 가능한 HBPC) 및 활성화된 CI106, 활성화된 복합체-57 및 활성화된 복합체-67에 의한 CD3에 대한 결합을 보여준다.

도 3a는 활성화된 CI106(대조군), 복합체-57 및 복합체-67 및 CI106(이중 암, 2가 이중특이성 대조군 작제물) 및 복합체-57로 처리한 후 HT29 세포에 대한 세포독성을 보여준다.

도 3b는 CI106(대조군), 복합체-67, 활성화된 CI106(대조군) 및 활성화된 복합체-67로 처리한 후 HT29 세포에 대한 세포독성을 보여준다.

도 4는 비히클, 1.0 mg/kg CI106(대조군) 및 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg 및 1.8 mg/kg 복합체-67로 처리한 후 시간의 함수로서 HT29-luc2 이종이식편 종양 모델에서의 종양 부피를 보여준다.

도 5는 비히클, 0.3 mg/kg 및 1 mg/kg의 활성화된 복합체-67 및 복합체-67로 처리한 후 시간의 함수로서 HCT116 이종이식편 종양 모델에서의 종양 부피를 보여준다.

도 6은 CI106(대조군), 복합체-57 및 복합체-67에 대한 단량체 대 농도의 백분율(%)을 보여준다.

도 7은 마스킹된 활성화 가능한 HBPC(복합체-339), 비마스킹된 활성화 가능한 HBPC 대조군(복합체-342), 대안적 형식 2의 활성화 가능한 폴리펩타이드(복합체-231) 및 대안적 형식 2의 비마스킹된 대조군 폴리펩타이드(복합체-164)의 세포 용해의 백분율로서 세포독성을 보여준다.

도 8a 내지 도 8c는 HT29 세포(A), HCT116 세포(B) 또는 Jurkat 세포(C) 표면에 발현된 EGFR 및 CD3에 대한 CI107 결합의 유세포 분석 평가를 보여준다. 겉보기 Kd는 HT29 세포에서의 2회 반복 실험과 Jurkat 세포에서의 3회 반복 실험으로부터 계산되었다.

도 9a 내지 도 9d는 HCT116-Luc2 세포(A, C) 및 HT29-Luc2 세포(B, D)에서 CI107에 의해 매개된 세포독성의 퍼센트를 보여준다. 배양 48시간 후, HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2 세포 생존율 및 세포독성은 비처리된 대조군(a, b)에 대해 측정되었다. 배양 16시간 후, CD69 발현은 유세포 분석에 의해 측정되었다. MFI(mean fluorescence intensity: 평균 형광 강도)(c, d).

도 10a 내지 도 10e는 배양 16시간 후 측정된 CI107로 처리한 후의 사이토카인 방출을 보여준다. (A) IFN-γ, (B) IL-2, (C) IL-6, (D) MCP-1 및 (E) TNF-α.

도 11a 내지 도 11b는 HT29-Luc2 종양을 보유하고 인간 PBMC가 이식된 마우스에서 테스트 TCB로 처리한 후 종양 부피를 보여준다. (A) 마우스는 3주 동안 매주 1회 비히클(PBS) 또는 0.3 mg/kg CI020, CI011, CI040 또는 CI048(그룹당 n=8)로 처리되었다. 종양 부피는 매주 2회 측정되었다. (B) HT29-Luc2 종양을 보유하고 인간 PBMC가 이식된 NSG 마우스는 비히클 또는 1 mg/kg의 CI020, CI011, CI040 또는 CI048로 처리되었다. 종양은 투여 후 제7일에 수거되었으며, CD3에 대한 면역화학 수행되었다. 어두운 염색은 CD3+ 세포를 나타낸다.

도 12a 내지 도 12b는 HT29(A) 및 HCT116(B) 이종이식편 종양에서 3주 동안 매주 1회 CI107로 처리한 후 종양 부피를 보여준다. 종양 부피는 매주 2회 측정되었다. * p<0.5; ** p<0.01; **** p<0.0001.

도 13a 내지 도 13b는 CI107을 투여한 후 8시간에 측정된 IL-6(A) 및 IFN-γ(B)의 수준을 보여준다.

도 13c는 CI107(C)을 투여한 후 48시간에 혈청 화학 분석에 의해 측정된 아스파테이트 아미노트랜스퍼레이스(AST)의 수준을 보여준다.

도 13d는 항-이디오타입 포획 및 항-인간 Fc 검출을 사용하여 ELISA에 의해 측정된 Act-CI107 및 CI107의 혈장 농도를 보여준다. CI107 선은 2.0 mg/kg CI107이 투여된 3마리의 개별 동물로부터의 데이터를 나타내고; Act-TCB 선은 0.06 mg/kg 또는 0.18 mg/kg Act-TCB이 투여된 단일 동물을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 개시내용을 보다 쉽게 이해할 수 있게 하기 위하여, 먼저 소정의 용어가 정의된다. 본 출원에서 사용되는 바

와 같이, 본 명세서에 달리 명시적으로 제공된 경우를 제외하고, 다음 각 용어는 아래에 제시된 의미를 갖는다. 추가적인 정의는 출원 전반에 걸쳐 제시되어 있다.

[0038] **정의**

[0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "활성화 가능한 폴리펩타이드 복합체"는 함께 항원 결합 영역을 형성하는 적어도 하나의 가변 중쇄 도메인과 적어도 하나의 가변 경쇄 도메인, 마스킹 모이어티(MM) 및 절단성 모이어티(CM)를 갖는 폴리펩타이드를 지칭하며, 여기서 MM은 프로테이스에 의해 절단 가능한 CM을 통해 항원 결합 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 연결된다.

[0040] 용어 "이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체" 또는 "HBPC"와 관련하여 사용될 때 용어 "활성화 가능한"은 본 명세서에서 HBPC의 구조에 부착된 하나 이상의 마스킹 모이어티의 존재에 의해 결합 활성이 손상되는 HBPC를 지칭한다. 용어 "활성화된(activated 및 act-)"은 각각 활성화된 HBPC를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 용어 "활성화된" 및 "비마스킹된"은 상호교환적으로 사용된다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리펩타이드"는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 일반적인 용어이다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "T 세포"는 다양한 세포 매개성 면역 반응에 참여하는 흉선 유래 림프구로 정의된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절 T 세포"는 억제 특성을 갖는 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 세포를 지칭한다. "Treg"는 조절 T 세포에 대해 본 명세서에서 사용된 약어이다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헬퍼 T 세포"는 $CD4^+$ T 세포를 지칭한다. 헬퍼 T 세포는 MHC 클래스 II 분자에 결합된 항원을 인식한다. 상이한 사이토카인을 생산하는 적어도 두 가지 유형의 헬퍼 T 세포인 Th_1 및 Th_2가 있다. 헬퍼 T 세포는 활성화되면 $CD25^+$가 되지만, 일시적으로만 $FoxP3^+$가 된다.

[0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포독성 T 세포"는 $CD8^+$ T 세포를 지칭한다. 세포독성 T 세포는 MHC 클래스 I 분자에 결합된 항원을 인식한다.

[0045] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)을 항원에 결합시키는 데 관여하는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체) 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 항체와 같은 항원 결합 단백질의 중쇄 및 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변 영역 또는 도메인은 프레임워크 영역(framework region: FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 초가변 영역(hypervariable region: HVR) 또는 상보성 결정 영역(complemetarity-determining region: CDR)과 같은 초가변 영역(region of hypervariability)(또는 구조적으로 정의된 루프의 서열 및/또는 형태에서 초가변성일 수 있는 초가변 영역(hypervariable region))으로 더 세분화될 수 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 HVR(HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) 또는 이의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 있고, 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 HVR(HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3) 또는 이의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 있다. "프레임워크 영역" 및 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 비-HVR 또는 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 각 전장 중쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)이 있고, 각 전장 경쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 있다. 각 VH 및 VL 내에서, 3개의 HVR 또는 CDR 및 4개의 FR은 전형적으로, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, 다음 순서로 배열된다: HVR의 경우에 FR1, HVR1, FR2, HVR2, FR3, HVR3, FR4 또는 CDR의 경우에 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4(또한 문헌[Chothia and Lesk *J. Mot. Biol.*, 195, 901-917 (1987)] 참조). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적인 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Portolano et al. J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄 가변 영역"(VH)은 중쇄 HVR-H1, FR-H2, HVR-H2, FR-H3 및 HVR-H3을 포함하는 영역을 지칭한다. 예를 들어, 중쇄 가변 영역은 중쇄 CDR-H1, FR-H2, CDR-H2, FR-H3 및 CDR-H3을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 중쇄 가변 영역은 또한 FR-H1의 적어도 일부 및/또는 FR-H4의 적어도 일부를 포함한다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄 불변 영역"은 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 γ, δ 및 α를 포함한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 또한 ε 및 μ를 포함한다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄 가변 영역"(VL)은 경쇄 HVR-L1, FR-L2, HVR-L2, FR-L3 및 HVR-L3을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 양태에서, 경쇄 가변 영역은 경쇄 CDR-L1, FR-L2, CDR-L2, FR-L3 및 CDR-L3을 포함한다. 일부 양태에서, 경쇄 가변 영역은 또한 FR-L1 및/또는 FR-L4를 포함한다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄 불변 영역"은 경쇄 불변 도메인인 C_L을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 경쇄 불변 영역은 λ 및 κ를 포함한다.

[0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄"(LC)는 리더 서열이 있거나 없는, 적어도 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 양태에서, 경쇄는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "전장 경쇄"는 리더 서열이 있거나 없는, 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0051] 용어 "항체"는 면역글로불린 분자(Ig) 또는 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는(이와 면역 반응하는) 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 지칭한다. 항체 또는 폴리펩타이드의 "항원 결합 부분"("항원 결합 단편"이라고도 함)은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 폴리펩타이드의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 항체 및 항원 결합 부분은 다중클론, 단일클론, 키메라, 도메인 항체, 단쇄 항체, Fab 및 $F(ab')_2$ 단편, scFv, Fd 단편, Fv 단편, 단일 도메인 항체(sdAb) 단편, 이중 친화성 재표적화 항체(dual-affinity re-targeting antibody: DART), 이중 가변 도메인 면역글로불린; 선택적으로 합성 링커에 의해 연결될 수 있는 단리된 상보성 결정 영역(CDR)과 2개 이상의 단리된 CDR의 조합 및 Fab 발현 라이브러리를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 비인간 항체, 예를 들어, 낙타 항체는 인간에서 면역원성을 감소시키기 위해 재조합 방법에 의해 인간화될 수 있다.

[0052] 본 명세서에 명시된 CDR 서열은 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[Abhinandan, K. R. and Martin, A.C.R. (2008) "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains", Molecular Immunology, 45, 3832-3839]에 기술되어 있는 바와 같은 Kabat 넘버링 시스템(즉, "Kabat CDR")에 따라 결정된다. Kabat CDR은 CDR-L1: 잔기 L24-L34; CDR-L2: 잔기 L50-L56; CDR-L3: 잔기 L89-L97; CDR-H1: 잔기 H31-H35; CDR-H2: 잔기 H50-H65; 및 CDR-H3: 잔기 H95-H102로 정의되며, 여기서 "L"은 경쇄 가변 도메인을 지칭하고, "H" 중쇄 가변 도메인을 지칭한다.

[0053] "특이적으로 결합하다" 또는 "면역특이적으로 결합하다"는 표적화 도메인, 항체 또는 항원 결합 단편이 목적하는 항원의 하나 이상의 항원 결합기와 반응하고 다른 폴리펩타이드와는 반응하지 않거나 훨씬 더 낮은 친화도($K_d > 10^{-6}$)로 결합함을 의미하며, 여기서 더 작은 Kd는 더 큰 친화성을 나타낸다. 선택된 폴리펩타이드의 면역학적 결합 특성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 정량화될 수 있다. 이러한 방법 중 하나는 항원 결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리 속도를 측정하는 것을 수반하며, 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화력 및 양방향 속도에 동일하게 영향을 미치는 기하학적 매개변수에 따라 달라진다. 따라서, "온 속도 상수(on rate constant)"(k_{on}) 및 "오프 속도 상수(off rate constant)"(k_{off})는 둘 다 농도 및 실제 결합 및 해리 속도를 계산하여 결정될 수 있다(문헌[Nature 361:186-87 (1993)] 참조). k_{off}/k_{on}의 비는 친화성과 관련되지 않은 모든 매개변수를 소거할 수 있게 하며 해리 상수 Kd와 같다(일반적으로, 문헌[Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473] 참조). 일부 양태에서, 상응하는 항원에 특이적으로 결합하는 항원 표적화 도메인, 항체 또는 항원 결합 단편은 표적 항원에 대하여 약 10 μM 미만, 일부 양태에서 약 100 μM 미만의 Kd를 나타낸다.

[0054] 면역글로불린은 IgA, 분비성 IgA, IgG 및 IgM을 포함하지만 이에 제한되지 않는 일반적으로 알려진 임의의 아이소형으로부터 유래될 수 있다. IgG 서브클래스는 또한 당업자에게 잘 알려져 있으며, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "아이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화되는 항체 클래스 또는 서브클래스(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

[0055] "항-항원" 항체 또는 폴리펩타이드는 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 예를 들어, 항-CD3 폴리펩타이드는 CD3에 특이적으로 결합한다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "MM" 및 "마스킹 모이어티"는 상응하는 항원에 대한 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, MM1은 제1 표적에 대한 제1 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드이고, MM2는 제2 표적에 대한 제2 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드이다. 마스킹 모이어티가 상응하는 표적에 대한 표적화 도메인의 결합을 방해하는 정도는 "마스킹 효율"로 정량화된다. 용어 "마스킹 효율" 및 "ME"는 본 명세서에서 다음과 같이 결정되는 비를 지칭하기 위해 상호교환적으로

사용된다:

[0057] ME = EC50, 활성화 가능한 HBPC(즉, 프로테이스에 의해 절단되지 않음)

[0058] EC50, 활성화된 HBPC

[0059] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CM" 및 "절단성 모이어티"는 프로테이스에 의한 절단에 취약한 펩타이드를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. CM의 프로테이스 매개성 절단으로 인해 활성화 가능한 HBPC의 구조로부터 MM이 방출되어 "활성화된"(즉, 비마스킹된) 생성물이 생성되며, 여기서 각각의 상응하는 "활성화된"(즉, 비마스킹된) 제1 및/또는 제2 표적화 도메인은 각각의 표적에 자유롭게 결합한다.

[0060] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 "단리된 폴리뉴클레오타이드"가 이의 기원으로 인해 (1) "단리된 폴리뉴클레오타이드"가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 연관되지 않거나, (2) 자연적으로 연결되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되거나, (3) 더 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는 재조합 폴리뉴클레오타이드 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 본 개시내용에 따른 폴리뉴클레오타이드는 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된"은 설명된 구성요소의 위치가 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있음을 지칭한다. 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결된" 제어 서열은 코딩 서열의 발현이 제어 서열에 적합한 조건하에서 달성되는 방식으로 결찰된다.

[0062] 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 아미노산 서열(즉, 각각의 참조 서열)의 사소한 변이는 생성된 유사체 서열이 참조 서열에 대해 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 95%, 가장 바람직하게는 99%의 서열 동일성을 유지하는 경우에 본 개시내용에 포함되는 것으로 상정된다. 특히, 보존적 아미노산 대체가 상정된다. 보존적 대체는 측쇄의 특성과 관련된 아미노산의 패밀리 내에서 발생하는 것이다. 아미노산은 다음 패밀리로 분류될 수 있다: (1) 산성 아미노산은 아스파테이트, 글루타메이트이고; (2) 염기성 아미노산은 라이신, 아르기닌, 히스티딘이고; (3) 비극성 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판이고, (4) 비하전된 극성 아미노산은 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 타이로신이다. 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파테이트, 글루타민, 글루타메이트, 히스티딘, 라이신, 세린 및 트레오닌을 포함한다. 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함한다. 아미노산의 다른 패밀리는 (i) 지방족-하이드록시 패밀리인 세린 및 트레오닌; (ii) 아마이드 함유 패밀리인 아스파라긴 및 글루타민; (iii) 지방족 패밀리인 알라닌, 발린, 류신 및 아이소류신; 및 (iv) 방향족 패밀리인 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 복합체 내에서, 류신을 아이소류신 또는 발린으로, 아스파테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로 단리하여 대체하거나 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사하게 대체하는 것은 특히 대체가 CDR 또는 프레임워크 영역 내의 아미노산을 포함하지 않는 경우 생성된 분자의 결합 또는 특성에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 아미노산 변화로 인해 기능성 폴리펩타이드 복합체가 생성되는지 여부는 생성된 분자, 즉, 생성된 유사체 서열의 특정 활성을 검정함으로써 쉽게 결정될 수 있다. 검정은 본 명세서에 자세히 설명되어 있다. 유사체의 바람직한 아미노- 및 카복시-말단은 기능성 도메인의 경계 근처에서 발생한다. 구조적 및 기능성 도메인은 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공개 또는 독점 서열 데이터베이스와 비교하여 확인될 수 있다. 바람직하게는, 전산화된 비교 방법이 알려진 구조 및/또는 기능이 알려진 다른 단백질에서 발생하는 서열 모티프 또는 예측된 단백질 입체형태 도메인을 확인하는 데 사용된다. 알려진 3차원 구조로 접히는 단백질 서열을 확인하는 방법은 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Bowie et al. Science 253:164 (1991)]을 참조한다. 따라서, 전술한 예는 당업자가 본 개시내용에 따라 구조적 및 기능성 도메인을 정의하는 데 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 입체형태를 인식할 수 있음을 보여준다.

[0063] 보존적 아미노산 치환은 참조 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시켜서는 안 된다(예를 들어, 대체 아미노산은 참조 서열에서 발생하는 나선을 파괴하거나 참조 서열의 특성을 규명 짓는 다른 유형의 2차 구조를 파괴하는 경향이 있어서는 안 된다). 당업계에서 인식되는 폴리펩타이드 2차 및 3차 구조의 예는 단백질, 구조 및 분자 원리에 기술되어 있다(Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 및 Thornton et al. Nature 354:105 (1991)).

[0064] 예시적인 아미노산 치환은 또한 (1) CM을 포함하는 절단성 링커 이외의 활성화 가능한 폴리펩타이드 영역에서

단백질분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키고, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화도를 변경하고, (4) 항원에 대한 결합 친화도를 변경하고, (4) 이러한 유사체의 다른 물리화학적 또는 기능적 특성을 부여하거나 변형시키는 것들을 포함한다. 이러한 아미노산 치환은 공지된 돌연변이유발 방법 및/또는 본 명세서에 기재된 검정을 사용하는 유도 분자 진화(directed molecular evolution) 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 각각 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 공개 제WO 2001/032712호, 미국 특허 제7,432,083호, 미국 공개 제2004/0180340호 및 미국 특허 제6,297,053호를 참조한다. 유사체는 활성화 가능한 HBPC 내의 참조 서열에 하나 이상의 돌연변이를 도입함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 다중 아미노산 치환은 자연 발생적 참조 서열(바람직하게는 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 외부의 폴리펩타이드 부분)에서 이루어질 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능한" 또는 "약리학적으로 적합한"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미하며, 예를 들어, 물질은 임의의 심각한 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키거나 물질이 함유된 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않고 개체 또는 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물에 혼입될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제는, 예를 들어, 독물학 및 제조 테스트의 필수 표준을 충족하고/하거나 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug administration)에서 작성된 비활성 성분 가이드에 포함되어 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 "환자"는 암에 걸린 임의의 환자를 포함한다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0067] 용어 "암", "암성" 또는 "악성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 병태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예는, 예를 들어, 절제 불가능하거나 전이성인 흑색종과 같은 흑색종, 백혈병, 림프종, 아세포종, 암종 및 육아종을 포함한다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 만성 골수 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 필라델피아 염색체 양성 급성 림프아구성 백혈병(Ph+ ALL), 편평 세포암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신경교종, 위장관암, 신암, 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경아세포종, 췌장암, 다형성 교아세포종, 자궁경부암, 위암(stomach cancer), 방광암, 간종양, 유방암, 결장 암종 및 두경부암, 위암(gastric cancer), 생식세포 종양, 소아 육아종, 부비동 내추럴 킬러(sinonasal natural killer), 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia: AML) 및 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CML)을 포함한다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 용어 "종양"은 전암성 병변을 포함하여 양성(비암성) 또는 악성(암성)의 과도한 세포 성장 또는 증식으로 인해 발생하는 임의의 조직 덩어리를 지칭한다.

[0069] "투여하는"은 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 치료제를 포함하는 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다. 본 명세서에 개시된 제형을 위한 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척수 또는, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 기타 비경구 투여 경로를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 어구 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 림프내, 병변내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입뿐만 아니라 생체내 전기천공을 포함한다. 일부 양태에서, 제형은 비경구가 아닌 경로를 통해, 일부 양태에서, 경구로 투여된다. 다른 비경구가 아닌 경로는 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비강내, 질내, 직장, 설하 또는 국소 투여 경로를 포함한다. 투여는 또한, 예를 들어, 1회, 수회 및/또는 1회 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0070] 대상체의 "치료" 또는 "요법"은 질환과 연관된 증상, 합병증 또는 병태 또는 생화학적 징후의 진행, 발생, 중증도 또는 재발을 역전, 완화, 개선, 저해, 둔화시키기 위한 목적으로 대상체에게 수행되는 임의의 유형의 중재 또는 과정 또는 활성제의 투여를 지칭한다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 "유효한 치료"는 유익한 효과, 예를 들어, 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상의 개선을 야기하는 치료를 지칭한다. 유익한 효과는 기준선에 대한 개선, 즉, 방법에 따른 요법의 개시 전에 수행된 측정 또는 관찰에 대한 개선의 형태를 취할 수 있다. 유익한 효과는 또한 종양 마커의 유해한 진행을 저지, 둔화, 지연 또는 안정화시키는 형태를 취할 수 있다. 유효한 치료는 암과 연관된 적어도 하나의 증상의 완화를 지칭할 수 있다. 이러한 유효한 치료는, 예를 들어, 환자의 통증을 감소시킬 수 있고, 병변의 크기 및/또는 수를 감소시킬 수 있고, 종양의 전이를 감소시키거나 예방할 수 있고/있거나 종양의 성장을 늦출 수 있다.

[0072] 용어 "유효량"은 목적하는 생물학적, 치료적 및/또는 예방적 결과를 제공하는 약제의 양을 지칭한다. 그 결과는

질환의 징후, 증상 또는 원인 중 하나 이상의 감소, 개선, 경감, 약화, 지연 및/또는 완화 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 목적하는 변경일 수 있다. 고형 종양과 관련하여, 유효량은 종양을 축소시키고/시키거나 종양의 성장 속도를 감소시키거나(예컨대, 종양 성장의 억제) 다른 원치 않는 세포 증식을 지연시키기에 충분한 양을 포함한다. 일부 양태에서, 유효량은 종양 재발을 예방하거나 지연시키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 약물 또는 조성물의 유효량은 (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 종양 크기를 감소시키고; (iii) 암세포가 말초 기관으로 침윤하는 것을 어느 정도 저해, 지연, 둔화시키고, 중지시킬 수 있고; (iv) 종양 전이를 저해하고(즉, 어느 정도 둔화시키고 중지시킬 수 있음); (v) 종양 성장을 저해하고; (vi) 종양의 발생 및/또는 재발을 예방하거나 지연시키고; 그리고/또는 (vii) 암과 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화시킬 수 있다.

[0073] "면역 반응"은 척추동물의 몸에 침입한 병원체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암성 또는 다른 비정상적인 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우에 정상적인 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적인 표적화, 결합, 손상, 이의 파괴 및/또는 이로부터의 제거를 초래하는 면역계의 세포(예를 들어, T 림프구, B 림프구, 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 수지상 세포 및 호중구) 및 임의의 이들 세포 또는 간, 비장 및/또는 골수에 의해 생성된 가용성 거대분자(항체, 사이토카인 및 보체 포함)의 작용을 지칭한다.

[0074] 본 개시내용의 활성화 가능한 폴리펩타이드의 도식적 표현, 예를 들어, 도 1은 배타적인 것으로 의도되지 않는다. 링커, 스페이서 및 신호 서열과 같은 다른 서열 요소는 이러한 도식적 표현에서 나열된 서열 요소 앞, 뒤 또는 사이에 존재할 수 있다. MM 및 CM은 항체 또는 폴리펩타이드의 VL 대신에 항체 또는 폴리펩타이드의 VH에 연결될 수 있고 그 반대도 가능하다는 것을 이해하여야 한다.

[0075] 대안(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "부정 관사"는 임의의 인용되거나 열거된 구성요소 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다른 하나가 있거나 없는 2개의 명시된 특징 또는 구성요소 각각의 특정 개시로서 받아들여져야 한다. 따라서, 본 명세서에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)을 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 각각 다음 양태를 포괄하도록 의도된다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0077] 양태가 본 명세서에서 "포함하는"이라는 표현으로 기술되는 경우, "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어지는"이라는 용어로 기술되는 유사한 양태도 제공되는 것으로 이해된다.

[0078] 용어 "약"은 당업자에 의해 결정된 특정 값 또는 조성에 대해 허용 가능한 오차 범위 내에 있는 값 또는 조성을 지칭하며, 이는 부분적으로 값 또는 조성이 어떻게 측정되거나 결정되는지에 따라, 즉, 측정 시스템의 한계에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 당업계의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 최대 10% 또는 20%(즉, ±10% 또는 ±20%)의 범위를 의미할 수 있다. 예를 들어, 약 3㎎은 2.7㎎과 3.3 ㎎ 사이(10%의 경우) 또는 2.4㎎과 3.6㎎ 사이(20%의 경우)의 임의의 숫자를 포함할 수 있다. 또한, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 해당 용어는 최대 10배(order of magnitude) 또는 최대 5배의 값을 의미할 수 있다. 출원 및 청구범위에 특정 값 또는 조성이 제공되는 경우, 달리 명시하지 않는 한, "약"의 의미는 해당 특정 값 또는 조성에 대해 허용 가능한 오차 범위 내에 있는 것으로 가정되어야 한다.

[0079] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 나타내지 않는 한 언급된 범위 내의 임의의 정수의 값, 적절한 경우, 이의 분율(예컨대, 정수의 10분의 일 및 100분의 일)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0080] 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용과 관련된 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌[the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 5th ed., 2013, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, Oxford University Press]은 당업자에게 본 개시내용에 사용된 많은 용어의 일반 사전을 제공한다.

[0081] 단위, 접두사 및 기호는 국제단위계(Système International de Unites: SI) 승인 형식으로 표시된다. 숫자 범

위는 범위를 정의하는 숫자가 포함된다. 본 명세서에 제공된 제목은 명세서 전체를 참조하여 가질 수 있는 본 개시내용의 다양한 양태를 제한하는 것이 아니다. 따라서, 위에 정의된 용어는 전체 사양을 참조하여 더욱 완전하게 정의된다.

[0082] 본 개시내용의 다양한 양태는 다음 하위부문에서 더 자세히 설명된다.

[0083] **활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)**

[0084] 본 개시내용은 다음을 포함하는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체를 제공한다:

[0085] (a) 다음을 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0086] (i) 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, scFv는 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하고, VH1과 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함),

[0087] (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1),

[0088] (iii) 제1 프로테이스에 대한 제1 기질을 포함하는 제1 절단성 모이어티(CM1),

[0089] (iv) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및

[0090] (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1);

[0091] (b) 다음을 포함하는 제2 폴리펩타이드:

[0092] (i) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, VH2와 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함),

[0093] (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2) 및

[0094] (iii) 제2 프로테이스에 대한 제2 기질을 포함하는 제2 절단성 모이어티(CM2); 및

[0095] (c) 다음을 포함하는 제3 폴리펩타이드:

[0096] (i) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2),

[0097] 여기서, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않고;

[0098] MM1은 제1 표적에 대한 제1 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드이고, MM2는 제2 표적에 대한 제2 표적화 도메인의 결합을 방해하는 펩타이드이다.

[0099] 일부 양태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC는 선택적으로 종양 미세환경서 더 우세한 조건에서 선택적으로 활성화된다. 그러나, 이러한 활성화가 일어날 때까지, 표적에 결합하는 능력은 제 기능을 하지 못한다. 따라서, 본 개시내용의 활성화 가능한 이중특이성 항체(즉, 활성화 가능한 HBPC)는 표적외 결합을 최소화함으로써 표적 관련 독성을 감소시킬 가능성을 갖고 있다. 구조적으로, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC는 각 표적에 대해 단 하나의 결합 도메인을 갖는다(즉, "1가"). 또한, 이러한 활성화 가능한 HBPC는 실질적인 농도 의존적 응집을 나타내지 않는 것으로 나타나, 따라서 상대적으로 높은 제품 순도 및 높은 생산성 수준으로 활성화 가능한 HBPC(활성화 가능한 이중특이성 항체)를 제조할 수 있다.

[0100] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv-VH2-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다. 본 명세서에서 사용되는 "직접 연결"은 HBPC의 두 펩타이드의 직접적인 접합을 지칭하고, "간접 연결"은 연결 분자, 예를 들어, 스페이서 또는 링커를 사용한 접합을 지칭한다. 아래에서 입증된 바와 같이, 위에 기술된 구조를 갖는 활성화 가능한 HBPC는 유리하게는 대안적인 구조를 갖는 활성화 가능한 이중특이성 항체와 비교하여 증가된 활성(활성화된 경우) 및 마스킹 효율뿐만 아니라 개선된 응집 저항성을 나타내었다.

[0101] 일부 양태에서, 제1 및 제2 표적 중 하나는, 예를 들어, 백혈구와 같은 면역 효과기 세포, 예컨대, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 단핵 효과기 세포(예를 들어, 골수 단핵 세포), 대식세포 및/또는 또 다른 면역 효과기 세포 상의 표면 항원이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "표적" 및 "항원"은 상호교환적으로 사용된다. 적합한 면역 효과기 세포 표적은, 예를 들어, CD3, CD27, CD28, GITR, HVEM, ICOS, NKG2D, OX40 등을 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 표적 및 제2 표적 중 적어도 하나는 CD3이다. 소정의 양태에서, 제1 표적은 CD3이다.

[0102] 소정의 양태에서, 제1 표적과 제2 표적은 상이한 생물학적 표적이고, 상응하게는 제1 표적화 도메인(즉, VL1 및

VH1)과 제2 표적화 도메인(즉, VL2 및 VH2)은 상이하다. 일부 양태에서, 제1 표적 및 제2 표적 중 하나는 CD3 폴리펩타이드이다(그리고 상응하게는, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 하나는 CD3 폴리펩타이드 표적화 도메인이다). 일부 양태에서, 단쇄 가변 단편(scFv)은 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드(즉, 제1 표적)에 대한 제1 표적화 도메인을 형성하는 VH1과 VL1 및 함께, 예를 들어, 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원(즉, 제2 표적)과 같은 암세포 표면 항원에 대한 제2 표적화 도메인을 형성하는 VH2와 VL2를 포함한다. 예시적인 암세포 표면 항원은 EGFR; PSA; PAP; CEA; AFP; HCG; LDH; 에놀레이스 2; CA 15-3 및 CA 27.29 및 표 1에 제공된 예시적인 표적을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 양태에서, 단쇄 가변 단편(scFv)은 함께 암세포 표면 항원(즉, 제1 표적)에 대한 제1 표적화 도메인을 형성하는 VH1과 VL1 및 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드에 대한 제2 표적화 도메인을 형성하는 VH2와 VL2를 포함한다.

표 1

예시적인 표적

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAPl
알파-4 인테그린	CD56	DLK1	하이알루로니데이스	LIF-R	STEAP2
알파-V 인테그린	CD64	DLL4	ICOS	루이스 X	TAG-72
알파4베타 1 인테그린	CD70	DPP-4	IFN알파	LIGHT	TAPA1
알파4베타 7 인테그린	CD7l	DSG1	IFN베타	LRP4	TGF베타
AGR2	CD74	ECFR	IFN감마	LRRC26	TIGIT
항-루이스-Y		EGFRviii	IgE	MCSP	TIM-3
아펠린 J 수용체	CD80	엔도텔린 B 수용체(ETBR)	IgE 수용체(Fce RI)	메소텔린	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MRP4	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGFlR	MUCl	TLR6
BAFF		EPHA2	IL1B	뮤신-16(MUC16, CA-125)	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	TLlR	Na/K ATPase	TLR8
C5 보체	CD125	ERBB3	TL2	호중구 엘라스테이스	TLR9
C-242	CD132(IL-2RG)	RSV의 F 단백질	IL11	NCF	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	니카스트린	TNF알파
CA19-9(루이스 a)	CD137	FGF-2	IL12p40	노치 수용체	TNFR
탄산탈수효소 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12R베타 1	노치 1	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFRl	IL13	노치 2	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	노치 3	TRAIL-R2

[0103]

[0104] 일 양태에서, 암세포 항원은 성장 인자 수용체이다. 성장 인자 수용체는 성장 인자에 결합하는 수용체이다. 성장 인자는 세포 성장을 자극할 수 있는 자연 발생적 물질이다. 아드레노메둘린, 표피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 간세포 성장 인자, 전환 성장 인자 및 종양 괴사 인자를 포함하는 많은 다양한 유형의 성장 인자가 있다. 각 유형의 성장 인자에는 조절에 도움이 될 수 있는 특수한 기능 또는 세포 과정이 있다. 성장 인자 수용체 도메인은 시스테인이 풍부하며 다양한 진핵생물 단백질에서 발견된다. 수용체는 타이로신 카이네이스와 같은 효소에 의한 신호 전달에 관여한다. 다양한 유형의 성장 인자 수용체에도 불구하고, 이들은 2개의 인접한 이황화물을 갖는 베타-헤어핀을 포함하는 이황화물 결합 접힘으로써 성장 인자 수용체 도메인을 포함하는 일반적인 구조를 가지고 있다.

[0105] 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv-VH2-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다.

[0106] 일부 양태에서, T 세포 항원 폴리펩타이드는 CD3이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD3" 또는 "분화 클러스터

3"은 T 세포 수용체 복합체의 서브유닛인 6개 사슬의 단백질 복합체를 지칭한다(Janeway et al., p. 166, 9th ed.). TCR α:β 이종이량체는 CD3 서브유닛과 회합하여 TCR 세포-표면 항원 수용체를 완성한다. 2개의 CD3ε 사슬, CD3γ 사슬 및 CD3δ 사슬과 CD3ζ 사슬의 동종이량체는 T 세포 수용체 복합체를 완성하며, 이는 주요 조직적합성 복합체 클래스 I 및 II에 결합된 펩타이드의 인식에 관여하고 T 세포 활성화를 수반한다. CD3 항원은 성숙 T 림프구 및 흉선세포의 서브세트에 의해 발현된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 CD3는 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터 유래할 수 있다. 해당 용어는 "전장"의 처리되지 않은 CD3(예를 들어, 처리되지 않거나 비변형된 CD3ε 또는 CD3γ)뿐만 아니라 세포에서 처리되어 생성되는 임의의 형태의 CD3를 포함한다. 해당 용어는 또한, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함하여 CD3의 자연 발생적 변이체를 포함한다. 본 명세서에 기재된 항-CD3 표적화 도메인은 인간 야생형 CD3E(NCBI 등록 번호 NM_000733.3)에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0107] 본 개시내용의 일부 양태에서, T 세포 항원 폴리펩타이드는 CD3의 엡실론 사슬이다. 일부 양태에서, scFv(예를 들어, 항-CD3 scFv)는 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함한다.

[0108] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표 2에 제공된 항-CD3 항체의 VH CDR1 내지 3 및 VL CDR1 내지 3을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)을 제공한다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 각각 서열번호 3 내지 5의 VH CDR1 내지 3 및 서열번호 6 내지 8의 VL CDR1 내지 3을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 각각 서열번호 128, 4, 130의 VH CDR1 내지 3 및 각각 서열번호 131 내지 133의 VL CDR1 내지 3을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 각각 서열번호 3 내지 5의 VH CDR1 내지 3 및 각각 서열번호 144, 7, 146의 VL CDR1 내지 3을 포함한다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv)은 각각 서열번호 128, 4, 130의 VH CDR1 내지 3 및 각각 서열번호 145, 132, 133의 VL CDR1 내지 3을 포함한다.

[0109] 당업계에 공지된 임의의 다수의 항-CD3 항체의 가변 도메인 및/또는 scFv는 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC에 사용하기에 적합하다. 일부 양태에서, scFv는 CD3ε 결합에 특이적이며, CD3ε에 결합하는 항체 또는 이의 단편, 예를 들어, CH2527, FN18, H2C, OKT3, SP34, 2C11, UCHT1, I2C, V9, 이들의 변이체 등이거나 이로부터 유래된다. 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC에 사용하기에 적합한 항-CD3 항체(및/또는 이의 가변 도메인) 및 마스킹 모이어티는, 예를 들어, 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 공개 제WO 2013/163631호, 제WO 2015/013671호, 제WO 2016/014974호, 제WO 2019/075405호 및 제WO 2019/213444호에 기술되어 있는 것들을 포함한다. 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC는 표 2에 나열된 임의의 예시적인 항-CD3 VL CDR 및 VH CDR을 포함할 수 있다.

표 2

항-CD3 항체	VH			VL			항-CD3 마스크
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	
1	KYAMN (서열번호 3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYISYWAY (서열번호 5)	GSSTGAVTSGNYPN (서열번호 6)	GTKFLAP (서열번호 7)	VLWYSNRWV (서열번호 8)	VSTTCWWDPPCTPNT (서열번호 1)
2	TYAMN (서열번호 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 130)	RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 131)	GTNKRAP (서열번호 132)	ALWYSNLWV (서열번호 133)	GYLWGCEWNCGGITT (서열번호 72)
3	KYAMN (서열번호 3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYISYWAY (서열번호 5)	GSSTGAVTSGYYPN (서열번호 144)	GTKFLAP (서열번호 7)	ALWYSNRWV (서열번호 146)	GYRWGCEWNCGGITT (서열번호 68)
4	KYAMN (서열번호 3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYISYWAY (서열번호 5)	GSSTGAVTSGYYPN (서열번호 144)	GTKFLAP (서열번호 7)	ALWYSNRWV (서열번호 146)	MMYCGGNEVLCGPRV (서열번호 67)
5	KYAMN (서열번호 3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYISYWAY (서열번호 5)	GSSTGAVTSGYYPN (서열번호 144)	GTKFLAP (서열번호 7)	ALWYSNRWV (서열번호 146)	VYYCGGNESLCGERR (서열번호 147)
6	TYAMN	RIRSKYNNYA	HGNFGNSYVS	RSSTGAVTT	GTNK	ALWYSNL	MMYCG

[0110]

	(서열번호 128)	TYYADSVKD (서열번호 4)	WFAY (서열번호 130)	SNYAN (서열번호 131)	RAP (서열번호 132)	WV (서열번호 133)	GNEVLCGPRV (서열번호 67)
7	TYAMN (서열번호 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 130)	RSSGAVTTSNYAN (서열번호 145)	GTNKRAP (서열번호 132)	ALWYSNLWV (서열번호 133)	GYRWGCEWNCGGITT (서열번호 68)
8	TYAMN (서열번호 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 130)	RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 131)	GTNKRAP (서열번호 132)	ALWYSNLWV (서열번호 133)	VYYCGGNESLCGERR (서열번호 147)
9	TYAMN (서열번호 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGNFGNSYVSWFAY (서열번호 130)	RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 131)	GTNKRAP (서열번호 132)	ALWYSNLWV (서열번호 133)	WYSGGCEAFCGILSS (서열번호 148)
10	TYAMN (서열번호 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (서열번호 4)	HGFGNSYVSWFAY (서열번호 143)	RSSTGAVTTSNYAN (서열번호 131)	GTNKRAP (서열번호 132)	ALWYSNLWV (서열번호 133)	FMCQQRMWGNEFCHQ (서열번호 149)

[0111]

[0112] 다른 적합한 항-CD3 마스킹 모이어티(예를 들어, MM1)는, 예를 들어, YSLWGCEWGCDRGLY(서열번호 150), GYRWGCEWNCGGITT(서열번호 68), YSACEMFGEVECCFC(서열번호 151), WYSGGCEAFCGILSS(서열번호 148), GYSGGCEFRCYQLYS(서열번호 152), KFCHCGYYCRVCTLK(서열번호 153), LGCNNLWGNEFCHPV(서열번호 154) 및 GHPCWGNESYCHTHS(서열번호 155)를 포함한다.

[0113] 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 VH2와 단량체 Fc 도메인 사이에 배치된 중쇄 CH1 도메인을 추가로 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 CH1 도메인과 제1 단량체 Fc 도메인 사이에 배치된 면역글로불린 힌지 영역(HR1)을 추가로 포함한다.

[0114] 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접 연결이다.

[0115] 일부 양태에서, 암세포 항원은 종양 세포 분화 항원 또는 다른 종양 관련 항원이다. 종양 세포에서 발현되는 일부 항원은 또한 종양이 발생한 세포 계통의 비악성 세포에서 적어도 일부 분화 단계 동안 발현된다. 따라서, 이러한 계통 특이적 항원은 분화 마커로 간주될 수 있다. 악성 세포는 일반적으로 종양 세포가 기원하는 정상적인 세포 유형에 특유한 유전자 중 적어도 일부를 발현하기 때문에, 분화 마커는 암세포에서 발견된다. 따라서, 이러한 정상적인 분화 항원의 존재는 치료용 항체의 세포파괴 효과를 단일 세포 계통으로 제한하는 데 도움이 될 수 있다.

[0116] 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC의 예시적인 개략도가 도 1에 제공되어 있으며, 이는 (a) 제1 마스킹 모이어티(MM1)(**100**), 제1 절단성 모이어티(CM1)(**101**), scFv(**102**)(링커를 통해 연결된 VH1 및 VL1 서열 포함), 힌지 영역(**109**)을 통해 제1 Fc 도메인(**104**)에 연결된 제2 중쇄 가변 도메인인 VH2(위) 및 CH1 도메인(아래)((**103**)으

로 함께 나타냄)을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

[0117] (b) 제2 마스킹 모이어티(MM2)(105), 제2 절단성 모이어티(CM2)(106) 및 제2 경쇄 가변 도메인인 VL2(위) 및 경쇄 불변 도메인(아래)((107)로 함께 나타냄)을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및

[0118] (c) 힌지 영역(110) 및 제2 Fc 도메인(108)을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 도시한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 제1 및 제2 Fc 도메인은 서로 결합하고, 제2 중쇄 가변 도메인(VH2)과 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)은 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성한다. 일부 양태에서, scFv는 항-CD3 scFv이되, 제1 표적은 CD3이고, VH2와 VL2는 종양 관련 또는 종양 특이적 항원 결합 도메인을 형성한다(즉, 제2 표적은 종양 관련 항원 또는 종양 특이적 항원이다). 예시적인 항-CD3, 항-EGFR 활성화 가능한 HBPC 및 다른 항-CD3, 항종양 관련 항원 HBPC는 아래의 실시예에서 더 자세히 설명된다.

[0119] 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 중쇄 CDR1(VH CDR1, 본 명세서에서 CDRH1로도 지칭됨), CDR2(VH CDR2, 본 명세서에서 CDRH2로도 지칭됨) 및 CDR3(VH CDR3, 본 명세서에서 CDRH3으로도 지칭됨)과 가변 경쇄 CDR1(VL CDR1, 본 명세서에서 CDRL1로도 지칭됨), CDR2(VL CDR2, 본 명세서에서 CDRL2로도 지칭됨) 및 CDR3(VL CDR3, 본 명세서에서 CDRL3으로도 지칭됨)를 포함하는 예시적인 항-CD3 scFv를 포함한다.

[0120] 본 개시내용의 일부 양태에서, scFv는 (i) 아미노산 서열 KYAMN(서열번호 3)을 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD(서열번호 4)를 포함하는 CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 HGNFGNSYISYWAY(서열번호 5)를 포함하는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH1); 및 (i) 아미노산 서열 GSSTGAVTSGNYPN(서열번호 6)을 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GTKFLAP(서열번호 7)를 포함하는 CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 VLWYSNRWV(서열번호 8)를 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함한다.

[0121] 본 개시내용의 일부 양태에서, VH1은 서열번호 9와 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, VL1은 서열번호 10과 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0122] 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 scFv는 서열번호 9의 중쇄 가변을 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 scFv는 서열번호 10의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0123] 일부 양태에서, VH1은 (i) 아미노산 서열 KYAMN(서열번호 3)을 포함하는 VH CDR1, (ii) 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD(서열번호 4)를 포함하는 VH CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 HGNFGNSYISYWAY(서열번호 5)를 포함하는 VH CDR3를 포함하고; VL1은 (i) 아미노산 서열 GSSTGAVTSGNYPN(서열번호 6)을 포함하는 VL CDR1, (ii) 아미노산 서열 GTKFLAP(서열번호 7)를 포함하는 VL CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 VLWYSNRWV(서열번호 8)를 포함하는 VL CDR3를 포함하는 경우, MM1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0124] 대안적인 양태에서, 단쇄 가변 단편은 (i) 아미노산 서열 TYAMN(서열번호 128)을 포함하는 VH CDR1, (ii) 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD(서열번호 129)를 포함하는 VH CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY(서열번호 130)를 포함하는 VH CDR3를 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH1); 및 (i) 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN(서열번호 131)을 포함하는 VL CDR1, (ii) 아미노산 서열 GTNKRAP(서열번호 132)를 포함하는 VL CDR2, (iii) 아미노산 서열 ALWYSNLWV(서열번호 133)를 포함하는 VL CDR3를 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함한다.

[0125] 본 개시내용의 이들 양태 중 일부에서, VH1은 서열번호 134의 아미노산 서열을 포함한다. 본 개시내용의 소정의 양태에서, VL1은 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함한다. 본 개시내용의 특정 양태에서, scFv는 서열번호 122의 아미노산 서열(서열번호 134 및 135를 포함함)을 포함한다.

[0126] 본 개시내용의 일부 양태에서, VH1은 서열번호 134와 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, VL1은 서열번호 135와 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0127] 본 개시내용의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 단쇄 가변 단편은 (i) 아미노산 서열 TYAMN(서열번호 128)을 포함하는 VH CDR1, (ii) 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD(서열번호 129)를 포함하는 VH CDR2, (iii) 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY(서열번호 130)를 포함하는 VH CDR3를 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH1)을 포함하고, 서

열번호 135와 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0128] 본 개시내용의 일부 양태에서, VL1은 (i) 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN(서열번호 131)을 포함하는 VL CDR1, (ii) 아미노산 서열 GTNKRAP(서열번호 132)를 포함하는 VL CDR2, (iii) 아미노산 서열 ALWYSNLWV(서열번호 133)를 포함하는 VL CDR3를 포함하는 아미노산 서열을 포함하되, VL1의 아미노산 서열은 서열번호 135와 적어도 90% 동일하고, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일하다.

[0129] 이들 양태 중 일부에서, VH1은 (i) 아미노산 서열 TYAMN(서열번호 128)을 포함하는 VH CDR1, (ii) 아미노산 서열 RIRSKYNNYATYYADSVKD(서열번호 129)를 포함하는 VH CDR2 및 (iii) 아미노산 서열 HGNFGNSYVSWFAY(서열번호 130)를 포함하는 VH CDR3를 포함하고; VL1은 (i) 아미노산 서열 RSSTGAVTTSNYAN(서열번호 131)을 포함하는 VL CDR1, (ii) 아미노산 서열 GTNKRAP(서열번호 132)를 포함하는 VL CDR2, (iii) 아미노산 서열 ALWYSNLWV(서열번호 133)를 포함하는 VL CDR3를 포함하는 경우, MM1은 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함한다.

[0130] 위에 기재된 바와 같이, 제1 폴리펩타이드는 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 추가로 포함한다. 당업계에 공지된 Fc 도메인은 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC에 사용하기에 적합하며, 본 명세서에서 아래에 더욱 자세히 설명된다.

[0131] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 VH2와 Fc1 사이에 배치된 중쇄 CH1 도메인을 추가로 포함한다. 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 VH2와 Fc1 사이에 배치된 면역글로불린 힌지 영역을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, CH1 도메인이 존재하는 경우, 면역글로불린 힌지 서열은 CH1 도메인과 Fc1 도메인 사이에 배치된다.

[0132] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-힌지 영역(HR1)-Fc1의 구조적 배열을 포함하되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접(예를 들어, 링커를 통한) 연결이다.

[0133] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 하나 이상의 선택적 링커를 추가로 포함하며, 이는 본 명세서에서 아래에 더 자세히 설명된다.

[0134] 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 서열번호 23 또는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 Fc1을 포함하는 제1 폴리펩타이드를 포함한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 힌지-1(서열번호 34) 또는 힌지-2(서열번호 35)의 서열을 갖는 힌지 영역을 포함하는 제1 폴리펩타이드를 포함한다.

[0135] 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3를 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL2)을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함한다.

[0136] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는 하나 이상의 링커를 포함한다. 일부 양태에서, MM2는 링커를 통해 CM2에 연결된다.

[0137] 일부 양태에서, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 제2 폴리펩타이드는 약 1개 내지 약 20개의 아미노산을 포함하는 링커를 추가로 포함한다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 링커는 아래에서 더 자세히 논의된다.

[0138] 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는 불변 경쇄 도메인(CL)을 추가로 포함한다. 예시적인 CL은 임의의 당업계에 공지된 것들을 포함한다. 일부 양태에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 CL을 포함한다. 소정의 이들 양태에서, 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, MM2-CM2-VL2-CL의 구조적 배열을 포함하되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접(예를 들어, 링커를 통한) 연결이다.

[0139] 일부 양태에서, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 제3 폴리펩타이드는 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는다. Fc2는 본 명세서에 논의된 임의의 Fc 도메인을 포함할 수 있다.

[0140] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 활성화 가능한 HBPC는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, 힌지 영역-Fc2의 구조적 배열을 포함하는 제3 폴리펩타이드를 포함하되, 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접(예를 들어, 링커를 통한) 연결이다. 일부 양태에서, "-"는 직접 연결이다. 소정의 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 힌지 영역 및 Fc2로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진다. 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 서열번호 28을 포함하

는 아미노산 서열(선택적으로, C-말단 라이신을 가짐, 즉, 서열번호 29)을 갖는 Fc2를 포함한다. 일 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 힌지 및 서열번호 28의 아미노산 서열(선택적으로, C-말단 라이신을 가짐, 즉, 서열번호 29)을 포함하는 Fc2를 포함한다. 소정의 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 힌지 및 서열번호 23의 아미노산 서열(선택적으로, C-말단 라이신을 가짐, 즉 서열번호 137)을 포함하는 Fc1을 포함한다.

[0141] 위에 제공된 바와 같이, 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드, 예를 들어, 힌지 영역과 Fc2 사이에 링커를 포함할 수 있다. 링커는 본 명세서에 논의된 임의의 링커를 포함할 수 있다. 소정의 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 링커를 포함하지 않는다.

[0142] 본 명세서에 기재된, 즉, 위에 기재된 바와 같은 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 HBPC의 구성요소의 구조적 배열은 유리하게는 동일한 구성요소의 상이한 구조적 배열을 갖는 활성화 가능한 폴리펩타이드와 비교하여 증가된 활성(활성화된 경우)뿐만 아니라 개선된 응집 저항성을 나타낸다. 본 명세서에 제공된 실시예는 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC의 구조가 마스킹된 이중특이성 작제물의 다른 형식과 비교하여 유익한 특성을 부여함을 시사한다. 결과는 다양 종의 작제물에 걸쳐 일관되었으며, 항체 가변 도메인, 마스킹 모이어티 및 기타 서열 변수의 유형과 무관한 것으로 나타났다.

[0143] 본 명세서에 제공된 활성화 가능한 HBPC는 제1 마스킹 모이어티 및 제2 마스킹 모이어티(각각 MM1 및 MM2)를 포함한다. 각각의 MM은 활성화 가능한 HBPC에 커플링되거나 그렇지 않으면 부착되고 HBPC가 표적에 결합하는 것을 방해하도록 활성화 가능한 HBPC 내에 위치하는 아미노산 서열을 갖는다. 이와 같이, 활성화 가능한 HBPC의 해리 상수(Kd)는 일반적으로 상응하는 활성화된 HBPC(또는 HBPC 단독)의 Kd보다 더 크다. 적합한 제1 및 제2 MM은 임의의 다양한 알려진 기법을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 MM은 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 공개 제2009/0062142호 및 제2012/0244154호 및 PCT 공개 제WO 2014/026136호에 기술되어 있는 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0144] 일부 양태에서, VH1과 VL1은 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드(즉, 제1 표적)에 특이적으로 결합하는 도메인을 형성하고, MM1은 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체가 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 능력을 감소시키는 것이다. 일부 양태에서, VH2와 VL2는 함께 암세포 항원(즉, 제2 표적)에 특이적으로 결합하는 도메인을 형성하고, MM2는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체가 암세포 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 감소시키는 것이다. 일부 양태에서, MM1 및/또는 MM2는 항원 결합 도메인(들)에 특이적으로 결합한다.

[0145] 예를 들어, 다양한 항체 결합 도메인과 관련하여 본 개시내용의 실시에 사용하기에 적합한 마스킹 모이어티는, 예를 들어, 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 PCT 공개 제WO 2013/163631호, 제WO 2013/192550호, 제WO 2014/052462호, 제WO 2015/066279호, 제WO 2016/014974호, 제WO 2016/149201호, 제WO 2016/179285호, 제WO 2016/179257호, 제WO 2016/179335호, 제WO 2017/011580호, 제WO 2016/014974호, 제WO 2019/075405호 및 제WO 2019/213444호에 기술된 것들을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 것들을 포함한다. 본 개시내용의 실시에 사용하기에 적합한 항-CD3 마스킹 모이어티는, 예를 들어, 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 PCT 공개 제WO 2016/014974호, 제WO 2019/075405호 및 제WO 2019/213444호에 기술되어 있는 것들을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 것들을 포함한다.

[0146] 본 명세서에 제공된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, MM1 및/또는 MM2는 5개의 아미노산과 40개의 아미노산을 모두 포함하여 5개의 아미노산 내지 약 40개의 아미노산 또는 그 사이의 임의의 범위를 포함한다.

[0147] 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC는 제1 및 제2 기질(따라서, 제1 및 제2 CM)이 각각 제1 및 제2 프로테이스에 의해 절단되어 HBPC로부터 마스킹 모이어티를 풀어낼(untethering) 때 활성화된다. 이 양태에서, 각 CM은 하나 이상의 프로테이스 절단성 서열 부위를 갖는다. 따라서, 생성된 활성화된 HBPC는 제1 및 제2 표적에 자유롭게 결합한다. 일부 양태에서, 제1 및 제2 기질(따라서, 제1 및 제2 CM)은 동일하다. 이들 양태에서, 제1 및 제2 기질(및 제1 및 제2 CM)은 동일한 프로테이스에 의해 절단 가능하며, 즉, 제1 프로테이스 및 제2 프로테이스는 동일하다. 일부 양태에서, 제1 및 제2 기질은 상이하다(따라서, 제1 및 제2 CM은 상이하다). 소정의 이들 양태에서, 제1 및 제2 프로테이스는 동일하다. 이들 양태 중 다른 양태에서, 제1 및 제2 프로테이스 상이하다.

[0148] 일부 양태에서, CM은 종양 미세환경에서 상향 조절되는 프로테이스에 특이적이다. 이러한 활성화 가능한 HBPC는 치료 및/또는 진단 부위에서의 표적화된 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드(HBPC) 활성화를 위해 종양 세포에서 조절 장애(dysregulated) 프로테이스 활성을 활용한다. 수많은 연구를 통해 고형 종양에서 비정상적인 프로

테이스 수준, 예를 들어, uPA, 레구마인, MT-SP1, 매트릭스 메탈로프로테이스(MMP)의 상관관계가 입증되었다(예를 들어, 문헌[Murthy R V, et al. "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer," Clin Cancer Res. 11 (2005): 2293-2299; Nielsen B S, et al. "Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer," Lab Invest 81 (2001): 1485-1501; Look O R, et al. "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin," J Histochem Cytochem. 51 (2003): 821-829] 참조). CM은 여러 프로테이스에 대한 기질, 예를 들어, 세린 프로테이스 및 제2 상이한 프로테이스, 예를 들어, MMP에 대한 기질 역할을 할 수 있다. 일부 양태에서, CM은 하나 초과의 세린 프로테이스, 예를 들어, 매트립테이스 및/또는 uPA에 대한 기질 역할을 할 수 있다. 일부 양태에서, CM은 하나 초과의 MMP, 예를 들어, MMP9 및 MMP14에 대한 기질 역할을 할 수 있다.

[0149] 일부 양태에서, CM1 및/또는 CM2는 아래 표 3에 제시된 프로테이스에 대한 기질인 아미노산 서열을 포함한다. 소정의 양태에서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 아래 표 3에 제시된 프로테이스에 대한 기질인 아미노산 서열을 포함한다.

표 3

예시적인 프로테이스

ADAMS, ADAMTS, 예를 들어 ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	시스테인 프로테이네이스, 예를 들어, 크루지파인 레구마인 오투바인-2 KLK, 예를 들어, KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8 KLK10 KLK11 KLK13 KLK14	세린 프로테이스, 예를 들어, 활성화된 단백질 C 카텝신 A 카텝신 G 카이메이스 응고인자 프로테이스 (예를 들어, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa) 엘라스테이스 그랜자임 B 구아니디노벤조아테이스 HtrA1 인간 호중구 엘라스테이스 락토페린 마캅신 NS3/4A PACE4 플라스민 PSA tPA 트롬빈 트립테이스 uPA
아스파테이스 프로테이스, 예를 들어, BACE 레님		
아스파트틴산 카텝신, 예를 들어, 카텝신 D 카텝신 E	메탈로 프로테이스, 예를 들어, 메프린 네프리리신 PSMA BMP-1	
카스페이스, 예를 들어, 카스페이스 1 카스페이스 2 카스페이스 3 카스페이스 4 카스페이스 5 카스페이스 6 카스페이스 7 카스페이스 8 카스페이스 9 카스페이스 10 카스페이스 14	MMP, 예를 들어, MMP1 MMP2 MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	유형 II 막횡단 세린 프로테이스 (TTSP), 예를 들어, DESC1 DPP-4 FAP 헵신 매트립테이스 -2 MT-SP1/매트립테이스 TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4
시스테인 카텝신, 예를 들어, 카텝신 B 카텝신 C 카텝신 K 카텝신 L 카텝신 S 카텝신 V/L2 카텝신 X/Z/P		

[0150]

[0151] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 일부 양태에서, CM1 및/또는 CM2는 약 3개의 아미노산 내지 약 15개의 아미노산을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및/또는 CM2는 2개 이상의 절단 부위를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, CM1은 하나의 프로테이스에 대해 2개 이상의 절단 부위를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, CM2는 2개 이상의 프로테이스에 대해 2개 이상의 절단 부위를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 제1 프로테이스 및 제2 프로테이스는 동일한 프로테이스이다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 동일한 프로테이스에 대해 상이한 기질을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CM1 및 CM2는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CM1은 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CM1은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, CM2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함한다. 소정의 양태에서, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CM1 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CM2를 포함한다. 일부 양태에서, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC는 서열번호 73의 아미노산 서열을 포함하는 CM1 및 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 CM2를 포함한다.

[0152] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC에 사용하기에 적합한 예시적인 CM은 당업계에 공지된 것들을 포함한다. 예시적인 CM은, 예를 들어, 표 4 및 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 공개 제WO 2009/025846호, 제WO 2010/081173호, 제WO 2015/013671호, 제WO 2015/048329호, 제WO 2015/116933호, 제WO 2016/014974호 및 제WO 2016/118629호에 기술되어 있는 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0153] 일부 양태에서, CM1 및/또는 CM2는 아래 표 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 소정의 양태에서, CM1 및 CM2는 각각 독립적으로 아래 표 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

표 4

절단성 모이어티

CM 서열번호	CM 서열
2	GLSGRSDDH
14	ISSGLLSGRSDQH
73	LSGRSDDH
74	ISSGLLSGRSDQH
75	LSGRSDNH
76	TSTSGRSANPRG
77	VHMPLGFLGP
78	AVGLLAPP
79	QNQALRMA
80	ISSGLLSS
81	ISSGLLSGRSDNH
82	LSGRSGNH
83	LSGRSDIH
84	LSGRSDQH
85	LSGRSDTH
86	LSGRSDYH
87	LSGRSDNP
88	LSGRSANP
89	LSGRSANI
90	LSGRSDNI
91	ISSGLLSGRSANPRG
92	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	ISSGLLSGRSDDH
95	ISSGLLSGRSDIH
96	ISSGLLSGRSDTH
97	ISSGLLSGRSDYH
98	ISSGLLSGRSDNP
99	ISSGLLSGRSANP
100	ISSGLLSGRSANI
101	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
107	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	ISSGLLSGRSDNI

[0154]

110	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	ISSGLLSGRSGNH
156	ALAHGLF
157	APRSALAHGLF
158	ISSGLLSGRSNI
159	LSGRSNI

[0155]

[0156] 본 개시내용의 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드(HBPC)의 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 MM과 CM 사이에 하나 이상의 링커를 포함한다. 일부 양태에서, MM1은 링커를 통해 CM1에 연결된다. 일부 양태에서, MM2는 링커를 통해 CM2에 연결된다. 일부 양태에서, MM1은 링커 L1을 통해 CM1에 연결되고, CM1은 링커 L2를 통해 항-CD3 scFv에 연결된다. 일부 양태에서, MM2는 링커 L3을 통해 CM2에 연결되고, CM2는 링커 L4를 통해 scFv에 연결된다. 일부 양태에서, L1, L2, L3 및/또는 L4의 아미노산 서열은 동일하다. 일부 양태에서, L1, L2, L3 및/또는 L4의 아미노산 서열은 상이하다.

[0157] 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 CM과 표적화 도메인 또는 이의 가변 도메인 사이에 링커를 포함한다. 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드(HBPC)에 사용하기에 적합한 링커는 일반적으로 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드(HBPC)의 유연성을 제공하여 활성화 가능한 폴리펩타이

드와 표적의 결합 저해를 용이하게 하는 것들이다. 이러한 링커는 일반적으로 가요성 링커로 지칭된다. 적합한 링커는 쉽게 선택될 수 있으며, 4개의 아미노산 내지 10개의 아미노산, 5개의 아미노산 내지 9개의 아미노산, 6개의 아미노산 내지 8개의 아미노산 또는 7개의 아미노산 내지 8개의 아미노산을 포함하여 1개의 아미노산(예를 들어, Gly) 내지 20개의 아미노산, 2개의 아미노산 내지 15개의 아미노산, 3개의 아미노산 내지 12개의 아미노산과 같은 임의의 적합한 다양한 길이일 수 있고, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0158] 예시적인 가요성 링커는 글리신 중합체(G)n, 글리신-세린 중합체(예를 들어, 각각 (GS)n, (GSGGS)n 및 (GGGS)n (서열번호 41 및 서열번호 40을 포함하며, 여기서 n은 적어도 하나의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 당업계에 공지된 기타 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 구조화되어 있지 않으므로, 구성요소 간의 중성 밧줄 역할을 할 수 있다. 글리신은 알라닌보다도 상당히 더 많은 파이-프사이(phi-psi) 공간에 접근하고, 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한적이다(문헌[Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)] 참조). 당업자는 활성화 가능한 폴리펩타이드의 디자인이 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있는 것을 인식할 것이며, 따라서 링커는 가요성 링커뿐만 아니라 목적하는 구조를 제공하기 위해 덜 가요성인 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다.

[0159] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(즉, HBPC)는 다음 위치 중 하나 이상에 링커를 포함할 수 있다: (a) MM1과 CM1 사이 및/또는 CM1과 scFv 사이(즉, scFv의 CM1과 중쇄 가변 도메인(VH1) 사이 또는 scFv의 CM1과 경쇄 가변 도메인(VL1) 사이); (b) MM2와 CM2 사이; (b) scFv의 중쇄와 경쇄 가변 도메인 사이; (c) 중쇄 가변 도메인과 CH1 도메인 사이; (d) CH1 도메인과 힌지 영역 사이; (e) 힌지 영역과 Fc 도메인 사이; (g) CM2와 경쇄 가변 도메인 사이; (h) 경쇄 가변 도메인과 CL 사이; (i) CH1 도메인과 제2 Fc 도메인 사이; (j) CH1 도메인과 힌지 영역 사이; 및/또는 (k) 힌지 영역과 제2 Fc 도메인 사이.

[0160] 일부 양태에서, 링커는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: (i) (GS)n(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGS)n(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGGS)n(서열번호 40)(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), (GGGGS)n(서열번호 126)(여기서, n은 적어도 1의 정수임), (GSGGS)n(서열번호 41)(여기서, n은 적어도 1의 정수이고, 일부 양태에서 n은 1 내지 10의 정수임), GSSGGSGGSG(서열번호 12), GGSG(서열번호 42), GGSGG(서열번호 43), GSGSG(서열번호 44), GSGGG(서열번호 45), GGGSG(서열번호 46) 및 GSSSG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGS(서열번호 48), GGGGSGS(서열번호 49), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 51), GGGGS(서열번호 52), GGGGSGGGGS(서열번호 53), GGGS(서열번호 54), GGGSGGGS(서열번호 55), GGGSGGGSGGGS(서열번호 56), GSSGGSGGSG(서열번호 57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 58), GGGSSGGS(서열번호 127) 및 GS로 이루어진 군으로부터 선택되는 글리신-세린 기반 링커; 및 (ii) 글리신 및 세린과, GSTSGSGKPGSSEGST(서열번호 59), SKYGPPCPPCPAPEFLG(서열번호 60), GGSLDPKGGGGS(서열번호 61), PKSCDKTHTCPPCPAPELLG(서열번호 62), GKSSGSGSESKS(서열번호 63), GSTSGSGKSSEGKG(서열번호 64), GSTSGSGKSSEGSGSTKG(서열번호 65) 및 GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 66)로 이루어진 군으로부터 선택되는 라이신, 트레오닌 또는 프롤린 중 적어도 하나를 포함하는 링커.

[0161] 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 위에 기재된 것 외에 구성요소를 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 스페이서를 포함할 수 있다. 용어 "스페이서"는 본 명세서에서 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드의 자유 말단에 혼입된 아미노산 잔기 또는 펩타이드를 지칭한다. 본 개시내용의 실시에 사용하기에 적합한 스페이서는 임의의 단일 아미노산 잔기 또는 임의의 펩타이드를 포함한다. 적합한 스페이서는, 예를 들어, 각각 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 공개 제WO 2016/014974호, 제WO 2019/075405호 및 제WO 2019/213444호에 기술되어 있는 임의의 것들을 포함한다.

[0162] 일부 양태에서, 스페이서는 약 1개의 아미노산 내지 약 10개의 아미노산(예를 들어, 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 9개의 아미노산) 또는 그 사이에 있는 임의의 수를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 일부 양태에서, 스페이서는 MM1 및/또는 MM2에 대해 N-말단에 위치한다. 일부 양태에서, 스페이서는 QGQSGS(서열번호 116)의 서열을 갖는다. 일부 양태에서, 스페이서는 QGQSGQG(서열번호 117)의 서열을 갖는다. 일부 양태에서, 스페이서는 QGQSGS(서열번호 118)의 서열을 갖는다. 일부 양태에서, 스페이서는 QGQSGQG(서열번호 119)의 서열을 갖는다.

[0163] 일부 양태에서, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 제1 및 제2 Fc 도메인(각각 Fc1 및 Fc2)은 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인(예를 들어, 인간 IgG1 Fc 도메인 또는 인

간 IgG4 Fc 도메인) 또는 이들의 변이체이다. 일부 양태에서, Fc1 및/또는 Fc2는 천연(예를 들어, 인간) IgG1 Fc 도메인의 변형된 변이체이다. 일부 양태에서, Fc1 및/또는 Fc2는 천연(예를 들어, 인간) IgG4 Fc 도메인의 변형된 변이체이다.

[0164] 본 개시내용의 일부 양태에서, Fc1 및/또는 Fc2로 이용되는 Fc 도메인은 천연 Fc 아미노산 서열의 돌연변이된 형태이다. 돌연변이는 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드(및 상응하게는, 활성화된 HBPC)에 목적하는 유익한 특성을 부여할 수 있다. 예를 들어, FcRn 결합 부위의 소정의 돌연변이는 효과기 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Petkova et al., Intl. Immunol. 18:1759-1769, 2006; Deng et al., MAbs 4:101-109, 2012; 및 Olafson et al., Methods Mol. Biol. 907:537-556, 2012] 참조). 효과기 기능을 조절할 수 있는 Fc 도메인에 임의의 알려진 돌연변이를 포함시키는 것이 적합하다. 예를 들어, Fc 아미노산 서열의 N297A 또는 N297G 돌연변이가 표적 독립적 독성을 감소시킬 수 있는 IgG 효과기 기능(예를 들어, ADCC 및 CDC)을 감소시키기 위해 이용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lund et al., Mol. Immunol. 29:35-39, 1992] 참조). 본 개시내용의 맥락에서 사용하기에 적합한 Fc 도메인은 임의의 알려진 이종이량체 Fc(예를 들어, 놉-인-홀(knob-in-hole) 등)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 Fc 도메인을 포함한다.

[0165] 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 면역글로불린 힌지 영역을 추가로 포함한다. 적합한 힌지 영역은 당업계에 공지된 임의의 힌지 영역을 포함한다. 예를 들어, 임의의 5가지 주요 클래스의 면역글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 또는 이의 서브클래스(아이소형)(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)로부터의 힌지 영역이 본 개시내용에 사용하기에 적합하다. 다양한 클래스의 면역글로불린은 상이하고, 잘 알려진 서브유닛 구조 및 3차원 구성을 갖고 있다.

[0166] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 일부 양태에서, Fc1은 서열번호 23(선택적으로 C-말단 라이신을 가짐(즉, 서열번호 24))과 적어도 90% 동일한, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0167] 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 Fc1에 결합하는 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, Fc2는 서열번호 28과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, Fc2는 서열번호 28(선택적으로 말단 라이신을 가짐(즉, 서열번호 29))을 포함한다.

[0168] 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 서열번호 34 및 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역을 포함한다.

[0169] 본 명세서의 다른 곳에 제공된 바와 같이, 본 명세서에 개시된 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 형식 또는 구조는 링커 및 스페이서를 포함하여 임의의 다수의 선택적 추가적인 구성요소를 포함할 수 있다. 단지 예로서, 아래에 제시된 구조는 상정되는 양태 중 하나이다. 그러나, 아래에 나타낸 양태는 어떤 방식으로든 본 개시내용을 제한하는 것을 의미하지 않는다.

[0170] 일부 양태에서, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 하기 구조 (I)을 갖는 제1 폴리펩타이드를 포함한다.

[0171] 제1 폴리펩타이드 구조 (I):

[0172] (S1) - MM1 -(L1) - CM1 - L2 - VH1 - L3 - VL1 -(L4) - VH2 -(L5) -(CH11) -(L6) -(힌지1) -(L7) - Fc1,

[0173] 구조 중,

[0174] • (S1)은 선택적 스페이서이고;

[0175] • MM1은 제1 표적화 도메인에 대한 마스킹 모이어티이고,

[0176] • (L1), (L4), (L5), (L6) 및 (L7)은 각각 독립적으로 선택적 링커이고,

[0177] • L2 및 L3은 링커이고,

[0178] • (CH11)은 선택적 CH1 도메인이고,

[0179] • (힌지1)은 선택적 힌지 영역이고, 그리고

[0180] • Fc1은 위에 기재된 바와 같다.

[0181] 일부 양태에서, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 하기 구조 (II)를 갖는 제2 폴리펩타이드를 포함한다.

[0182] 제2 폴리펩타이드 구조 (II):

[0183] (S2) - (L8) - MM2 - (L9) - CM2 -(L10) - VL2 - (CL)

[0184] 구조 중,

[0185] • (S2)은 선택적 스페이서이고,

[0186] • (L8), (L9) 및 (L10)은 각각 독립적으로 선택적 링커이고,

[0187] • MM2는 제2 표적화 도메인에 대한 마스킹 모이어티이고, 그리고

[0188] • VL2는 위에 기재된 바와 같고; 그리고

[0189] • (CL)은 선택적 경쇄 불변 도메인이다.

[0190] 일부 양태에서, 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체는 하기 구조 (III)을 갖는 제3 폴리펩타이드를 포함한다.

[0191] 제3 폴리펩타이드 구조 (III):

[0192] (S3) - (CH12) - (L11) - (힌지2) - (L12) - Fc2

[0193] 구조 중,

[0194] • (S3)은 선택적 스페이서이고,

[0195] • (CH12)은 선택적 CH1 도메인이고,

[0196] • (L11) 및 (L12)는 각각 독립적으로 선택적 링커이고, 그리고

[0197] • Fc2는 위에 기재된 바와 같다.

[0198] 구조 (I), (II) 및 (III)에 사용하기에 적합한 링커, 스페이서, MM, CM, Fc 도메인, CH1(즉, CH11 및 CH12) 도메인, 힌지 영역 및 CL은 당업계에 공지되어 있거나 본 명세서에 기재되어 있는 임의의 것을 포함한다.

[0199] 본 개시내용의 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC는 (a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, VH1과 VL1은 함께 T 세포 항원 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 T 세포 항원 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제1 마스킹 모이어티(MM1), (iii) 제1 절단성 모이어티(CM1); (iv) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2), (v) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1), (vi) 중쇄 CH1 도메인 및 (vii) CH1 도메인과 Fc1 사이의 제1 면역글로불린 힌지 영역(HR1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) (i) 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, VH2와 VL2는 함께 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 암세포 표면 항원 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 마스킹 모이어티(MM2), (iii) 제2 절단성 모이어티(CM2) 및 (iv) 경쇄 불변 도메인 CL1을 포함하는, 제2 폴리펩타이드; 및 (c) (i) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2) 및 면역글로불린 힌지 영역을 포함하고 (ii) 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드를 포함한다.

[0200] 소정의 양태에서, 제1 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, 다음의 구조적 배열을 포함하고,

[0201] MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1;

[0202] 제2 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, 다음의 구조적 배열을 포함하고,

[0203] MM2-CM2-VL2-CL1;

[0204] 제3 폴리펩타이드는, 아미노 말단에서 카복시 말단으로, HR2-Fc2의 구조적 배열을 갖고, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접(예를 들어, 링커를 통한) 연결이다. 일부 양태에서, 제3 폴리펩타이드는 HR2-Fc2로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지되, 여기서 각각의 "-"는 독립적으로 직접 또는 간접(예를 들어, 링커를 통한) 연결이다.

[0205] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 HR1 및 제2 폴리펩타이드 HR2는 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드 HR1 및 제2 폴리펩타이드 HR2는 상이한 아미노산 서열을 포함한다.

[0206] 본 개시내용은 또한 (a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, VH1과 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (iii) 및 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)을 포함하는 제2 폴리펩타이드(여기서, VH2와 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함); 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하는 제3 폴리펩타이드(여기서, 제3 폴리펩타이드는 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않음)를 포함하는 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(예를 들어, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 HBPC 구성요소)를 제공한다. 일부 양태에서, 위에 기술된 HBPC 작제물은 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 "활성화"에 의해 생성될 수 있다. 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC에 적합한 것으로 본 명세서에 기재된 임의의 VH1, VL1(및 scFv), VH2, VL2, Fc1, Fc2 및 선택적 링커, HR1, HR2 및 CH1 구성요소는 위에 기술된 HBPC 작제물에 적합하다. HBPC의 3개의 폴리펩타이드는 다음 요소를 포함하는 구조를 갖는다: (a) (i) 제1 중쇄 가변 도메인(VH1) 및 제1 경쇄 가변 도메인(VL1)을 포함하는 단쇄 가변 단편(scFv)(여기서, VH1과 VL1은 함께 제1 표적에 특이적으로 결합하는 제1 표적화 도메인을 형성함), (ii) 제2 중쇄 가변 도메인(VH2) 및 (iii) 제1 단량체 Fc 도메인(Fc1)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드; (b) 제2 경쇄 가변 도메인(VL2)(여기서, VH2와 VL2는 함께 제2 표적에 특이적으로 결합하는 제2 표적화 도메인을 형성함)을 포함하는 제2 폴리펩타이드; 및 (c) 제2 단량체 Fc 도메인(Fc2)을 포함하고 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는 제3 폴리펩타이드.

[0207] **키트**

[0208] 본 명세서에 기재된 바와 같은 활성화 가능한 HBPC 또는 이의 HBPC 중 하나 이상을 포함하는 키트가 본 명세서에 제공되되, 키트는 진단 또는 치료용이다. 소정의 양태에서, 본 명세서에 제공된 하나 이상의 활성화 가능한 HBPC 또는 이의 항원 결합 단편과 같은 본 명세서에 기재된 조성물의 성분 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기 및 선택적인 사용 지침을 포함하는 팩 또는 키트가 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 조성물 및 본 명세서에 기재된 것들과 같은 임의의 진단용, 예방용 또는 치료용 작용제를 포함한다.

[0209] **치료 용도 및 방법**

[0210] 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 HBPC 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환, 예를 들어, 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제시된다. 일부 양태에서, 활성화 가능한 HBPC, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 HBPC 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 성장의 저해를 필요로 하는 대상체에서 종양 성장을 저해하는 방법이 본 명세서에 제시된다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 약제로서 사용하기 위한 활성화 가능한 HBPC, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 HBPC 또는 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물에 관한 것이다. 일반적으로, 대상체는 인간이지만, 트랜스제닉 포유동물을 포함하는 비인간 포유동물도 치료될 수 있다.

[0211] 병태의 치료에 효과적일 활성화 가능한 HBPC 또는 이의 HBPC 또는 이의 조성물의 양은 질환의 성질에 따라 달라질 것이다. 조성물에 이용되는 정확한 용량도 투여 경로 및 질환의 심각도에 따라 달라질 것이다.

[0212] 질환의 비제한적인 예는 암, 류마티스성 관절염, 크론병, SLE, 심혈관 손상, 허혈 등을 포함한다. 예를 들어, 적응증은 T 세포 급성 림프아구성 백혈병(T-ALL)을 포함하는 백혈병, 다발성 골수종을 포함하는 림프아구성 질환 및 폐, 결장직장, 전립선, 췌장 및 유방(삼중 음성 유방암을 포함)을 포함한 고형 종양을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적응증은 원발성 종양 기원에 관계없이 뼈 질환 또는 암의 전이; 비제한적인 예로서, ER/PR+ 유방암, Her2+ 유방암, 삼중 음성 유방암을 포함하는 유방암; 결장직장암; 자궁내막암; 위암; 교아세포종; 두경부 편평 세포암과 같은 두경부암; 식도암; 비제한적인 예로서, 비소세포 폐암과 같은 폐암; 다발성 골수종 난소암; 췌장암; 전립선암; 골육종과 같은 육아종; 비제한적인 예로서, 신세포 암종과 같은 신암; 및/또는 비제한적

인 예로서, 편평 세포암, 기저 세포 암종 또는 흑색종과 같은 피부암을 포함할 수 있다.

[0213] **폴리뉴클레오타이드**

[0214] 일부 양태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC 및 HBPC 작제물의 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드를 각각 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드(상응하여 본 명세서에서 "제1 폴리뉴클레오타이드" "제2 폴리뉴클레오타이드" 및 "제3 폴리뉴클레오타이드"로 지칭됨)가 본 명세서에 제공된다. 적합한 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드 중 임의의 것을 암호화하는 임의의 것 또는 이의 일부를 포함한다. 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 예시적인 세트가 본 명세서에서 아래에 제공된다.

[0215] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 코돈/RNA 최적화, 이종성 신호 서열로의 대체 및 mRNA 불안정 요소의 제거에 의해 발현을 위해 선택된 숙주 유기체로부터의 최적의 생산을 위해 최적화된 서열일 수 있다. 따라서, 코돈 변화(예를 들어, 유전자 코드의 축퇴로 인한 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈의 변화)를 도입하고/하거나 mRNA의 저해 영역을 제거함으로써 재조합 발현을 위해 활성화 가능한 HBPC 또는 이의 HBPC를 암호화하는 최적화된 핵산을 생성하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,965,726호; 제6,174,666호; 제6,291,664호; 제6,414,132호; 및 제6,794,498호에 기술되어 있는 최적화 방법을 적합화시켜 수행될 수 있다.

[0216] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 당업계에 잘 알려진 방법(예를 들어, PCR 및 기타 분자 클로닝 방법)을 사용하여 적합한 공급원(예를 들어, 하이브리도마)으로부터의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 예를 들어, 공지된 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화 가능한 합성 프라이머를 사용하는 PCR 증폭이 관심 항체를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 얻은 게놈 DNA를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 PCR 증폭 방법은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및/또는 중쇄를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 얻는 데 사용될 수 있다. 이러한 PCR 증폭 방법은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 가변 경쇄 영역 및/또는 가변 중쇄 영역을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 얻는 데 사용될 수 있다. 증폭된 핵산은, 예를 들어, 키메라 및 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기 위하여 숙주 세포에서의 발현을 위해 그리고 추가 클로닝을 위해 벡터로 클로닝될 수 있다.

[0217] 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하고, DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥인 경우, DNA는 코딩 가닥 또는 논코딩(안티센스) 가닥일 수 있다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 내인성 인트론이 하나 더 결실되어 있는 cDNA 또는 DNA이다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 비자연 발생적 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합적으로 생산된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 순수하다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 천연 성분으로부터 정제된다.

[0218] **벡터, 숙주 세포 및 생산 방법**

[0219] 본 개시내용의 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(각각 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및 제3 폴리뉴클레오타이드에 상응함)를 포함하는 하나 이상의 벡터가 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 이러한 벡터는 본 명세서에서 아래에 더 자세히 설명되는 바와 같이 숙주 세포로부터 활성화 가능한 HBPC(또는 HBPC)의 폴리펩타이드를 재조합적으로 생산하는 데 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 벡터는 하나 이상의 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 제1, 제2 및/또는 제3 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 소정의 양태에서, 본 개시내용은 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(즉, 제1, 제2 및 제3 폴리뉴클레오타이드)를 집합적으로 포함하는 복수의 벡터를 제공하며, 여기서 복수는 제1, 제2 및 제3 폴리뉴클레오타이드 중 2개 이하 또는 1개 이하를 포함하는 적어도 하나의 벡터를 포함한다. 이들 양태에서, 복수의 벡터 내의 제1, 제2 및 제3 폴리뉴클레오타이드 서열은 일반적으로 하나 이상의 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0220] 또한, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC 또는 HBPC의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 재조합적으로 발현시키기 위한 임의의 위에 기술된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 다양한 숙주 발현 벡터 시스템이 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,807,715호 참조). 이러한 숙주 발현 시스템은 관심 코딩 서열이 생산되고 후속적으로 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환되거나 형질감염될 때 현장에서(*in situ*) 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 위에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 대한 재조합 발현 숙주로서 사용하기에 적합한 예시적인 숙

주 세포는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS(예를 들어, COS1 또는 COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa 및 NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 세포 등)을 포함한다. 재조합 포유동물 숙주 세포의 구축에 사용되는 벡터는 포유동물 세포의 게놈(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래된 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 재조합 숙주 세포는 CHO 세포 또는 NS0 세포이다.

[0221] 일부 양태에서, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드, 예를 들어, 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드의 재조합 발현은 제1, 제2 및/또는 제3 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터의 구축을 포함한다. 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC 또는 HBPC를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(들)는 당업계에 잘 알려진 기법을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 쉽게 생성될 수 있다. 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드, 예를 들어, 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 포함하는 발현 벡터 구축하는 데 당업자에게 잘 알려진 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 또한, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터가 제공된다. 이러한 벡터는, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드, 예를 들어, 제1, 제2 및/또는 제3 폴리펩타이드의 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고(예를 들어, 국제 공개 제WO 86/05807호 및 제WO 89/01036호; 및 미국 특허 제5,122,464호 참조), 폴리펩타이드의 가변 도메인은 전체 VH, 전체 VL 또는 전체 VH와 VL 둘 다의 발현을 위해 이러한 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0222] 발현 벡터는 종래의 기법에 의해 세포(예를 들어, 숙주 세포)에 전달될 수 있고, 생성된 세포는 이어서 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC 또는 HBPC를 생산하기 위해 종래의 기법에 의해 배양될 수 있다. 따라서, 숙주 세포에서 이러한 서열의 발현을 위한 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 명세서에 기재된 HBPC를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 일부 양태에서, 숙주 세포는 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC 또는 HBPC 또는 이의 도메인을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 숙주 세포는 3개의 상이한 벡터를 포함하며, 제1 벡터는 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 벡터는 본 명세서에 기재된 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제3 벡터는 제3 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0223] 일부 양태에서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 집합적으로 포함하는 벡터 집단이 본 명세서에 제공되되, 각 벡터는 제1, 제2 또는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 단지 1개 또는 2개만을 포함한다. 소정의 양태에서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(즉, 각각 제1, 제2 및 제3 폴리뉴클레오타이드)를 포함하는 단일 벡터가 본 명세서에 제공된다.

[0224] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (a) 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 폴리뉴클레오타이드 및/또는 제3 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 전술한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터(들))를 포함하는 숙주 세포를 활성화 가능한 HBPC를 생산하기에 충분한 조건하에 액체 배양 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) 활성화 가능한 HBPC를 회수하는 단계를 포함하는, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC를 생산하는 방법을 제공한다.

[0225] 특정 양태에서, 숙주 세포에서 이의 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 발현시키는 단계를 포함하는, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 보다 구체적으로, (a) 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 활성화 가능한 HBPC를 생산하기에 충분한 조건하에 액체 배양 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) 활성화 가능한 HBPC를 회수하는 단계를 포함하는, 활성화 가능한 HBPC를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 방법은 활성화 가능한 HBPC를 포함하는 수성 조성물을, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 등과 같은 단위 작업에 적용시키는 단계를 포함하는 활성화 가능한 HBPC 또는 다른 공정중(in-process) 조성물의 생물수확물(bioharvest)(무세포 발현 산물)을 정제하는 단계를 더 포함한다. 소정의 양태에서, 단위 작업은 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피이다.

[0226] 추가의 양태에서, 숙주 세포에서 이의 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드를 발현시키는 단계를 포함하는, 본 개시내용의 HBPC를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 보다 구체적으로, (a) 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호

화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 HBPC를 생산하기에 충분한 조건하에 액체 배양 배지에서 배양하는 단계; 및 (b) HBPC를 회수하는 단계를 포함하는, 본 개시내용의 HBPC를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 방법은 활성화 가능한 HBPC를 포함하는 수성 조성물을, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 등과 같은 단위 작업에 적용시키는 단계를 포함하는 HBPC 또는 다른 공정중 조성물의 생물수확물(무세포 발현 산물)을 정제하는 단계를 더 포함한다. 소정의 양태에서, 단위 작업은 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피이다.

[0227] **조성물**

[0228] 일부 양태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC 또는 이의 HBPC는 본 명세서에 개시된 임의의 치료적 적요에 유용한 약제학적 조성물에 이용될 수 있다. 소정의 양태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체와 함께 치료학적 유효량의 하나 이상의 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 다른 양태에서, 약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 하나 이상의 활성화 가능한 HBPC, 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 방부제 및/또는 보조제를 포함한다. 허용 가능한 제형 물질은 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 약제학적 조성물은 액체, 냉동 또는 동결건조된 조성물로서 제형화될 수 있다.

[0229] 소정의 양태에서, 약제학적 조성물은, 예를 들어, 조성물의 pH, 오스몰 농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 해리 또는 방출 속도, 흡착 또는 침투를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형 물질을 포함할 수 있다. 적합한 제형 물질은 아미노산; 항균제; 항산화제; 완충액; 증량제; 킬레이트제; 착화제; 충전제; 단당류 또는 이당류와 같은 탄수화물; 단백질; 착색제, 향미제, 희석제; 유화제; 친수성 중합체; 저분자량 폴리펩타이드; 염 형성 반대이온(예컨대, 소듐); 방부제; 용매(예컨대, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올; 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제; 안정성 강화제; 긴장성 강화제; 전달 비히클; 및/또는 약제학적 보조제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적 조성물에 혼입될 수 있는 적합한 작용제에 대한 추가적인 세부사항 및 옵션은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Loyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); 및 Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)]에 제공되어 있다.

[0230] 약제학적 조성물의 성분은, 예를 들어, 의도된 투여 경로, 전달 형식 및 목적하는 투여량에 따라 선택된다. 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Loyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013)]을 참조한다. 조성물은 개시된 항원 결합 단백질의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 제거 속도에 영향을 미치도록 선택된다. 약제학적 조성물의 1차 비히클 또는 담체는 본질적으로 수성 또는 비수성일 수 있다. 예를 들어, 적합한 비히클 또는 담체는 주사용수 또는 생리 식염수 용액일 수 있다. 소정의 양태에서, 항원 결합 단백질 조성물은 목적하는 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결건조된 케이크 또는 수성 용액 형태의 선택적 제형화제와 혼합함으로써 보관용으로 제조될 수 있다. 또한, 소정의 양태에서, 항원 결합 단백질은 적절한 부형제를 사용하여 동결건조물로 제형화될 수 있다.

[0231] 소정의 제형에서, 활성화 가능한 HBPC 농도는 적어도 2 mg/mℓ, 5 mg/mℓ, 10 mg/mℓ, 20 mg/mℓ, 30 mg/mℓ, 40 mg/mℓ, 50 mg/mℓ, 60 mg/mℓ, 70 mg/mℓ, 80 mg/mℓ, 90 mg/mℓ, 100 mg/mℓ, 110 mg/mℓ, 120 mg/mℓ, 130 mg/mℓ, 140 mg/mℓ 또는 150 mg/mℓ이다. 다른 제형에서, 활성화 가능한 HBPC는 10 mg/mℓ 내지 20 mg/mℓ, 20 mg/mℓ 내지 40 mg/mℓ, 40 mg/mℓ 내지 60 mg/mℓ, 60 mg/mℓ 내지 80 mg/mℓ 또는 80 mg/mℓ 내지 100 mg/mℓ의 농도를 갖는다.

[0232] 일부 조성물은 완충액 또는 pH 조정제를 포함한다. 대표적인 완충액은 유기산염(예컨대, 염 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타타르산, 석신산 또는 프탈산의 염); Tris; 인산 완충액; 및 일부 예에서 아래에 기재된 바와 같은 아미노산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 소정의 양태에서, 완충액은 조성물을 생리학적 pH 또는 약간 더 낮은 pH, 전형적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 유지하는 데 사용된다. 일부 조성물은 약 5 내지 6, 6 내지 7 또는 7 내지 8의 pH를 갖는다. 다른 양태에서, pH는 5.5 내지 6.5, 6.5 내지 7.5 또는 7.5 내지 8.5이다.

[0233] 유리 아미노산 또는 단백질은 일부 조성물에서 증량제, 안정화제 및/또는 항산화제로서 사용된다. 예로서, 라이신, 프롤린, 세린 및 알라닌이 제형에서 단백질을 안정화시키는 데 사용될 수 있다. 글리신은 올바른 케이크 구조 및 특성을 보장하기 위한 동결건조에 유용하다. 아르기닌은 액체 및 동결건조된 제형 둘 다에서 단백질 응집

을 저해하는 데 유용할 수 있다. 메티오닌은 항산화제로서 유용하다. 일부 양태에서는 글루타민 및 아스파라긴이 포함되어 있다. 아미노산은 완충 능력 때문에 일부 제형에 포함된다. 이러한 아미노산은, 예를 들어, 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 소정의 제형은 혈청 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA) 및 재조합 인간 알부민(rHA)), 젤라틴, 카세인 등과 같은 단백질 부형제도 포함한다.

[0234] 일부 조성물은 폴리올을 포함한다. 폴리올은 당(예를 들어, 만니톨, 수크로스, 트레할로스 및 소르비톨) 및, 예를 들어, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 다가 알코올 및 관련 물질을 포함한다. 폴리올은 코스모트로픽(kosmotropic)이다. 이는 물리적 및 화학적 분해 과정으로부터 단백질을 보호하기 위해 액체 및 동결건조된 제형 둘 다에서 유용한 안정화제이다. 폴리올은 또한 제형의 긴장성을 조정하는 데 유용하다.

[0235] 소정의 조성물은 안정화제로서 만니톨을 포함한다. 이는 일반적으로 동결건조보호제, 예를 들어, 수크로스와 함께 사용된다. 소르비톨 및 수크로스는 긴장성을 조정하며, 운송 중 동결-해동 스트레스로부터 보호하기 위한 안정화제로서 또는 제조 과정 중 벌크 제품의 제제로서 유용하다. PEG는 단백질을 안정화시키며 동결보호제로서 유용하고, 이와 관련하여 본 개시내용에서 사용될 수 있다.

[0236] 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당을 포함하는 당; 유도체화된 당 예컨대, 알디톨, 알돈산, 에스터화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체가 일부 제형에 포함될 수 있다. 예를 들어, 적합한 탄수화물 부형제는 단당류, 예컨대, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 그루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예컨대, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예컨대, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨), 미오이노시톨 등을 포함한다.

[0237] 계면활성제가 소정의 제형에 포함될 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 표면에 대한 단백질 흡착과 공기-액체, 고체-액체 및 액체-액체 계면에서의 후속 응집을 방지, 최소화 또는 감소시키고 단백질 형태 안정성을 제어하는 데 사용된다. 적합한 계면활성제는, 예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 소르비탄 에스터의 기타 지방산 에스터, Triton 계면활성제, 레시틴, 틸록사폴 및 폴록사머 188을 포함한다.

[0238] 일부 양태에서, 하나 이상의 항산화제가 약제학적 조성물에 포함된다. 항산화제 부형제는 단백질의 산화적 분해를 방지하는 데 사용될 수 있다. 환원제, 산소/유리 라디칼 제거제 및 킬레이트제는 이와 관련하여 유용한 항산화제이다. 항산화제는 전형적으로 수용성이며, 제품의 유통 기한 동안 활성을 유지한다. EDTA는 또 다른 유용한 항산화제이다.

[0239] 소정의 제형은 단백질 보조인자이며 단백질 배위 복합체를 형성하는 데 필요한 금속 이온을 포함한다. 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 일부 과정을 저해할 수 있다. 예를 들어, 마그네슘 이온(10mM 내지 120mM)은 아스파르트산이 아이소아스파르트산으로 이성질체화되는 것을 저해하는 데 사용될 수 있다.

[0240] 긴장성 강화제가 또한 소정의 제형에 포함될 수 있다. 이러한 작용제의 예는 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 소듐 또는 포타슘 클로라이드, 만니톨 및 소르비톨을 포함한다.

[0241] 하나 이상의 방부제가 소정의 제형에 포함될 수 있다. 방부제는 동일한 용기로부터 1회 초과의 추출을 포함하는 다회 투여 비경구 제형을 개발할 때 필요하다. 이들의 주요 기능은 미생물 성장을 저해하고 의약품의 유통 기한 또는 사용 기간 전반에 걸쳐 제품의 무균성을 보장하는 것이다. 적합한 방부제는 수성 희석제 중 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐수은 나이트라이트, 페녹시에탄올, 페닐 알코올, 폼알데하이드, 클로로뷰탄올, 마그네슘 클로라이드(예를 들어, 헥사하이드레이트), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 뷰틸 등), 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 소듐 데하이드로아세테이트, 티메로살, 벤조산, 살리실산, 클로르헥시딘 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0242] 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 정맥내(IV), 피내, 흡입, 경피, 국소, 경점막 및 직장 투여이다.

[0243] 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 피하, 안구내, 복강내, 근육내)에 적합한 제형 성분은 멸균 희석제, 예컨대, 주사용수, 식염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항미생물제, 예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트; 킬레이트제, 예컨대, EDTA; 완충액, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 및 긴장성 조절을 위한 작용

제, 예컨대, 소듐 클로라이드 또는 덱스트로스를 포함한다.

[0244] 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리학적 식염수, 정균수, Cremophor EL™(BASF, 뉴저지주 파시패니 소재) 또는 인산 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 담체는 제조 조건하에서 안정적이어야 하며 미생물에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 적합한 이들의 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0245] 형태의 전달에 따른 적절한 제형에 대한 추가 지침은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Loyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013)]에 제공되어 있다.

[0246] 약제학적 제형은 멸균될 수 있다. 멸균은 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결 건조되는 경우, 필터 멸균은 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 수행될 수 있다.

[0247] 실시예 7 및 실시예 8에서 입증된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC는 상대적으로 고농도에서도 상대적으로 응집 저항성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 또 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 활성화 가능한 HBPC와 물을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되되, 활성화 가능한 HBPC는 적어도 1 ㎎/㎖의 농도로 존재하고, 조성물은 적어도 95%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 96%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 97%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 98%의 단량체 활성화 가능한 HBPC 또는 적어도 약 99%의 단량체 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단량체 활성화 가능한 HBPC"는 비응집 형태의 활성화 가능한 HBPC를 지칭한다. 소정의 이들 양태에서, 조성물은 적어도 약 2 ㎎/㎖이고, 적어도 95%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 96%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 97%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 98%의 단량체 활성화 가능한 HBPC 또는 적어도 약 99%의 단량체 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 일부 양태에서, 조성물은 적어도 약 3 ㎎/㎖이고, 적어도 95%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 96%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 97%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 98%의 단량체 활성화 가능한 HBPC 또는 적어도 약 99%의 단량체 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 일부 양태에서, 조성물은 적어도 약 4 ㎎/㎖이고, 적어도 95%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 96%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 97%의 단량체 활성화 가능한 HBPC, 또는 적어도 약 98%의 단량체 활성화 가능한 HBPC 또는 적어도 약 99%의 단량체 활성화 가능한 HBPC를 포함한다. 단량체 활성화 가능한 HBPC의 백분율은, 예를 들어, 실시예 7에 예시된 바와 같이 크기 배제(SE)-HPLC에 의해 쉽게 결정될 수 있되, 단량체 활성화 가능한 HBPC의 퍼센트는 총 피크 영역을 기준으로 단량체 활성화 가능한 HBPC에 해당하는 피크 영역 백분율로 결정된다.

[0248] **실시예**

[0249] 본 실시예 부문의 예는 예시로서 제공되는 것으로 제한하는 방식으로 제공되는 것은 아니다.

[0250] ***실시예 1: 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드의 구축 및 발현***

[0251] 도 1에 도시된 구조를 갖는 2개의 예시적인 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체(HBPC)인 복합체-57 및 복합체-67을 제조하였다. 이러한 활성화 가능한 HBPC 작제물 각각은 도 1에 도시된 바와 같은 3개의 폴리펩타이드를 갖고 있다. 각각의 경우에 scFv는 항-CD3ε였고, 각각의 경우에 제2 표적화 도메인(즉, VH2 및 VL2)은 EGFR을 표적화한다. 각 작제물의 EGFR 표적화 도메인은 동일하였지만, CD3ε 표적화 도메인은 상이하였다.

[0252] 복합체-67의 구성요소는 표 5A 내지 표 5C에 나열되어 있고, 작제물 복합체-57의 구성요소는 표 6A 내지 표 6C에 나열되어 있다.

표 5

[표 5A]

복합체-67 제 1 폴리펩타이드

명칭	제 1 폴리펩타이드				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1[Δ]
제 1 폴리펩타이드 서열번호 30[*,++]	ML15 서열번호 1	0011 서열번호 73	i2C 서열번호 11	C225v5 서열번호 21	서열번호 23

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 112(말단 라이신은 유전자의 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존재하지 않음) 또는 서열번호 139 임.

++N-말단 스페이서(서열번호 33)를 포함함.

ΔFc1 은 CH1(서열번호 26)-힌지(서열번호 34) 서열의 C-말단에 위치함.

[0253]

[표 5B]

복합체-67 제 2 폴리펩타이드

명칭	제 2 폴리펩타이드			
	MM2	CM2	VL2	불변 경쇄(CL)
제 2 폴리펩타이드 서열번호 31[*,++]	CF41 서열번호 13	2008 서열번호 14	C225v5 서열번호 22	CL 서열번호 25

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 113 또는 대안적으로 서열번호 115 임.

++N-말단 스페이서(서열번호 117)를 포함함.

[0254]

[표 5C]

복합체-67 제 3 폴리펩타이드 성분

명칭	제 3 폴리펩타이드
	Fc2
제 3 폴리펩타이드 서열번호 32[*,++]	서열번호 28

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 114(말단 라이신은 유전자의 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존재하지 않음) 또는 서열번호 141 임.

++Fc2 의 N-말단에 위치한 힌지(서열번호 35)를 포함함.

[0255]

[0256] 복합체-67을 암호화하는 아미노산 및 폴리뉴클레오타이드 서열이 아래에 제공된다. 폴리펩타이드 서열의 구성요소는 다음과 같이 표시된다: 스페이서 서열은 괄호 안에 있고, 마스크 서열은 밑줄이 그어져 있고, 링커는 굵은 글씨로 되어 있고, 기질(즉, 절단성 모이어티)은 이탤릭체로 되어 있고, CD3 결합제는 이탤릭체로 밑줄이 그어져 있다.

[0257] **제1 폴리펩타이드**

[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVESGGGLVQ*
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD
*SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGG***
***GGS**QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG*
*TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL**GGGGS**QVQLKQ
SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS
RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호 30), 선택적으로 C-말단 라이신
을 가짐(즉, 서열번호 137).

[0258]

[0259] 일부 양태에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 120의 아미노산 서열(스페이서는 없지만 C-말단 라이신이 있음) 또는 C-말단 라이신이 없는 서열번호 120의 아미노산 서열을 갖고 있다.

[0260] 아래 도시된 제2 폴리펩타이드에서, 스페이서 서열은 괄호 안에 있고, 마스크 서열은 밑줄이 그어져 있고, 링커는 굵은 글씨로 되어 있고, 기질(즉, 절단성 모이어티)은 이탤릭체로 되어 있다.

[0261] **제2 폴리펩타이드**

[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQH***GGGS**QILLTQSPVIL
SVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLS
INSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 31).

[0262]

[0263] 아래 도시된 제3 폴리펩타이드에서, 힌지 영역 굵은 글씨로 밑줄이 그어져 있고, 서열의 나머지 부분은 Fc2이다.

[0264] **제3 폴리펩타이드**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPP
VLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호
32), 선택적으로 C-말단 라이신을 가짐(서열번호 36).

[0265]

[0266] **핵산**

[0267] 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 112)

CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCCATGCACAC
CTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGAT
CCGATGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGAC
TGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT
CAACAAATACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATG
GGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACAG
CGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCT

[0268]

GCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCA
CGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC
ACTGGTCACAGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG
CGGAGGTTCTCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGC
GGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAAC
TACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGC
GGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCG
GAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGT
ACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGC
TGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCG
GACTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAG
CCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAGGGACTCGA
ATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCCATTCAC
CAGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGAT
GAACTCCCTGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACC
TACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGTCTG
CTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTAC
ATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCA
GTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACACATTTCCAG
CCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAG
CAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT
GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTG
GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGAC
GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGC
ACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC
AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCT
CCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAG

[0269]

GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAG
AACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGT
ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT
GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCT
GAGCCCCGGCAAA

[0270]

[0271] 이러한 예시적인 폴리뉴클레오타이드의 변이에서, C-말단 라이신을 암호화하는 코돈은 없을 수 있다(즉, 서열번호 139).

[0272] **제2 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 113)**

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGAATAGAGAA
CAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGT
CCGGCAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTC
CTGTCATACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAG
TCAGTCTATTGGGACTAACATACACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCC
GCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTT
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGC
GAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACTGGCCGACCACCTTTG
GCGCGGGCACCAAACTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0273]

[0274] 복합체-67의 제2 폴리펩타이드도 서열번호 115의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된다.

[0275] **제3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(서열번호 114)**

GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTT
CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTT
CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGA
GGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA
GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCC
TGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCA
GGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC
AATGGACAGCCCGAGAACAACTACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGAC
GGCTCATTCTTCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAG
GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAA

[0276]

[0277] 이러한 예시적인 폴리뉴클레오타이드의 변이에서, C-말단 라이신을 암호화하는 코돈은 없을 수 있다(즉, 서열번호 141).

[0278] 서열번호 38의 아미노산 서열(서열번호 142(말단 라이신은 유전자 내 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존

재하지 않음) 또는 서열번호 143의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화됨)을 갖는 제1 폴리펩타이드; 서열번호 31의 아미노산 서열(서열번호 113 또는 서열번호 115의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화됨)을 갖는 제2 폴리펩타이드; 및 서열번호 32의 아미노산 서열(서열번호 114(말단 라이신은 유전자 내 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존재하지 않음) 또는 서열번호 141의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화됨)을 갖는 제3 폴리펩타이드를 포함하는 추가의 예시적인 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC가 본 명세서에 기술되어 있다.

표 6

[표 6A]

복합체-57 제 1 폴리펩타이드

명칭	제 1 폴리펩타이드				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1$^{\Delta}$
제 1 폴리펩타이드 서열번호 38*,++	H20GG 서열번호 72	0011 서열번호 73	v16 서열번호 122	C225v5 서열번호 21	서열번호 23

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 160(말단 라이신은 유전자의 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존재하지 않음) 또는 서열번호 142 임.

++N-말단 스페이서(서열번호 117)를 포함함.

$^{\Delta}$Fc1 은 CH1(서열번호 26)-힌지(서열번호 34) 서열의 C-말단에 위치함.

[0279]

[표 6B]

복합체-57 제 2 폴리펩타이드

명칭	제 2 폴리펩타이드			
	MM2	CM2	VL2	불변 경쇄(CL)
제 2 폴리펩타이드 서열번호 31*,++	CF41 서열번호 13	2008 서열번호 14	C225v5 서열번호 22	CL 서열번호 25

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 113 또는 대안적으로 서열번호 115 임.

++N-말단 스페이서(서열번호 117)를 포함함.

[0280]

[표 6C]

복합체-57 제 3 폴리펩타이드

명칭	제 3 폴리펩타이드
	Fc2
제 3 폴리펩타이드 서열번호 32*,++	서열번호 28

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 114(말단 라이신은 유전자의 존재 여부에 관계없이 정제된 단백질에 존재하지 않음) 또는 서열번호 141 임.

++Fc2 의 N-말단에 위치한 힌지(서열번호 35)를 포함함.

[0281]

[0282] *대조군 활성화 가능한 항-EGFR, 항-CD3 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드의 구축*

[0283] 본 명세서에서 "CI106"으로 지칭되는 대조군 활성화 가능한 이중특이성 항체 작제물을 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 특허 공개 제WO 2019/075405호에 기술되어 있는 바와 같이 제조하였다. CI106은 2개의 동일한 중쇄(2개의 제1 폴리펩타이드) 및 동일한 경쇄(2개의 제2 폴리펩타이드)에 해당하는 4개의 폴리펩타이드로 구성된 활성화 가능한 이중 암을 갖춘 2가 이중특이성 항체 작제물이되, 각각의 중쇄 및 경쇄는 이중특이성 항체 작제물의 암을 형성한다. 이중특이성 항체는 각 유형의 결합 도메인(즉, 2개의 EGFR 결합 도메인 및 2개의 CD3 결합 도메인) 중 2개를 갖는다는 점에서 "2가"이다. 경쇄의 아미노산 서열은 복합체-67 및 복합체-57의 제2 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 동일하다. CI106의 중쇄 및 복합체-67의 제1 폴리펩타이드는 동일한 스페이서,

절단성 모이어티, 항-EGFR VH 및 절단성 모이어티 구성요소를 갖는다. CI106의 중쇄 및 복합체-57의 제1 폴리펩타이드는 동일한 스페이서, 항-CD3 MM/MM1, 절단성 모이어티 및 항-CD3 VL/VH(및 동일한 항-CD3 scFv) 및 항-EGFR VH 구성요소를 갖는다. CI106의 경우, 4개의 표적화 도메인(2개의 항-CD3 결합 도메인 및 2개의 항-EGFR 결합 도메인)이 모두 마스킹되었다. CI106의 구성요소는 표 7A 내지 표 7B에 제공되어 있다.

표 7

[표 7A]

CI106 중쇄 성분

명칭	중쇄				
	항-CD3 마스킹 모이어티	절단성 모이어티	항-CD3 scFv	항-EGFR 가변 중쇄 도메인	Fc [Δ]
CI106 서열번호 123[*,++]	H20GG 서열번호 72	0011 서열번호 73	v16 서열번호 122	C225v5 서열번호 21	서열번호 124

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 125 임(단백질은 발현/정제 중에 말단 라이신을 잃는 것으로 보임).

++N-말단 스페이서(서열번호 116)를 포함함.

[Δ]Fc 도메인은 CH1(서열번호 26)-힌지(서열번호 34) 서열의 C-말단에 위치함.

[0284]

[표 7B]

CI106 경쇄 성분

명칭			경쇄	
	항-EGFR 마스킹 모이어티	CM	항-EGFR VL2	불변 경쇄
CI106 LC 서열번호 31[*,++]	CF41 서열번호 13	2008 서열번호 14	C225v5 서열번호 22	CL 서열번호 25

*상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 113 또는 대안적으로 서열번호 115 임.

++N-말단 스페이서(서열번호 117)를 포함함.

[0285]

[0286] ***실시예 2. EGFR$^+$ HT-29 세포 및 CD3e$^+$ Jurkat 세포에 대한 활성화 가능한 항-EGFR, 항-CD3 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드의 결합***

[0287] 기술된 항-EGFR 및 항-CD3 마스킹 펩타이드가 활성화 가능한 이종다량체 이중특이성 폴리펩타이드 복합체의 EGFR 및 CD3에 대한 결합을 저해할 수 있는지 확인하기 위해, 유세포 분석 기반 결합 검정을 수행하였다.

[0288] HT-29-luc2(Perkin Elmer, Inc., 매사추세츠주 월섬 소재(구명칭 Caliper Life Sciences, Inc.) 및 Jurkat(Clone E6-1, ATCC, TIB-152) 세포를 10% 열 불활성화된 소태아 혈청(HI-FBS, Life Technologies, 카탈로그 10438-026)이 보충된 RPMI-1640+글루타맥스(Life Technologies, 카탈로그 72400-047)에서 배양하였다. "활성화된" 분자는 단백질분해적으로 절단되어 활성화된 형태를 생성하는 활성화 가능한 HBPC로 생산하였다. 후속적으로 실험 전에 단백질 가수분해 절단을 거치지 않은 활성화 가능한 HBPC도 생산하였다. 다음 폴리펩타이드 복합체를 테스트하였다: 활성화된 CI106(2가, 이중 암 이중특이성 작제물), 활성화된 복합체-57(HBPC) 및 활성화된 복합체-67(HBPC) 및 활성화 가능한(마스킹된) HBPC 복합체-57(마스킹된) HBPC 복합체-67 및 이중 마스킹된 2가의 이중 암 이중특이성 작제물인 CI106. 실시예 1에 언급된 바와 같이, CD3 결합제(항-CD3 scFv v16)와 마스크(MM H20GG)의 한 가지 조합을 CI106 및 복합체-57에 사용하였고, CD3 결합제(항-CD3 scFv I2C)와 마스크(ML15)의 다른 조합을 복합체-67에 사용하였다.

[0289] HT29-luc2 세포를 Versene™(Life Technologies, 카탈로그 15040-066)로 분리하고, 세척하고, 96 웰 플레이트에 대략 150,000개 세포/웰로 플레이팅하고, 50㎕의 활성화되거나 활성화 가능한(마스킹된) HBPC를 재현탁시켰다. Jurkat 세포를 계수하고, HT29-luc2 세포에 대해 기술된 바와 같이 플레이팅하였다. 활성화된(비마스킹된) HBPC 또는 활성화 가능한(마스킹된) HBPC의 적정은 도 2a 및 도 2b에 표시된 농도에서 시작한 후 FACS 염색 완충액 + 2% FBS(BD Pharmingen, 카탈로그 554656)에서 3배 연속 희석하였다. 세포를 약 1시간 동안 진탕하면서 4℃에서 인큐베이션하고, 수거하고, 2×200㎕의 FACS 염색 완충액으로 세척하였다. 세포를 50㎕의 Alexa Fluor 488 접합된 항-인간 IgG Fc(10 ㎍/㎖, Jackson ImmunoResearch)에 재현탁시키고, 약 1시간 동안 진탕하면서 4℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 수거하고, 세척하고, 2.5 ㎍/㎖의 7-AAD(BD Biosciences, 카탈로그 559925)를 함유하는 200㎕의 FACS 염색 완충액의 최종 부피에 재현탁시켰다. 2차 항체 단독으로 염색한 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. Attune NxT 유세포 분석기에서 데이터를 획득하고, 살아있는 세포의 평균 형광 강도(median fluorescence intensity: MFI)를 FlowJo® V10(Treestar)을 사용하여 계산하였다. 배경이 제거된(Background subtracted) MFI 데이터를 곡선 피팅 분석을 사용하여 GraphPad Prism에서 그래프로 작성하였다.

[0290] 도 2a 내지 도 2b에 도시된 바와 같이, 활성화 가능한 HBPC, 복합체-57 및 복합체-67뿐만 아니라 CI106(마스킹됨)은 활성화된(비마스킹된) 복합체-57, 활성화된(비마스킹된) 복합체-67 및 활성화된(비마스킹된) CI106에 비해 EGFR 및 CD3 표적 둘 다에 대한 결합의 감소를 나타내었다. 결합의 감소는 결합 곡선이 오른쪽으로 이동하는 것으로 나타났다. 이러한 세포 결합 실험에서 EGFR 마스킹 효율은 복합체-57의 경우 105, 복합체-67의 경우 338, CI106의 경우 594였다.

[0291] ***실시예 3. 활성화 가능한 그리고 활성화된 HBPC의 생물학적 활성***

[0292] 활성화 가능한(마스킹된) 그리고 활성화된(비마스킹된) HBPC의 생물학적 활성을 세포독성 검정을 사용하여 검정하였다. 인간 PBMC는 Stemcell Technologies(캐나다 밴쿠버 소재)로부터 구입하였으며, 5% 열 불활성화된 인간 혈청(Sigma, 카탈로그 H3667)이 보충된 RPMI-1640+글루타맥스에서 5:1의 E(CD3+):T 비로 EGFR 발현 암세포주 HT29-luc2(Perkin Elmer, Inc., 매사추세츠주 월섬 소재(구명칭 Caliper Life Sciences, Inc))와 함께 공동 배양하였다. 활성화된(비마스킹된) CI106(대조군), 활성화된(비마스킹된) 복합체-57(HBPC) 및 활성화된(비마스킹된) 복합체-67(HBPC) 및 CI106(대조군), 복합체-57(활성화 가능한 HBPC) 및 복합체-67(활성화 가능한 HBPC)의 적정을 테스트하였다. 48시간 후, ONE-GloTM 루시퍼레이스 검정 시스템(Promega, Madison, WI 카탈로그 E6130)을 사용하여 세포독성을 평가하였다. Infinite® M200 Pro(Tecan Trading AG, 스위스 소재)에서 발광을 측정하였다. GraphPad PRISM에서 곡선 피팅 분석을 통해 세포독성 퍼센트를 계산하고 플로팅하였다. EC50 비를 계산하여 활성화된 분자의 효능을 비교하였다. 마스킹 효율은 각 분자에 대한 온전한 EC50 대 활성화된 EC50의 비로 계산하였다.

[0293] 도 3a 및 도 3b에 도시된 바와 같이, 활성화 가능한(마스킹된) HBPC는 활성화된(비마스킹된) HBPC에 비해 이동된 용량 반응 곡선을 나타내었다.

[0294] 이 검정에서, 도 3a의 데이터는 CI106의 경우 29,650의 마스킹 효율, 복합체-57의 경우 1,034의 마스킹 효율을 나타낸다. 도 3b의 데이터는 CI106의 경우 26,537의 마스킹 효율, 복합체-67의 경우 7,141의 마스킹 효율을 나타낸다. 복합체-57은 일반적으로 이 검정을 사용한 다중 실험에 기초하여 복합체-67에 비해 효능이 10배 내지 42배 감소한 것으로 나타났다.

[0295] ***실시예 4. HBPC는 마우스에서 확립된 HT29 종양의 퇴행을 유도하였다***

[0296] 이 실시예에서, 활성화 가능한(마스킹된) HBPC 복합체-67 및 대조군 CI106을 인간 PBMC가 이식된 NSG 마우스에서 확립된 HT29 이종이식편 종양의 퇴행을 유도하거나 성장을 감소시키는 능력에 대해 분석하였다.

[0297] 인간 결장 암세포주 HT29-luc2(Perkin Elmer, Inc., 매사추세츠주 월섬 소재))를 확립된 절차에 따라 배양하였다. 정제되고 동결된 인간 PBMC는 Hemacare, Inc.(캘리포니아주 밴나이즈 소재)로부터 얻었다. NSG(NOD.Cg-*Prkdcscid* Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) 마우스는 Jackson Laboratories(메인주 바 하버 소재)로부터 얻었다.

[0298] 제0일에, 각 마우스에 무혈청 배지인 100㎕의 RPMI + 글루타맥스 중 2×10^{6}개의 HT29-luc2 세포를 오른쪽 옆구리에 피하로 접종하였다. 단일 공여자로부터의 이전에 동결된 PBMC를 제3일에 1:1의 CD3^{+} T 세포 대 종양 세포 비로 투여(i.p.)하였다. 종양 부피가 150㎣ 내지 200㎣에 도달하면(대략 12일), 마우스를 무작위화하여 치료 그룹에 배정하고, 표 8에 따라 i.v.로 투여하였다. 종양 부피 및 체중은 매주 2회 측정하였다. CI106과 복합체-67

사이의 분자량 차이를 설명하기 위해 복합체-67의 용량 수준을 조정하였다.

표 8

HT29-luc2 이종이식편 연구에 대한 그룹 및 용량.

그룹	수	처리	용량(mg/kg)
1	8	비히클	해당없음
2	8	CI106 이중 마스킹된 2가의 이중 암 이중특이성 작제물	1.0
3	8	복합체-67 활성화 가능한(마스킹된) HBPC	0.2
4	8	복합체-67 활성화 가능한(마스킹된) HBPC	0.6
5	8	복합체-67 활성화 가능한(마스킹된) HBPC	1.8

[0299]

[0300] 초기 치료 투여(제0일) 후 일수에 대한 종양 부피의 플롯을 도시하고 있는 도 4에 도시된 바와 같이, HT29-luc2 이종이식편 종양의 성장에 대한 복합체-67의 용량 의존적 효과가 있다. 복합체-67은 동등한 용량(1 ㎎/㎏의 CI106 및 0.6 ㎎/㎏의 복합체-67)에서 대조군인 CI106보다 더 강력한 항종양 활성을 나타내었다; p = 0.0099 Dunnett의 RMANOVA.

[0301] *실시예 5. 활성화 가능한 HBPC를 사용한 처리 후 마우스에서 확립된 HCT116 종양의 종양 퇴행*

[0302] 활성화된(비마스킹된) HBPC act-복합체-67 및 활성화 가능한(마스킹된) HBPC 복합체-67을 인간 T 세포 이식된 NSG 마우스에서 확립된 HCT116 이종이식편 종양의 퇴행을 유도하고 이의 성장을 감소시키는 능력에 대해 분석하였다. 인간 결장 암세포주 HCT116(ATCC)을 확립된 절차에 따라 RPMI + 글루타맥스 + 10% FBS에서 배양하였다. 종양 모델은 실시예 4에 기술된 바와 같이 수행하였다. 마우스에게 표 9에 따라 투여하였다.

표 9

HCT116 이종이식편 연구에 대한 그룹 및 용량.

그룹	수	처리	용량(mg/kg)
1	8	비히클	해당없음
2	8	Act-복합체-67 (활성화됨, 비마스킹됨)	0.3
3	8	Act-복합체-67 (활성화됨, 비마스킹됨)	1.0
4	8	복합체-67 (활성화 가능, 마스킹됨)	1.0
5	8	복합체-67 (활성화 가능, 마스킹됨)	3.0

[0303]

[0304] 종양 부피 대 초기 치료 투여 후 연구 일수(연구 일수 0)의 플롯을 도시하는 도 5에 도시된 바와 같이, 테스트된 모든 용량에서 두 분자 모두에 대해 종양 퇴행이 입증되었다.

[0305] ***실시예 6: 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(CHT)로 정제한 후 단량체 퍼센트의 평가***

[0306] 이중 마스킹된 CI106 대조군 및 활성화 가능한(마스킹된) HBPC 복합체-67을 세라믹 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 정제하여 정제 동안 고농도에서의 이량체화의 양을 비교하였다. 이는 정제 과정의 각 단계에서 단량체의 백분율을 분석함으로써 평가하였다.

[0307] 20 g/ℓ의 수지가 로딩된 CHT 유형 I, 40㎛ 비드 칼럼(Biorad Cat: 157-0040 및 #157-0041)에 샘플을 로딩하였다. 칼럼을 평형 완충액 10mM NaPO4, 100mM 히스티딘 완충액(pH 6.5)으로 세척한 다음, CI106의 경우 pH 6.5에서 10mM NaPO4, 100mM 히스티딘 200mM 라이신-HCl 완충액을 사용하고 복합체-67의 경우 pH 6.5에서 10mM NaPO4, 100mM 히스티딘 100mM 라이신-HCl 완충액을 사용하여 2㎖ 분획으로 용리하였다. CI106을 2㎖ 분획으로 수집한 다음, 5개의 분획을 풀링하여 용리액을 형성하였다. CI106의 경우 피크 수집은 약 25mAU에서 시작하여 약 300mAU에서 중지하였다. 복합체-67은 하나의 튜브에 수집하였으며, 피크 수집은 100mAU에서 시작하여 500mAU에서 중지하였다. 이어서 pH 7.0에서의 500mM NaPO4의 스트립 완충 단계를 수행하였다. 각 분획에 대한 단백질 농도를 280㎚의 파장에서의 UV 흡수로 정량화하였다. 각 분획의 단량체 퍼센트를 총 피크 영역을 기준으로 SE-HPLC(분석적 규모 크기 배제 크로마토그래피)에 의해 결정하였다.

[0308] 크로마토그래피의 결합 단계 동안, 단백질은 먼저 칼럼의 상단 부분에 결합하고, 위쪽 부위가 가득 차면 칼럼의 아래로만 이동한다. 이로 인해 칼럼에 고농도로 존재하게 된다. CI106 및 복합체-67의 다량체 형태는 단량체 형태보다 칼럼에 더 강한 친화력으로 결합하므로, 칼럼으로부터 완전히 제거하기 위해서는 더 강한 완충액이 필요하다. 따라서, 칼럼이 더 약한 완충액으로 용리된 다음 더 강한 완충액으로 스트리핑될(stripped) 때, 용리액은 스트립보다 이량체의 백분율이 더 낮다(단량체의 백분율이 더 높음). 표 10에 나타낸 바와 같이, 복합체-67(활성화 가능한 HBPC)을 전개(run)시키면 용리액에서 단량체 퍼센트가 7.6% 증가하였고, 스트립 단계까지 칼럼에 고분자량 물질이 남아 용리액에서의 회수율은 77%였다. 이는 스트립까지 더 많은 이량체 물질(단지 30.6%의 단량체)이 칼럼에 남아 용리액에서의 회수율이 81%였음에도 불구하고, 용리액에서 단량체 퍼센트가 65.0%로 5.4% 감소한 CI106 전개와 비교된다.

표 10

CHT 크로마토그래피 결과

[0309]

분자	로딩 내 단량체 %	용리액 내 단량체 %	용리액 내 회수율 %	스트립 내 단량체 %	스트립 내 회수율 %
복합체-67	90.9	98.5	77	데이터 없음	데이터 없음
CI106	70.4	65.0	81	30.6	9

[0310] 이러한 결과는 복합체-67이 CI106의 경우 단 65%인 것과 비교하여 칼럼에서 고농도일 때 추가적인 이량체화를 거치지 않아 용리액에서 단량체가 98.5%로 거의 모든 고분자 종을 제거하였음을 시사한다. CI106의 경우, 용리액 풀에는 원래 로딩(load)보다 더 많은 고분자 종이 있다. 그러나, CI106이 칼럼에서 고농도로 적용될 때 발생하는 이량체화로 인해, CI106은 평가된 이러한 또는 임의의 결합/용리 크로마토그래피 방법으로도 정제할 수 없다.

[0311] 복합체-67의 개선된 거동은 CHT 유형 1 크로마토그래피를 통해 고단량체 복합체-67의 정제를 가능하게 한다.

[0312] ***실시예 7: 원심 농축기에서의 농축을 통한 농도 의존적 이량체화의 평가***

[0313] 단백질 A와 복합체-67(활성화 가능한 HBPC), 복합체-57(활성화 가능한 HBPC) 및 CI106 대조군의 SEC-정제된 제제를 원심 농축하고 최고 농도에서 밤새 인큐베이션한 후 단량체 퍼센트에 대해 비교하였다.

[0314] 복합체-67, 복합체-57 및 CI106을 단백질 A 및 SEC로 정제한 다음, 낮은 pH 완충액(10mM 아세테이트, 100mM 라이신, pH 6)에서 제형화하였다. 샘플을 PBS(753-45-01)에 1:15로 희석하고, Pierce™ 단백질 농축기 PES 10K MWCO 0.5㎖(Thermo Fisher 카탈로그 번호 88513)를 사용하여 각 농도에서 2분 동안 14,000RPM으로 원심분리하여 농축시켰다. 최고로 농축된 샘플을 밤새 보관하고, 단량체 퍼센트에 대해 평가하였다. 생성된 농도 및 단량체 양의 퍼센트는 표 11 및 도 6에 나타나 있다.

표 11

단량체 활성화 가능한 HBPC 대 총 단백질 농도 퍼센트

복합체-67		복합체-57		PBS 중 CI106	
농도 mg/ml	단량체 %	농도 mg/ml	단량체 %	농도 mg/ml	단량체 %
1.0	99.1	1.0	98.6	1.1	94.4
3.2	99.0	2.4	98.4	3.58	93.0
5.4	98.9	3.6	98.3	5.67	90.9
6.5	99.0	4.0	98.2	7.27	88.6
밤새	98.9	밤새	97.9		

[0315]

[0316] **도 6** 및 **표 11**은 복합체-67이 농도가 증가함에 따라 용액 내에서 높은 백분율의 단량체(98% 내지 99%)와 매우 낮은 응집으로 유지된다는 것을 보여준다. 이는 농도가 증가함에 따라 현저한 농도 의존적 이량체화를 나타내는 CI106과 비교된다. 복합체-57은 농도 의존적 이량체화를 거의 나타내지 않았으며, 농도가 증가함에 따라 안정적인 단량체 백분율을 유지하였다. 복합체-67은 또한 최고 농도에서 밤새 인큐베이션하는 동안 단량체 백분율을 유지하여 더 높은 농도에서 단량체 백분율의 안정성을 보여주었다.

[0317] ***실시예 8: 대안적인 유사 구조의 비교***

[0318] 한 세트에서는 CD3 및 종양 관련 항원, 항원 A를 표적화하고 또 다른 세트에서는 CD3 및 종양 관련 항원, 항원 B를 표적화하는 활성화 가능한 이중특이성 작제물 세트를 제조하였다. 항원 A나 항원 B는 둘 다 EGFR이 아니었다. 각각의 세트는 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC, 및 서로 다른 대안(형식) 1 및 대안(형식) 2로 지칭되는 구조적 배열에 활성화 가능한 HBPC와 동일한 구성요소(즉, 동일한 항-CD3 scFv, 동일한 항종양 관련 항원 VH 및 VL 서열, 동일한 항-CD3 마스킹 모이어티 및 동일한 항종양 관련 항원 마스킹 모이어티)를 갖는 다른 활성화 가능한 이중 마스킹된 1가 이중특이성 작제물뿐만 아니라 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC의 구조를 포함하였다. 각각의 세트에서 각 작제물의 특성은 실시예 9 및 실시예 10에 기술된 바와 같이 특성 규명되었다.

[0319] ***실시예 9: 이중 마스킹된 1가 이중특이성 형식의 비교***

[0320] 실시예 8에 기술된 항-CD3, 항-항원 A 이중특이성 작제물(즉, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC의 형식, 대안(형식) 1 및 대안(형식) 2)의 생물학적 활성 및 마스킹 효율을 세포독성 검정을 사용하여 결정하였다. Ovcar-8 세포를 인간 T 세포와 1:10의 비로 공동 배양하고, 표 12, 표 13 및 표 14의 분자 희석 시리즈로 처리하였다. 48시간 후, 제조업체의 지침에 따라 Cell Titer Glo(Promega)를 사용하여 세포독성을 평가하였다. 마스킹 효율을 각 분자에 대한 온전한 EC_{50} 대 활성화된 EC_{50}의 비로 계산하였다. 항-CD3 scFv, 항-CD3 마스킹 모이어티, 항종양 관련 항원 VH 및 VL, 항종양 관련 항원 마스킹 모이어티 및 2개의 절단성 모이어티에 대한 아미노산 서열은 3개의 상이한 형식(즉, 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC, 대안(형식) 1 및 대안(형식) 2)에 걸쳐 동일하였다. 활성화 가능한 HBPC, 대안 1 및 대안 2 분자뿐만 아니라 상응하는 비마스킹된 대조군 분자의 마스킹 효율은 표 12(항-항원 A 마스킹 모이어티 ML21 및 항-CD3 마스킹 모이어티 ML15), 13(항-항원 A 마스킹 모이어티 ML24 및 항-CD3 마스킹 모이어티 ML15) 및 14(항-항원 A 마스킹 모이어티 ML34 및 항-CD3 마스킹 모이어티 ML15)에 제시되어 있다. 아래에 나타난 바와 같이, 활성화 가능한 HBPC는 각 경우에 가장 높은 마스킹 효율을 나타내었다. 구성요소가 각 형식 유형에서 동일하였기 때문에, 결과는 활성화 가능한 HBPC의 마스킹 효율의 개선이 대안(형식) 1 및 대안(형식) 2에 비해 활성화 가능한 HBPC 형식의 구성요소의 특정 배열에 기인함을 시사한다.

표 12

형식 - 마스크 ML21 및 ML15 – 항원 A 에 의한 마스킹 효율

형식	분자	항-항원 A 마스크	항-CD3 마스크	마스킹 효율
대안 1 및 2 대조군	복합체-165	비마스킹됨	비마스킹됨	1
대안 2	복합체-211	ML21	ML15	69
대안 2	복합체-271	ML21	ML15	68
대안 2	복합체-272	ML21	ML15	97
대안 2	복합체-273	ML21	ML15	119
대안 1	복합체-349	ML21	ML15	339
대안 1	복합체-350	ML21	ML15	237
대안 1	복합체-351	ML21	ML15	492
대안 1	복합체-352	ML21	ML15	391
대안 1	복합체-338	ML21	ML15	110
활성화 가능한 HBPC 대조군	복합체-355	비마스킹됨	비마스킹됨	1
활성화 가능한 HBPC	복합체-353	ML21	ML15	**1316**

[0321]

표 13

형식 - 마스크 ML24 및 ML15 – 항원 A 에 의한 마스킹 효율

형식	분자	항-항원 A 마스크	항-CD3 마스크	마스킹 효율
대안 1 및 2 대조군	복합체-165	비마스킹됨	비마스킹됨	1
대안 2	**복합체-275**	ML24	ML15	**112**
활성화 가능한 HBPC 대조군	복합체-355	비마스킹됨	비마스킹됨	1
활성화 가능한 HBPC	복합체-429	ML24	ML15	8274
활성화 가능한 HBPC	복합체-430	ML24	ML15	6460
활성화 가능한 HBPC	복합체-432	ML24	ML15	7754

[0322]

표 14

형식 - 마스크 ML34 및 ML15 – 항원 A에 의한 마스킹 효율

형식	분자	항-항원 A 마스크	항-CD3 마스크	마스킹 효율
대안 2	복합체-419	ML34	ML15	해당없음
대안 1	복합체-426	ML34	ML15	248
활성화 가능한 HBPC 대조군	복합체-355	비마스킹됨	비마스킹됨	1
활성화 가능한 HBPC	복합체-354	ML34	ML15	2491

[0323]

[0324] 표 13에서, 활성화 가능한 HBPC는 대안 2에 비해 마스킹 효율이 15배 증가하였고, 대안 1에 비해 마스킹 효율이 2배 내지 4배 증가한 것으로 나타났다. 표 13에서, HBPC는 6460 내지 8274의 마스킹 효율을 나타낸 반면, 대안 2는 112의 ME를 나타내었다. 표 13에서, 활성화 가능한 HBPC는 대안 2에 비해 마스킹 효율이 68배 증가하였고, 대안 1에 비해 마스킹 효율이 10배 증가한 것으로 나타났다. 표 14에서, HBPC는 2491의 마스킹 효율을 나타낸 반면, 대안 1은 248의 ME를 나타내었다. 표 15에서, 복합체-463은 대안 1 및 2에서 제조하였으며, 대안 1의 복합체-463에 대해 2가지 검정을 수행하였다. HBPC에 대해 HBPC는 대안 1에 비해 1500ME 내지 2100ME 범위 또는 ME가 약 6배 내지 10배 증가한 제조 효율을 나타내었고, 대안 2에 비해 약 47배 증가한 제조 효율을 나타내었다.

[0325] 이러한 결과는 마스킹 효율의 개선이 본 개시내용의 활성화 가능한 HBPC의 특정 구조적 배열에 기인하는 것으로 보임을 시사한다.

[0326] ***실시예 10: CHO 세포주에서의 활성화 가능한 HBPC 및 대안적인 이중특이성 분자의 세포독성***

[0327] 각각 CD3 및 항원 B를 표적화하는 활성화 가능한 HBPC, 대안 1 및 대안 2 분자에 대해 마스킹 효율 및 세포독성을 결정하였다. 항원 B를 발현하는 CHO 세포를 1:10의 비로 인간 PBMC와 공동 배양하고, 표 15의 분자 희석 시리즈로 처리하였다. 48시간 인큐베이션 후, 제조업체의 지침에 따라 Cytotox Glo(Promega)를 사용하여 세포독성을 결정하였다. 각 분자에 대한 온전한 EC_{50} 대 활성화된 EC_{50}의 비로 마스킹 효율을 계산하였다. 결과는 아래 표 15에 나타나 있다.

표 15

마스킹 효율 및 세포독성 – 항원 B

형식	분자	항-항원 B 마스크	항-CD3 마스크	EC_{50}	마스킹 효율
대안 1 및 2 대조군*	복합체-164	해당없음	해당없음	1.48 - 4.0	해당없음
대안 1**	복합체-463	PC7	ML15	6167-7366	1542-2188
대안 2	복합체-231	PC7	ML15	473	319
활성화 가능한 HBPC 대조군	복합체-342	해당없음	해당없음	3.1	해당없음
활성화 가능한 HBPC	대조군-39	PC7	ML15	>10e^5	>15,000X

*,**,+다중 실험

[0328]

[0329] 활성화 가능한 HBPC는 최상의 결과를 제공하였다. 도 7은 마스킹된 활성화 가능한 HBPC(대조군-39), 비마스킹된 활성화 가능한 HBPC 대조군(복합체-342), 대안(형식) 2의 활성화 가능한 폴리펩타이드(복합체-231) 및 비마스킹된 대안(형식) 2 대조군(복합체-164)의 세포 용해 퍼센트로서 세포 독성을 보여준다.

[0330] 결과는 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 HBPC의 특정 구조의 구성요소의 배열이 대안적 형식으로 배열된 동일한 구성요소를 갖는 활성화 가능한 1가 이중특이성 작제물의 마스킹 효율과 비교하여 더 높은 마스킹 효율과 상관관계가 있는 것으로 보임을 시사한다.

[0331] 활성화 가능한 항-CD3, 항-항원 A HBPC 및 활성화 가능한 항-CD3, 항-항원 B HBPC에 대해 관찰된 마스킹 효율의 크기는 복합체-67 및 복합체-57에 대해 관찰된 것들과 일치한다. 이러한 유익한 결과는 사용된 특정 표적 도메인/아미노산 서열과 무관한 것으로 보인다.

[0332] ***실시예 11: 활성화 가능한 항-EGFR, 항-CD3 TCB 작제물 CI107의 안정성 및 효능***

[0333] 이 연구에서, (위에 기재된) CI106 대조군과 동일한 구조적 형식을 갖는 CI107, 항-EGFR, 항-CD3 TCB 작제물의 안전성 및 효능을 전임상 모델에서 평가하여 EGFR 발현 종양의 치료에 대한 치료 가능성을 평가하였다. 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 국제 특허 공개 제WO 2019/075405호에 기술되어 있는 바와 같이 CI107을 제조하였다. CI107 TCB 작제물은 대안적으로 이 실시예에서 "T 세포 관여 이중특이성 항체" 또는 "TCB"로 지칭된다.

[0334] **방법**

[0335] 동물 연구

[0336] 모든 동물 연구는 각 연구를 수행한 시설을 관리하는 기관내 동물 관리 및 사용위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정에 따라 수행하였다. 마우스 이종이식편 연구는 CytomX Therapeutics, Inc(CytomX)에서 수행하였으며, 사이노몰구스 원숭이 연구는 Altasciences(워싱턴주 에버렛 소재)에서 수행하였다. 모든 동물 연구는 USDA 동물 복지법과 실험 동물 관리 및 사용 지침에 명시된 규정을 따랐다.

[0337] 물질

[0338] CI107, CI128, CI020, CI011, CI040, CI048 및 CI104를 포함하여 이 연구에 기술된 모든 TCB 및 기타 작제물은 CytomX Therapeutics, Inc.에서 생성하였다(WO 2016/014974 및 WO 2019/075405 참조). CI107, CI128, CI020, CI011, CI040 및 CI104는 CI106과 동일한 구조적 형식을 갖는다. CI048은 활성화된 CI011에 해당한다. 활성화된 TCB는 유로카이네이스형 플라스미노겐 활성화제(urokinase-type plasminogen activator: uPA)를 사용한 시험관내 처리에 이어 SEC 정제를 통해 생성하였다(Desnoyers 2013). HT29-Luc2 세포는 Caliper Life Sciences

(매사추세츠주 홉킨턴 소재)에서 얻었고, HCT116 및 Jurkat 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 얻었다. 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 HemaCare Corporation(캘리포니아주 노스리지 소재), AllCells(캘리포니아주 앨러미다 소재) 또는 STEMCELL Technologies(워싱턴주 시애틀 소재)의 개별 공여자로부터의 동결 보존된 세포 바이알로 얻었다. NOD.Cg-Prkcdscid I12rg tm1Wjl/SzJ(NSG) 마우스는 Jackson Laboratories(캘리포니아주 새크라멘토 소재)에서 얻었다.

[0339] 세포 결합 검정

[0340] HT29 및 Jurkat 세포를 완전 배지에서 유지하였다. Versene™ 세포 해리 완충액을 사용하여 HT29 세포를 수거하였다. 세포를 250 x g에서 5분 내지 10분 동안 원심분리하고, 2% FBS(BD Pharminogen)를 포함하는 FACS 완충액에 현탁시켰다. 세포를 V 바닥 96-웰 플레이트에 150,000개/웰로 플레이팅하고, HT29 및 Jurkat 세포 둘 다의 경우 1.5μM의 CI107, HT29 세포의 경우 0.05μM의 활성화된 CI104 및 Jurkat 세포의 경우 0.5μM의 활성화된 CI104에서 시작하여 FACS 완충액 중 3배 연속 희석하여 얻은 다양한 농도의 복합체-07 또는 시험관내 프로테이스 활성화된 CI104로 처리하였다. 세포를 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, 10 ㎍/㎖의 Alexa Fluor 647 항-인간 Fc 2차 항체에 재현탁시켰다. 그런 다음, 세포를 인큐베이션하고, 4℃에서 30분 내지 60분 동안 빛으로부터 보호하고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, 7-AAD를 포함하는 FACS 완충액으로 재현탁시키고, MACSQuant 유세포 분석기(Miltenyi Biotech)에서 분석하였다. 2차 항체 배경 신호에 대해 평균 형광 강도 데이터를 수집하고, Graphpad Prism에서 그래프를 작성하고, EC50 값을 계산하였다.

[0341] 세포독성 검정

[0342] HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2를 96-웰 백색의 편형 바닥 조직 배양 처리된 플레이트(Costar #3917)에 있는 RPMI + 5% 인간 혈청에 10,000개 세포/웰로 플레이팅하였다. 인간 PBMC를 새로 해동시키고, RPMI + 5% 인간 혈청으로 2회 세척하고, 100,000개의 PBMC를 HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2를 포함하는 웰의 RPMI + 5% 인간 혈청에 첨가하였다. 그런 다음, 프로테이스 활성화된 TCB 또는 CI107을 3배 연속 희석으로 얻은 다양한 농도로 웰에 첨가하였다. 대조군 웰에는 비처리된 표적 + 효과기 세포, 표적 세포만, 효과기 세포만 또는 배지만 포함되어 있다. 그런 다음, 플레이트를 37℃ 및 5% CO2에서 대략 48시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 생존율을 ONE-Glo 루시퍼레이스 검정 시스템(Promega, #E6120) 및 Tecan 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 세포독성 퍼센트는 다음과 같이 계산하였다: (1-(RLU 실험/비처리 평균 RLU))*100.

[0343] 시험관내 T 세포 활성화 및 사이토카인 분석

[0344] T 세포 활성화는 HT29-Luc2 또는 HCT116-Luc2 세포와 공동 배양된 PBMC에서 CD69 발현을 유도하여 측정하였다. HT29-Luc2 또는 HCT116-Luc2 세포를 U자형 바닥 비부착성 플레이트에 10,000개 세포/웰로 플레이팅하였다. 인간 PBMC를 새로 해동시키고, 혈청을 포함하는 RPMI로 2회 세척하고, 100,000개 PBMC/웰을 종양 세포가 담긴 플레이트에 첨가하였다. 유세포 분석 보상 제어를 위해 PBMC만을 포함하는 플레이트에 2회 반복하여 시딩하였다. CI107, 활성화된 CI107 또는 CI128을 배지에 제조하고, 플레이팅한 세포를 첨가하였다. 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 유세포 분석을 준비하기 위해, 플레이트를 250 x g에서 10분 내지 15분 동안 원심분리하였다. 사이토카인 분석을 위해 상청액을 제거하고, Fc 블록(인간 TruStain FcX, BioLegend)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 인큐베이션하였다. 항-CD45-FITC(BioLegend), 항-CD3-Pacific blue(BioLegend), 항-CD8a-APC(BioLegend) 및 항-CD69-PE-Cy7(BioLegend) 또는 적절한 보상 대조군을 포함하는 항체 칵테일을 웰에 첨가하고, 플레이트를 30분 내지 60분 동안 빛으로부터 보호된 4℃에서 진탕하면서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 플레이트를 FACS 완충액으로 세척하고, 7-AAD를 포함하는 FACS 완충액에 재현탁시켰다. Attune 유세포 분석기를 사용하여 형광을 측정하고, PBMC를 나타내는 15,000개의 이벤트를 수집하였다.

[0345] 사이토카인 분석을 위해, Meso Scale Discovery U-PLEX 플레이트 검정(Meso Scale Diagnostics, 메릴랜드주 록빌 소재)을 사용하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 U-PLEX 플레이트를 준비하여 MCP-1, TNF-α, IL-6, IL-2 및 IFN-γ의 수준을 평가하였다. PBMC와 공동 배양하고, 마스킹된(활성화 가능한) CI107, 활성화된(본 명세서에서 "act-"로도 지칭됨) CI107 또는 CI128로 처리한 HT29-Luc2 또는 HCT116-Luc2로부터 수집된 상청액 샘플을 희석하고, 이를 플레이트에 첨가한 다음, 제조업체의 지침에 따라 처리하였다.

[0346] 생체내 효능 연구

[0347] 생체내 실험을 위해, 종양 성장에 대한 TCB의 효과를 HT29-Luc2 또는 HCT116 종양을 보유하고 인간 PBMC의 복강내(IP) 주사로 인해 생성된 인간 T 세포가 이식된 마우스에서 측정하였다. 200만 개의 HT29-Luc2 또는 HCT116 세포를 제0일에 암컷 NSG 마우스의 옆구리에 100㎕의 무혈청 RPMI로 피하로 주사하였다. 단일 공여자로부터의

동결된 PBMC를 새로 해동시키고, 제3일에 100㎕ 내지 200㎕의 RPMI + Glutamax 무혈청 배지로 IP 주사를 통해 투여하였다. PBMC는 이전에 CD3+ T 세포 백분율에 대해 특성 표명되었으며, 생체내 투여에 사용되는 PBMC의 수는 1:1의 CD3+ T 세포 대 종양 세포 비를 기준으로 하였다. TCB, 대조 물품 또는 비히클을 정맥내(IV) 투여하기 전에 대략 제12일의 종양 측정을 사용하여 마우스를 무작위화하였다. 동물에게 테스트 물품을 3주 동안 매주 투여하고, 종양 부피 및 체중을 매주 2회 기록하였다. 활성화된 TCB CI104를 생체내 연구에 사용하였다. CI104 작제물은 CD3 마스크를 scFv에 연결하는 데 사용된 절단성 링커에서만 CI107과 다르다. 마스크를 완전히 제거하기 위해 시험관내 프로테이스 활성화 시, 활성화된 CI104는 활성화된 CI107과 동일하고, 활성화된 CI107의 활성을 평가하는 데 사용될 수 있으며, 후속 시험관내 세포독성 연구에서는 활성화된 CI104의 활성이 활성화된 CI107의 활성과 동일하다는 것이 검증되었다.

[0348] 비인간 영장류 안전성 연구

[0349] 수컷 사이노몰구스 원숭이에게 테스트 물품에 따라 제1일 또는 제1일과 제15일에 1회 테스트 물품의 IV 볼루스 주사를 하였다. 테스트 물품 투여 후, 임상 관찰을 1일 2회 수행하였다. 사이토카인 방출, 혈청 화학, 혈액학 및 독성 역학의 분석을 위해 투여 후 다양한 시점에서 혈액 샘플을 수집하였다. Life Technologies Monkey Magnetic 29-Plex Panel 키트(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월섬 소재)를 사용하여 혈청 샘플에서 사이토카인 분석을 수행하였다. 독성 역학 분석을 위해, 샘플은 AIT Bioscience(인디애나주 인디애나폴리스 소재) 또는 CytomX에서의 분석을 위해 배송하기 전 혈장으로 처리하고 -60℃ 내지 -86℃에 보관하였다. 테스트 물품의 혈장 농도를 항-이디오타입 포획 항체 및 항-인간 IgG(Fc) 포획 항체를 사용하여 ELISA로 측정하였다. Phoenix WinNonlin v6.4(Certara, 뉴저지주 프린스턴 소재)를 이용한 비구획적 분석을 사용하여 Northwest PK Solutions에서 독성 역학 분석을 수행하였다.

[0350] **결과**

[0351] CI107은 항-EGFR과 항-CD3 도메인을 포함하는 이중 마스킹된(활성화 가능한) 이중 암 2가 이중특이성 분자로 설계하였다. 중쇄의 N 말단에 융합된 SP34 유래 항-CD3ε scFv를 갖는 세툭시맙 유래 항체를 사용하여 CI107을 생성하였다. CI107은 Fc 기능을 침묵시키는 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖고 있다. CI107을 생성하기 위해, 이전에 기술된 바와 같은 가요성 Gly-Ser 풍부 펩타이드 링커가 측접된 프로테이스 절단성 기질 링커를 사용하여 항-EGFR 항체 구성요소에 특이적인 마스킹 펩타이드를 경쇄의 N-말단에 융합하였다(Desnoyers 2013). 항-CD3 구성요소에 특이적인 마스킹 펩타이드를 프로테이스 절단성 기질 링커를 사용하여 scFv에 유사하게 첨가하였다. CI107은 Fc-효과기 기능을 손상시켜 FcγR을 발현하는 세포에 대한 가교를 최소화하였다. 해당 디자인은 프로테이스가 풍부한 종양 미세환경에서의 표적 결합 및 활성은 최대화하는 동시에 정상적인 조직에서의 결합 및 활성은 최소화하도록 의도되었다. 이 실시예 전반에 걸쳐 사용된 모든 비교 TCB는 EGFR 및 CD3 결합 도메인, 마스크 및 다양한 정도의 절단성을 가진 링커 펩타이드를 포함한다. CI011 및 CI040은 CI104 및 CI107의 1세대 버전이다. CI104 및 CI107 분자는 최적화된 CD3 scFv, 차세대 절단성 링커 및 추가적인 Fc 침묵 돌연변이를 포함한다. CI104 및 CI107은 동일한 마스크와 EGFR 및 CD3 결합 도메인을 갖고 있지만 CD3 프로테이스 링커가 상이하고; 그러나, 프로테이스 활성화 후, 활성화된 TCB는 동일하다. CI128은 EGFR 결합제가 관련 없는 항체(항-RSV)로 대체된 비표적화된 대조군으로 사용하였다.

[0352] *마스킹은 세포 표면의 EGFR에 대한 결합을 손상시킨다.*

[0353] EGFR 결합 도메인의 마스킹이 세포 표면에 발현된 EGFR에 대한 결합을 손상시키는지 여부를 평가하기 위해, EGFR 발현 HT29 및 HCT116 세포에 대한 CI107 및 비교 활성화된 TCB 작제물(즉, act-TCB)의 결합을 측정하였다.

[0354] 표적 세포를 증가하는 농도의 CI107 또는 비교 활성화된 작제물과 함께 인큐베이션하고, 결합을 유세포 분석으로 평가하였다. 도 8a 및 도 8b에 도시된 바와 같이, CI107 내 EGFR 마스킹의 존재는 활성화된 TCB CI107에 비해 세포 표면에 발현된 EGFR에 대한 결합을 실질적으로 약화시켰다. 활성화된 TCB 작제물은 0.17nM의 계산된 Kd로 HT29 세포에 결합하는 반면 CI107의 결합에 대한 Kd는 91.28nM이었고, 이는 활성화된 TCB에 비해 결합이 500배 이상 감소하였음을 나타낸다. HCT116 세포를 사용하여 유사한 결과를 얻었다. CI107과 동일한 항-CD3 모듈을 포함하지만 EGFR 표적화가 결여되어 있는 비표적화된 대조군 TCB인 CI128의 결합도 평가하였다. 이 대조군은 HT29 또는 HCT116 세포에 결합하지 않았다(도 8a 및 도 8b 참조).

[0355] *마스킹은 림프구 표면의 CD3에 대한 결합을 손상시킨다.*

[0356] 항-CD3 결합 도메인의 마스킹이 림프구 표면의 CD3에 대한 CI107의 결합을 손상시키는지 여부를 결정하기 위해,

Jurkat 세포에 대한 CI107 및 활성화된 CI107(즉, 활성화된 TCB) 결합을 측정하였다. 도 8c에 도시된 바와 같이, 활성화된 TCB는 0.62nM의 Kd로 Jurkat 세포에 결합하였다. 그러나, CI107의 결합은 검출되지 않았으며, Kd는 계산할 수 없었다. 활성화된 대조군 CI128은 활성화된 TCB와 유사한 친화력으로 Jurkat 세포에 결합하였다.

[0357] 종합하면, 이들 데이터는 CI107에서 항-EGFR과 항-CD3 결합 도메인의 이중 마스킹이 EGFR 또는 CD3을 발현하는 세포에 대한 결합을 약화시킴을 보여준다.

[0358] *마스킹은 PBMC 공동 배양에서 세포독성과 T 세포 활성화를* 약화시킨다.

[0359] CI107로 EGFR을 표적화하는 것이 항종양 세포 효과로 이어질 수 있는지 여부를 다루기 위해, 시험관내 세포독성 검정을 수행하였다. 루시퍼레이스 발현 HT29 또는 HCT116 세포를 인간 PBMC와 공동 배양하고, 증가하는 농도의 CI107, 활성화된 TCB 또는 비표적화된 대조군 CI128과 함께 인큐베이션하였다. 배양 48시간 후, HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2 세포의 생존율을 루시퍼레이스 검정을 통해 측정하였다. 도 9a에 도시된 바와 같이, 대조군 CI128을 사용한 처리는 PBMC와 공동 배양된 HCT116-Luc2 세포에 대한 세포독성을 최소화하여 세포독성 활성에 EGFR과 CD3 둘 다의 결합이 필요함을 보여준다. 대조적으로, 마스킹된 CI107과 활성화된 CI107(즉, act-TCB)은 둘 다 HCT116-Luc2 세포에 세포독성 효과를 나타내었다. 그러나, 활성화된 TCB는 마스킹된 형태에 비해 훨씬 더 낮은 농도에서 각각 0.44pM 및 7297pM의 EC50 값으로 세포독성을 나타내었다. 유사한 결과가 HT29-Luc2 세포에서도 관찰되었으며, EC50 값은 활성화된 TCB의 경우 0.25pM, CI107의 경우 3678pM이었다(도 9b). 따라서, CI107에서 항-EGFR 및 항-CD3 도메인의 이중 마스킹은 프로테이스 활성화의 부재하에 PBMC에 의해 매개된 세포독성 활성을 대략 15,000배 감소시켰다.

[0360] *CI107을 사용한 처리는 T 세포 활성화의 마커인 CD69 발현의 유도를 초래한다.*

[0361] CI107이 T 세포 활성화를 초래하는지 여부를 결정하기 위해, HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2 세포와 공동 배양된 PBMC에서의 CD69 수준을 마스킹된 CI107, 활성화된 CI107(즉, act-TCB) 및 대조군 CI128로 처리한 후 측정하였다. CD69는 T 세포 활성화의 마커 역할을 하며; TCR/CD3 결합 후, CD69 발현이 T 림프구 표면에서 빠르게 유도되며 T 세포 활성화 및 증식을 위한 공동자극 분자 역할을 한다. HCT116-Luc2 또는 HT29-Luc2 세포와 공동 배양된 인간 PBMC를 증가하는 농도의 CI107, 활성화된 TCB(즉, 활성화된 CI107) 또는 대조군 CI128로 16시간 동안 처리하고, CD69 발현 수준을 유세포 분석으로 측정하였다. 도 9c에 도시된 바와 같이, CI107은 HCT116-Luc2 세포와 공동 배양된 CD8+ T 세포에서 14178pM의 EC50으로 CD69 발현을 유도하였다. 대조적으로, 활성화된 CI107을 사용한 처리는 7.65pM의 EC50으로 CD69를 유도하였으며, 이는 CI107과 비교하여 T 세포 활성화 곡선에서 대략 18,000배의 이동을 반영한다. 비-EGFR 표적화된 대조군 CI128에서는 T 세포 활성화가 관찰되지 않았으며, 이는 CD3의 단독 참여가 T 세포 활성화에 충분하지 않음을 나타낸다. 유사하게는, HT29-Luc2 세포와 공동 배양된 동일한 공여자로부터의 PBMC의 처리는 마스킹된 CI107의 경우 65971pM, 활성화된 TCB의 경우 8.75pM의 EC50 값으로 CD69를 유도하였으며, 이는 CD69 유도 용량의 대략 7500배 차이를 반영한다(도 9d).

[0362] *CI107을 사용한 처리는 사이토카인 방출을 초래한다.*

[0363] TCB를 사용한 처리 시 EGFR 발현 암세포와 공동 배양된 PBMC에서의 T 세포 활성화를 추가로 평가하기 위해, CI107, 활성화된 TCB(즉, 활성화된 CI107) 또는 대조군 CI128로 처리한 후 사이토카인 방출을 평가하였다. IFN-γ, IL-2, IL-6, MCP-1 및 TNF-α의 수준을 증가하는 농도의 TCB로 처리한 후 16시간에 측정하였다. 도 10a 내지 도 10e에 도시된 바와 같이, 104pM 범위으 농도의 CI107을 사용한 처리는 각각 측정된 사이토카인의 방출을 초래하였다. 대조적으로, 활성화된 TCB는 1pM 내지 100pM 범위의 농도로 처리 시 사이토카인 방출을 초래하였다. 이러한 결과는 일반적으로 상이한 PBMC 공여자 세포와 암세포주(HCT116-Luc2 대 HT29-Luc2) 간에 일치하였다.

[0364] 종합하면, 이러한 데이터는 CI107에서 EGFR과 CD3 결합 도메인의 이중 마스킹이 프로테이스 활성화의 부재하에 T 세포 활성화를 약화시킴을 보여준다.

[0365] *프로테이스 절단에 대한 TCB 민감성은 생체내 항종양 효능 및 종양내 T 세포와 상관관계가 있다.*

[0366] TCB의 항종양 효능을 생체내에서 평가하였다. HT29-Luc2 종양을 보유하고 인간 PBMC가 이식된 면역 손상 마우스에게 비히클(PBS) 또는 0.3 mg/kg의 상이한 프로테이스 민감성을 갖는 링커를 포함하는 TCB(CI011, CI040), 비절단성 링커(CI020) 또는 비마스킹된 이중특이성 치료용 CI048을 3주 동안 매주 1회 처리하였다. CI020은 비절단성 링커로 인해 최소한의 항종양 활성을 가질 것으로 예상되는 반면, 비마스킹된 CI048은 최대 효능을 가질 것으로 예상된다. EGFR과 CD3 마스크를 둘 다 포함하는 CI011 및 CI040은 상이한 링커 펩타이드로 인해 프로테

이스 민감성이 다르며; CI040의 프로테이스 민감성은 CI011의 것보다 더 높다.

[0367] 도 11a에 도시된 바와 같이, 비마스킹된 TCB CI048을 사용한 처리는 처리를 시작한 후 1주 이내에 종양 퇴행을 가져왔다. 유사하게는, 마스킹된 CI011 및 CI040을 사용한 처리는 또한 종양 퇴행 또는 정체(statis)를 초래하였으며; CI040에서 나타난 퇴행은 CI011과 비교하여 이 분자 내 링커의 더 큰 절단성과 상관관계가 있다. 대조적으로, 비절단성 링커를 포함하는 CI020을 사용한 처리는 종양 성장에는 영향을 미치지 않았으며, 이는 생체내에서 TCB의 항종양 활성에 프로테이스 절단성이 필요함을 나타낸다.

[0368] 테스트된 TCB에 의해 매개된 항종양 효능이 종양 내 T 세포의 존재와 상관관계가 있는지 여부를 결정하기 위해, 동물에게 1 mg/kg 용량의 마스킹된 TCB 또는 활성화된 TCB를 투여한 후 1주에 종양을 수거하고, CD3에 대한 면역조직화학을 수행하였다. 도 11b에 도시된 바와 같이, 비히클 또는 비절단성 CI020을 사용한 처리 후 종양 조직에서 최소 수의 T 세포가 관찰되었다. 대조적으로, TCB CI040 또는 시험관내 프로테이스 활성화된 TCB CI048을 사용한 처리 시 증가된 수의 T 세포가 관찰되었다. 다시 말하면, 더 큰 프로테이스 민감성(CI040)을 갖는 TCB는 종양에서 더 많은 수의 T 세포를 생성하였다.

[0369] 종합하면, 이러한 데이터는 TCB가 EGFR 및 CD3 결합 도메인 마스크의 프로테이스 절단에 대한 민감성과 상관관계가 있는 종양내 T 세포 및 생체내 항종양 효능을 초래할 수 있음을 시사한다.

[0370] *CI107을 사용한 처리는 확립된 이종이식편 종양의 용량 의존적 퇴행을 유도한다.*

[0371] 생체내 종양 성장에 대한 CI107의 효과를 평가하였다. NSG 마우스에게 HT29 세포를 피하로 이식한 후 PBMC를 IP 주사하고, PBMC를 대략 11일 동안 생착시켰다. 그런 다음, 비히클, 0.5 mg/kg의 CI107 또는 1.5 mg/kg의 CI107로 동물을 3주 동안 매주 1회 처리하였다. 도 12a에 도시된 바와 같이, 0.5 mg/kg이 CI107을 사용한 처리는 종양 정체를 초래하였으며, 1.5 mg/kg의 CI107은 처리 시작 후 대략 1주에 시작하여 종양 퇴행을 초래하였다.

[0372] CI107의 생체내 효능도 HCT116 종양에서 평가하였다. 종양 및 PBMC 생착 후, 동물을 비히클, 0.3 mg/kg CI107, 1 mg/kg CI107 또는 0.3 mg/kg의 활성화된 TCB로 처리하였다. 도 12b에 도시된 바와 같이, 0.3 mg/kg의 CI107은 HCT116 종양 성장을 지연시킨 반면, 1 mg/kg의 CI107 및 0.3mg의 활성화된 TCB는 치료 기간 동안 유사한 수준의 종양 퇴행 및 정체를 초래하였다.

[0373] 이러한 데이터는 CI107이 HT29 및 HCT116 이종이식편 종양에서 종양 성장의 용량 의존적 저해 및 퇴행을 유도하고, 3배 더 높은 용량의 CI107의 항종양 활성이 활성화된 TCB의 항종양 활성과 유사함을 보여준다.

[0374] *마스킹된 CI107은 사이노몰구스 원숭이에서 활성화된 CI107에 비해 증가된 안전성을 제공한다.*

[0375] CI107의 전임상 내약성을 사이노몰구스 원숭이 연구에서 평가하였다. 동물에게 0.06 mg/kg 또는 0.18 mg/kg의 활성화된 CI107(즉, act-TCB) 및 0.6 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 6.0 mg/kg의 CI107을 단일 투여하고, 임상 관찰을 위해 동물을 추적하였다. 0.18 mg/kg의 활성화된 TCB로 처리한 동물은 구토, 식욕 부진, 창백한 외관, 구부정한 자세 및 야윈 외관을 포함한 심각한 임상 효과를 경험하였으며, 부작용은 투여 후 2시간에서 최대 10일까지 나타났다. 0.06 mg/kg의 활성화된 TCB로 처리된 동물은 투여 후 제1일에 구토 및 구부정한 자세를 포함하는 중간 정도의 일시적인 임상 효과를 경험하였으며; 이러한 효과의 신속한 해결을 기반으로, 0.06 mg/kg을 활성화된 TCB에 대한 최대 허용 용량(maximum tolerated dose: MTD)으로 정의하였다. 대조적으로, 2.0 mg/kg의 CI107로 처리된 동물은 일시적이고 경미한 임상 효과(제2일에 구토)만을 경험하였고, 0.6 mg/kg의 CI107로 처리된 동물은 어떠한 부작용도 경험하지 않았다. 4.0 mg/kg의 CI107로 처리된 동물은 중간 정도의 임상 효과(투여 후 4시간, 8시간 및 24시간에 구토 및 제2일에 식욕 부진 포함)를 경험하였다. 6.0 mg/kg의 CI107로 처리된 동물은 제2일에 죽은 채 발견되었다. 죽기 전에 나타난 임상 징후는 투여 후 구부정한 자세, 창백한 외관, 구토 및 액체 대변을 포함하였다. 따라서, 4.0 mg/kg은 CI107의 MTD로 간주되었다. 전반적으로, 마스킹된 CI107은 활성화된 TCB에 비해 내약성이 60배 이상 개선시켰다.

[0376] 활성화된 CI107 또는 마스킹된 CI107로 처리한 후 사이토카인 수준도 검사하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, IL-6(13a) 및 IFN-γ(13b)의 수준은 투여 후 8시간에 활성화된 TCB로 처리된 동물에서 상승하였다. 대조적으로, 0.6 mg/kg 또는 2.0 mg/kg의 CI107로 처리한 후 IL-6 또는 IFN-γ의 최소한의 변화가 관찰되었으며; 이들 사이토카인의 상승된 수준은 4.0 mg/kg의 CI107로 처리한 후에만 나타났다. 임상 관찰과 일치하게, CI107은 사이토카인 방출 용량 반응을 60배 이상 이동시킨다.

[0377] 혈청 화학의 분석은 또한 활성화된 TCB와 CI107 간의 차이를 보여주었다. 도 13c에 도시된 바와 같이, 활성화된 TCB를 사용한 처리는 투여 후 48시간에 간세포 손상의 마커인 아스파테이트 아미노트랜스퍼레이스(AST)의 용량

의존적 증가를 초래하였다. 대조적으로, 임의의 허용 용량 수준의 CI107로 처리한 후 AST의 어떠한 변화도 관찰되지 않았으며, 이는 이 마스킹된 TCB에 대한 개선된 내약성을 보여준다.

[0378] EGFR 및 CD3 결합 도메인의 마스킹이 약동학에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해, 투여 후 활성화된 TCB(즉, 활성화된 CI107) 및 마스킹된 CI107의 혈장 농도를 측정하였다. 도 13d에 도시된 바와 같이, 활성화된 TCB는 투여 후 24시간 이내에 순환계로부터 빠르게 제거되었다. 대조적으로, CI107은 투여 후 최대 7일 동안 혈장에서 유지되었으며, 이는 마스킹이 활성화된 TCB에 비해 노출을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 0.06 mg/kg의 활성화된 TCB의 단일 투여 후 AUC(0-7)는 0.04일*nM(n=1)이었던 반면, 2 mg/kg의 CI107의 투여 후 AUC(0-7)는 331.7일*nM(평균 n=3)이었다, 허용되는 노출이 8,000배 이상 증가함을 보여준다.

[0379] 이는 마스킹된 CI107에서 관찰된 내약성 및 약동학의 개선이 정상적인 조직 환경에서 EGFR 및 CD3에 대한 결합의 예상된 약화와 일치함을 보여준다.

표 16

서열 표

서열 번호	설명	서열
1	MM1 – 복합체-67	VSTTCWWDPPCTPNT
2	CM1	GLSGRSDDH
3	VH CDR1 복합체-67	KYAMN
4	VH CDR2 복합체-67	RIRSKYNNYATYYADSVKD
5	VH CDR3 복합체-67	HGNFGNSYISYWAY
6	VL CDR1 복합체-67	GSSTGAVTSGNYPN
7	VL CDR2 복합체-67	GTKFLAP
8	VL CDR3 복합체-67	VLWYSNRWV
9	VH1 복합체 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
10	VL1 복합체-67	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVL
11	scFv 복합체-67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL
12	링커	GSSGGSGGSG
13	MM2 복합체-67 복합체-57	LSCEGWAMNREQCRA
14	CM2	ISSGLLSGRSDQH
15	VH2 CDR1 복합체-67 복합체-57	NYGVH
16	VH2 CDR2 복합체-67 복합체-57	VIWSGGNTDYNTPFTS
17	VH2 CDR3 복합체-67 복합체-57	ALTYYDYEFAY

[0380]

[0381]

서열 번호	설명	서열
18	VL2 CDR1 복합체-67 복합체-57	RASQSIGTNIH
19	VL2 CDR2 복합체-67 복합체-57	YASESIS
20	VL2 CDR3 복합체-67 복합체-57	QQNNNWPTT
21	VH2 도메인 복합체-67 복합체-57 CI106(대조군)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCAR ALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
22	VL2 도메인 복합체-67 복합체-57 CI106(대조군)	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAG TKLELK
23	Fc1 복합체-67 복합체-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	말단 라이신이 있는 Fc1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CL 도메인 복합체-67 복합체-57 CI106(대조군)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
26	CH1-인간 IgG1- 복합체-67 복합체-57	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
27	CH1-인간 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV

서열 번호	설명	서열
		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	C-말단 라이신이 없는 Fc2 복합체-67 복합체-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	C-말단 라이신이 있는 Fc2	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	제 1 폴리펩타이드 복합체 -67	[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS**QTV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWV FGGGTKLTVL**GGGGS**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYG VHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	제 2 폴리펩타이드 복합체 – 67 복합체-57 CI106(대조군)	[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQH***GG GS**QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	제 3 폴리펩타이드 복합체 – 67 복합체 - 57	**DKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
33	스페이서	QGQSGS
34	힌지-1	EPKSCDKTHTCPPC

[0382]

[0383]

서열 번호	설명	서열
	복합체-67 복합체-57 CI106(대조군)	
35	힌지-2 복합체-67 복합체-57	DKTHTCPPC
36	말단 라이신 이 있는 제 3 폴리펩타이드 복합체-67 복합체-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	복합체- 67/복합체-57- 스페이서가 없는 제 2 폴리펩타이드	LSCEGWAMNREQCRAGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSQILLTQS PVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGI PSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
38	복합체-57 말단 라이신이 없는 제 1 폴리펩타이드.	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSQ TVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKP*C*EEQY*G*STYR*C*VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR*K*EMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL*K*SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	링커	GGGS
40	링커	$(GGGS)_n$
41	링커	(GSGGS)n
42	링커	GGSG
43	링커	GGSGG
44	링커	GSGSG
45	링커	GSGGG
46	링커	GGGSG
47	링커	GSSSG
48	링커	GGGGSGGGGSGGGGSGS
49	링커	GGGGSGS

[0384]

서열 번호	설명	서열
50	링커	GGGGSGGGGSGGGGS
51	링커	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
52	링커	GGGGS
53	링커	GGGGSGGGGS
54	링커	GGGS
55	링커	GGGSGGGS
56	링커	GGGSGGGSGGGS
57	링커	GSSGGSGGSGG
58	링커	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	링커	GSTSGSGKPGSSEGST
60	링커	SKYGPPCPPCPAPEFLG
61	링커	GGSLDPKGGGGS
62	링커	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
63	링커	GKSSGSGSESKS
64	링커	GSTSGSGKSSEGKG
65	링커	GSTSGSGKSSEGSGSTKG
66	링커	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
67	MM1	MMYCGGNEVLCGPRV
68	MM1	GYRWGCEWNCGGITT
69	MM1	MMYCGGNEIFCEPRG
70	MM1	GYGWGCEWNCGGSSP
71	MM1	MMYCGGNEIFCGPRG
72	MM1	GYLWGCEWNCGGITT
73	CM1 복합체-67 복합체-57 CI106	LSGRSDDH
74	CM	ISSGLLSGRSDQH
75	CM	LSGRSDNH
76	CM	TSTSGRSANPRG
77	CM	VHMPLGFLGP
78	CM	AVGLLAPP
79	CM	QNQALRMA
80	CM	ISSGLLSS
81	CM	ISSGLLSGRSDNH
82	CM	LSGRSGNH
83	CM	LSGRSDIH
84	CM	LSGRSDQH
85	CM	LSGRSDTH
86	CM	LSGRSDYH
87	CM	LSGRSDNP
88	CM	LSGRSANP
89	CM	LSGRSANI
90	CM	LSGRSDNI
91	CM	ISSGLLSGRSANPRG
92	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG

서열 번호	설명	서열
94	CM	ISSGLLSGRSDDH
95	CM	ISSGLLSGRSDIH
96	CM	ISSGLLSGRSDTH
97	CM	ISSGLLSGRSDYH
98	CM	ISSGLLSGRSDNP
99	CM	ISSGLLSGRSANP
100	CM	ISSGLLSGRSANI
101	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
107	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	CM	ISSGLLSGRSDNI
110	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	CM	ISSGLLSGRSGNH
112	복합체-67 제 1 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCC ATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGA GGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGC AGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCT GAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCA TGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGC CAGAATCAGAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACA GCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACAC CGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTA CTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGTGGC GGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAA ACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGG CAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAGCCA GATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCT GGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGT ACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCT TGGAGGTGGCGGTAGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGA CTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCG GCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCC GGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACA CCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAAGGAC AACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCA GGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTATGACT ACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGTCTGC TGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGC AAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ATTACTTTCCCGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTG ACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCT GTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAG

[0385]

서열 번호	설명	서열
		GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAA GACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTG TCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACA CACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCT GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCCGGCAAA
113	제 2 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타 이드	CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGA ATAGAGAACAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTAT CTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGA TCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCTGTCATACTGAGTGTCTCCCC CGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTATTGGGA CTAACATACACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCCGCGCCT GCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCT TTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAG CGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACA ACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAACTGAAACG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
114	제 3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타 이드	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGG CGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGA TGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTC CCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCA GCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTG CCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA GAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAA CTACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAA
115	경쇄	CAAGGACAATCTGGACAGGGCCTGAGCTGTGAAGGCTGGGCCATGA

[0386]

서열 번호	설명	서열
		ATAGAGAGCAGTGCAGAGCTGGCGGCGGATCTTCTGGCGGCTCTAT CTCTTCTGGACTGCTGAGCGGCAGAAGCGATCAACACGGCGGAGGC TCTCAGATCCTGCTGACACAGAGCCCCGTGATCCTGTCTGTGTCTCC TGGCGAGAGAGTGTCCTTCAGCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGC ACCAACATCCACTGGTATCAGCAGCGGACCAACGGCAGCCCCAGAC TGCTGATTAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGCATCCCCAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAACA GCGTGGAAAGCGAGGATATCGCCGACTACTACTGCCAGCAGAACAA CAACTGGCCCACCACCTTTGGAGCCGGCACCAAGCTGGAACTGAAG AGAACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGA GCAGCTGAAAAGCGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAATAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAGGCC GACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGT
116	스페이서	QGQSGS
117	스페이서	QGQSGQG
118	스페이서	QGQSGS
119	스페이서	QGQSGQG
120	스페이서가 없는 제 1 폴리펩타이드	VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS***QTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVL***GGGGS***QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQ DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	블랭크	
122	항-CD3 scFv V16 복합체-57 CI106	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS
123	CI106 - 중쇄 CRF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSQ TVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWG

[0387]

서열 번호	설명	서열
		QGTLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	Fc Mut 4	PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
125	CI106 중쇄 - CRF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N	CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATT GCGGAGGGATCACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTG GTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATGATCATGGCGGCGGTTCTCAAAC TGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCGTCTCCCCTGGGGGAACAG TCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACCAGTAAC TATGCCAATTGGGTACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATT GATAGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTC AGCGGAAGCATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGC CCAAGCTGATGATGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCA ACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGG CGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAAGT CCAACTGGTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTC CCTCAAACTCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACG CGATGAATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGT AGGACGAATCCGATCAAAATACAACAACTACGCTACTTATTACGCTGA TTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATAGCAAGAATA CGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAAACTGAGGATACCGCTGTGT ATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCTCTTGGT TCGCTTATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGG TGGTGGATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGT GCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTT AGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCA AAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGA TTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACA GCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGAT ACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGA ATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCT AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC

[0388]

서열 번호	설명	서열
		TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA
126	링커	(GGGGS)n
127	링커	GGGSSGGS
128	VH1 CDR1 복합체-57 CI106(대조군)	TYAMN
129	VH1 CDR2 복합체-57 CI106(대조군)	RIRSKYNNYATYYADSVKD
130	VH1 CDR3 복합체-57 CI106(대조군)	HGNFGNSYVSWFAY
131	VL1 CDR1 복합체-57 CI106(대조군)	RSSTGAVTTSNYAN
132	VL1 CDR2 복합체-57 CI106(대조군)	GTNKRAP
133	VL1 CDR3 복합체-57 CI106(대조군)	ALWYSNLWV
134	VH1 도메인 복합체-57 CI106(대조군)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVY YCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
135	VL1 도메인 복합체-57 CI106(대조군)	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVL
136	복합체-57 말단 라이신이 있는 제 1 폴리펩타이드	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSQ TVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV

[0389]

서열 번호	설명	서열
		HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
137	말단 라이신 이 없는 제 1 폴리펩타이드 복합체-67	[GQSGSVSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS**QTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVF GGGTKLTVL**GGGGS**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
138	블랭크	
139	복합체-67 말단 라이신이 없는 제 1 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCC ATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGA GGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGC AGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCT GAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCA TGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGC CAGAATCAGAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACA GCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACAC CGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTA CTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGTGGC GGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAA ACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGG CAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGA GGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAGCCA GATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCT GGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGT ACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCT TGGAGGTGGCGGTAGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGA CTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCG GCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCC GGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACA CCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAAGGAC

[0390]

[0391]

서열 번호	설명	서열
		AACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCA GGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTATGACT ACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGTCTGC TGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGC AAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ATTACTTTCCCGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTG ACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCT GTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAA GACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTG TCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACA CACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCT GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAAT GGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCCGGC
140	제 3 폴리펩타이드 w/C-말단 라이신 복합체-67 복합체-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
141	C-말단 라이신을 암호화하는 코돈이 없는 제 3 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타 이드 복합체-67 복합체-57	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGG CGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGA TGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTC CCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCA GCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTG CCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA GAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAA CTACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCC TGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGC
142	복합체-57 제 1	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTGGAATT GTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTG GTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCGGATCCCAGAC

[0392]

서열 번호	설명	서열
	폴리펩타이드(C-말단 라이신에 대한 코돈이 없음)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드	CGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCCGTGTCTCCTGGCGGCACA GTGACCCTGACATGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCA ACTACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCTAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGA TTCAGCGGCTCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAG GCGCCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTA CAGCAACCTGTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTT GGCGGAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGATCT GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTCAGCCAGGCG GCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCACC TACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAAT GGGTCGGACGGATCAGAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCA AGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCACCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTA GTTCTGGCGGCGGAGGTTCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCC TGGACTGGTGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCGTGT CCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCC CCAGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGC AACACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAA GGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGA GCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTAT GACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGT CTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAG CAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTC AAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGC GGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACA CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCC GTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAG AACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAT CCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACA ATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAG ATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAG GTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTG CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCTCTGAGCCCCGGC
143	VH1 CDR3 복합체-57 CI106(대조군)	HGFGNSYVSWFAY

[0393]

서열 번호	설명	서열
144	VL1 CDR1 복합체-57 CI106(대조군)	GSSTGAVTSGYYPN
145	VL1 CDR1 복합체-57 CI106(대조군)	RSSGAVTTSNYAN
146	VL1 CDR3 복합체-57 CI106(대조군)	ALWYSNRWV
147	항-CD3 마스킹 모이어티	VYYCGGNESLCGERR
148	항-CD3 마스킹 모이어티	WYSGGCEAFCGILSS
149	항-CD3 마스킹 모이어티	FMCQQRMWGNEFCHQ
150	항-CD3 마스킹 모이어티	YSLWGCEWGCDRGLY
151	항-CD3 마스킹 모이어티	YSACEMFGEVECCFC
152	항-CD3 마스킹 모이어티	GYSGGCEFRCYQLYS
153	항-CD3 마스킹 모이어티	KFCHCGYYCRVCTLK
154	항-CD3 마스킹 모이어티	LGCNNLWGNEFCHPV
155	항-CD3 마스킹 모이어티	GHPCWGNESYCHTHS
156	CM	ALAHGLF
157	CM	APRSALAHGLF
158	CM	ISSGLLSGRSNI
159	CM	LSGRSNI
160	복합체-57 제 1 폴리펩타이드(C-말단 라이신에 대한 코돈이 있음)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTGGAATT GTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTG GTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCGGATCCCAGAC CGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCCGTGTCTCCTGGCGGCACA GTGACCCTGACATGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCA ACTACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCTAGAGG ACTGATCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGA TTCAGCGGCTCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAG GCGCCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTA CAGCAACCTGTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTT GGCGGAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGATCT GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTCAGCCAGGCG GCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCACC

서열 번호	설명	서열
		TACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAAT GGGTCGGACGGATCAGAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCA AGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCACCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTA GTTCTGGCGGCGGAGGTTCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCC TGGACTGGTGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCGTGT CCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCC CCAGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGC AACACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAA GGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGA GCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTAT GACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGT CTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAG CAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTC AAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGC GGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACA CACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCC GTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAG AACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGAT CCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACA ATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAG ATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAG GTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCG TGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTG CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA

[0394]

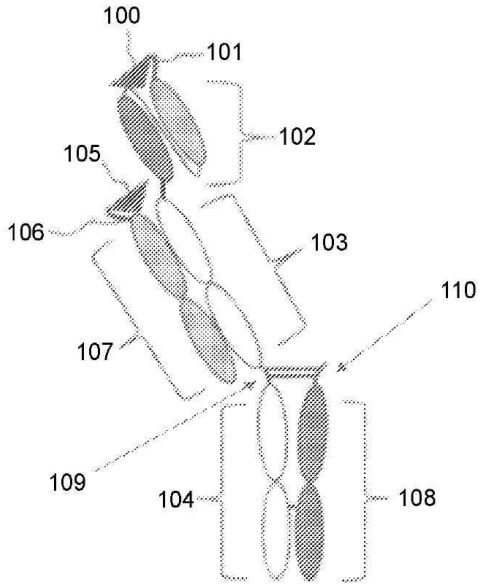
[0395] 본 개시내용은 본 명세서에 기술된 양태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 기술된 것 외에 본 개시내용의 다양한 변형이 전술한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 수정은 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하도록 의도되었다.

[0396] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌(예를 들어, 간행물, 특허 또는 특허 출원)은 각각의 개별 참고문헌(예를 들어, 간행물, 특허 또는 특허 출원)이 구체적이고 개별적으로 모든 목적을 위해 전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 원용되도록 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

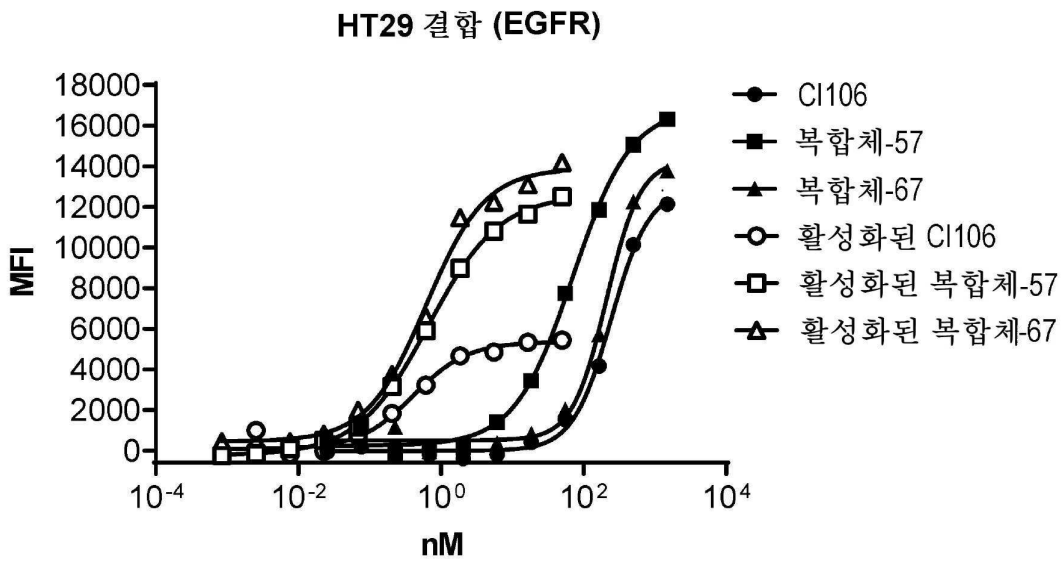
[0397] 일부 양태는 다음 청구범위 내에 있다.

도면

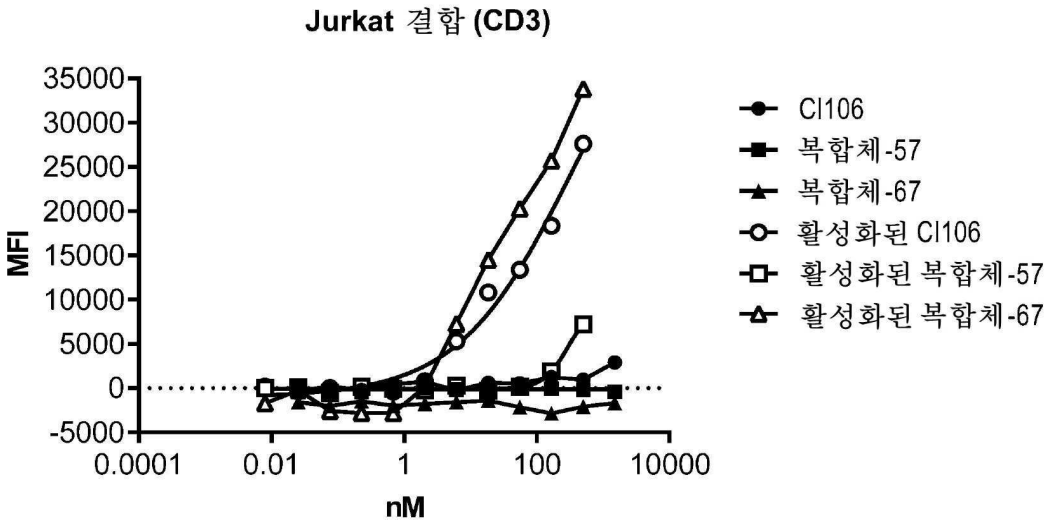
도면1


100
101
102
105
106
103
110
107
109
104
108

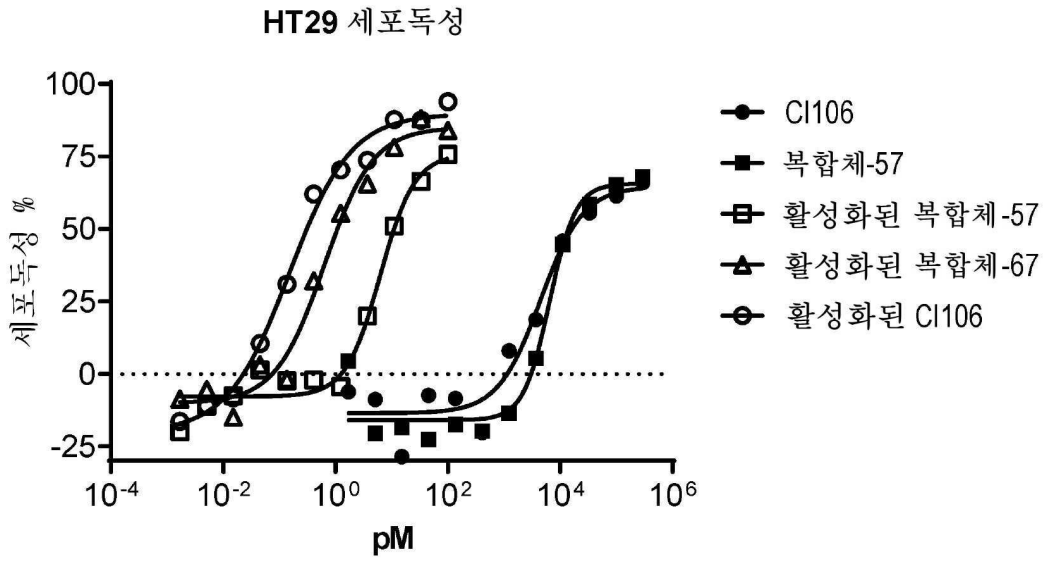
도면2a


HT29 결합 (EGFR)
MFI
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10-4
10-2
100
102
104
nM
CI106
복합체-57
복합체-67
활성화된 CI106
활성화된 복합체-57
활성화된 복합체-67

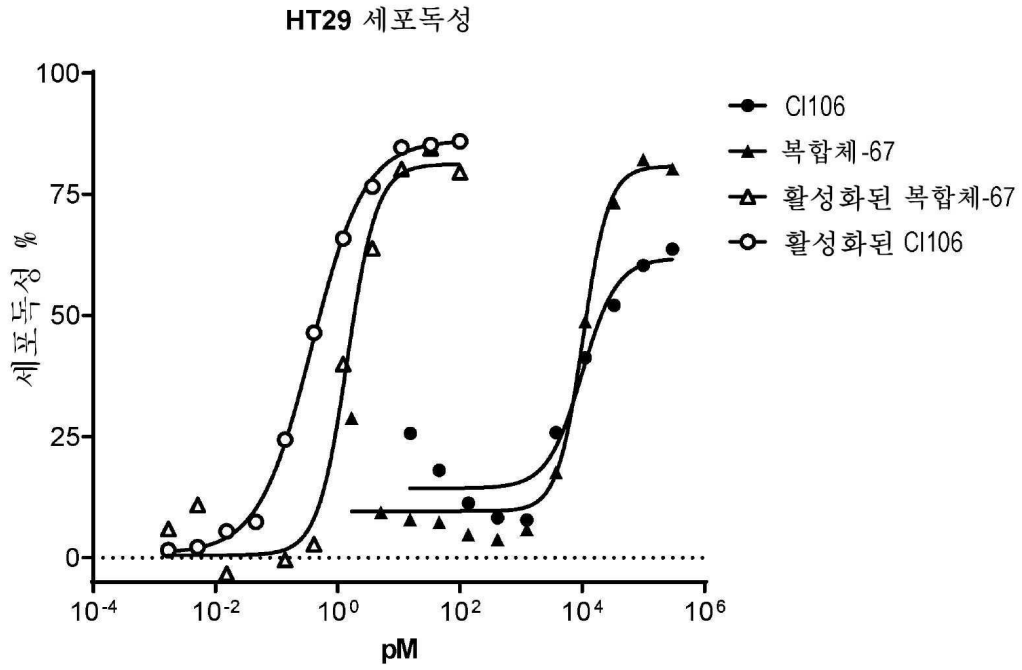
도면2b


Jurkat 결합 (CD3)
MFI
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
0.0001
0.01
1
100
10000
nM
CI106
복합체-57
복합체-67
활성화된 CI106
활성화된 복합체-57
활성화된 복합체-67

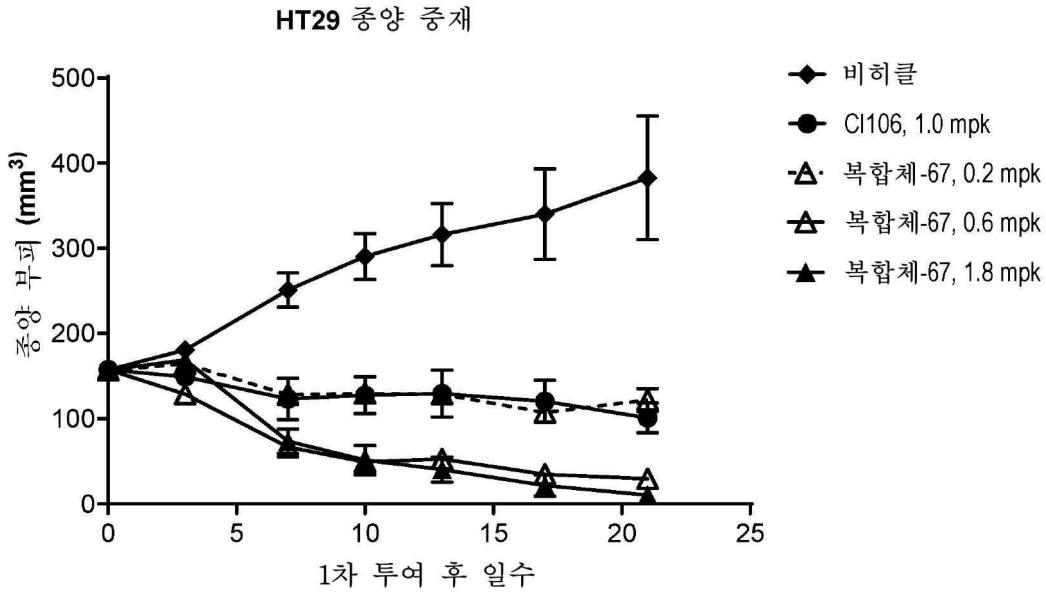
도면3a


HT29 세포독성
세포독성 %
100
75
50
25
0
-25
10-4
10-2
100
102
104
106
pM
CI106
복합체-57
활성화된 복합체-57
활성화된 복합체-67
활성화된 CI106

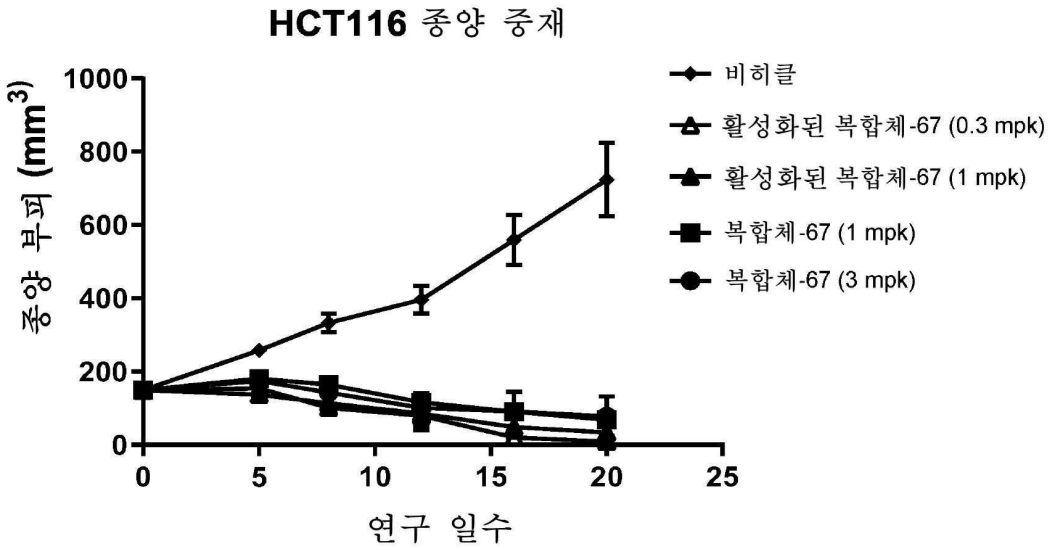
도면3b


HT29 세포독성
100
75
50
25
0
세포독성 %
10-4
10-2
100
102
104
106
pM
CI106
복합체-67
활성화된 복합체-67
활성화된 CI106

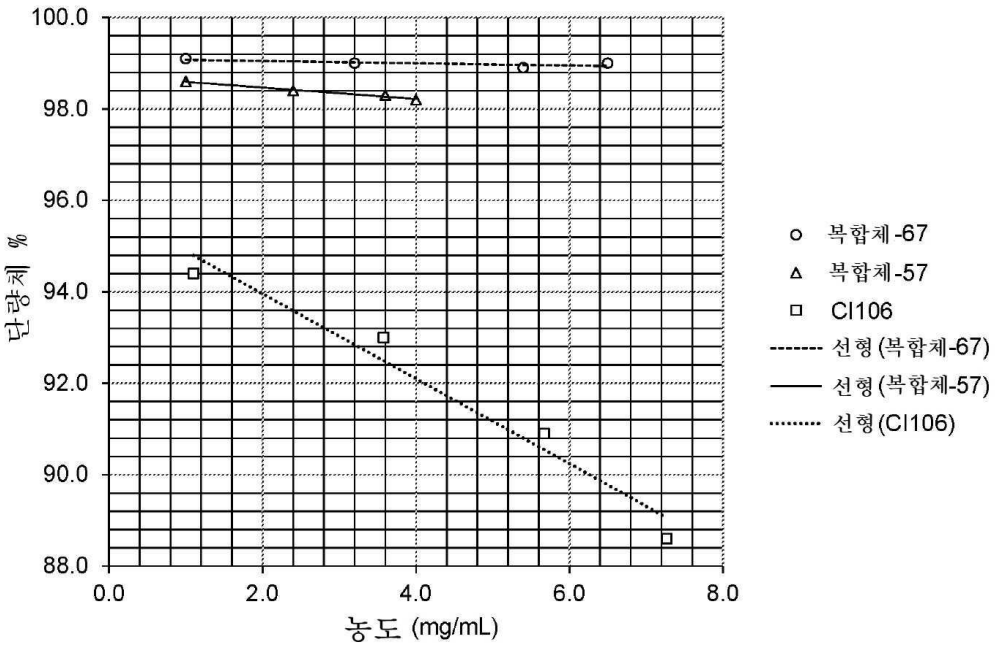
도면4


HT29 종양 중재
500
400
300
200
100
0
종양 부피 (mm3)
0
5
10
15
20
25
1차 투여 후 일수
비히클
CI106, 1.0 mpk
복합체-67, 0.2 mpk
복합체-67, 0.6 mpk
복합체-67, 1.8 mpk

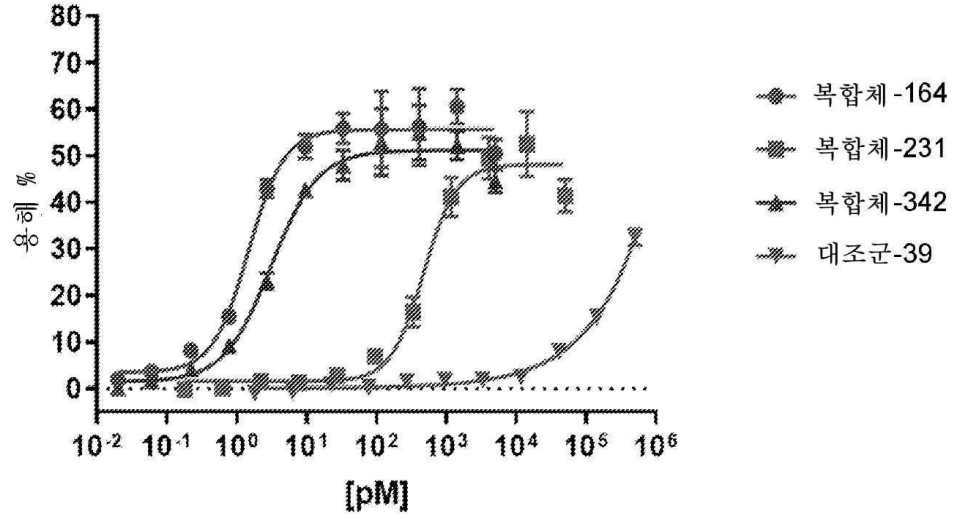
도면5


HCT116 종양 중재
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
연구 일수
비히클
활성화된 복합체-67 (0.3 mpk)
활성화된 복합체-67 (1 mpk)
복합체-67 (1 mpk)
복합체-67 (3 mpk)

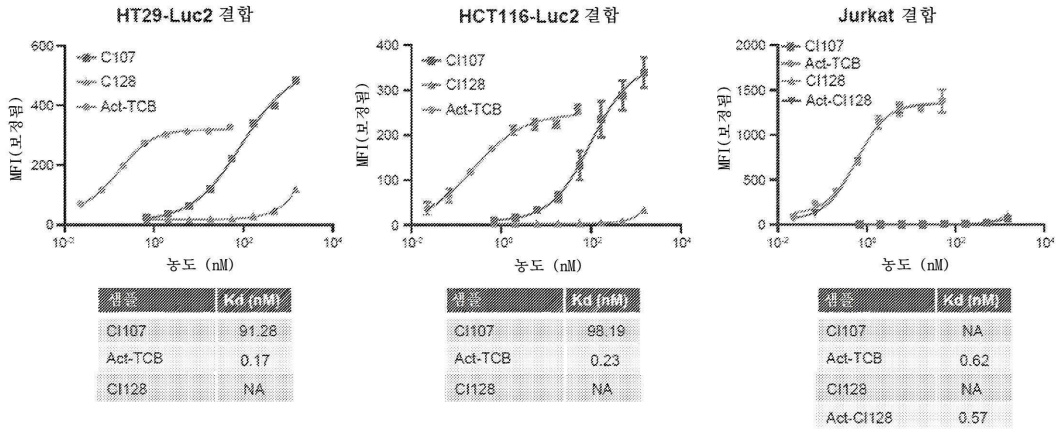
도면6


100.0
98.0
96.0
94.0
92.0
90.0
88.0
단량체 %
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
농도 (mg/mL)
복합체-67
복합체-57
CI106
선형 (복합체-67)
선형 (복합체-57)
선형 (CI106)

도면7



도면8



샘플	Kd (nM)
Cl107	91.28
Act-TCB	0.17
Cl128	NA

a

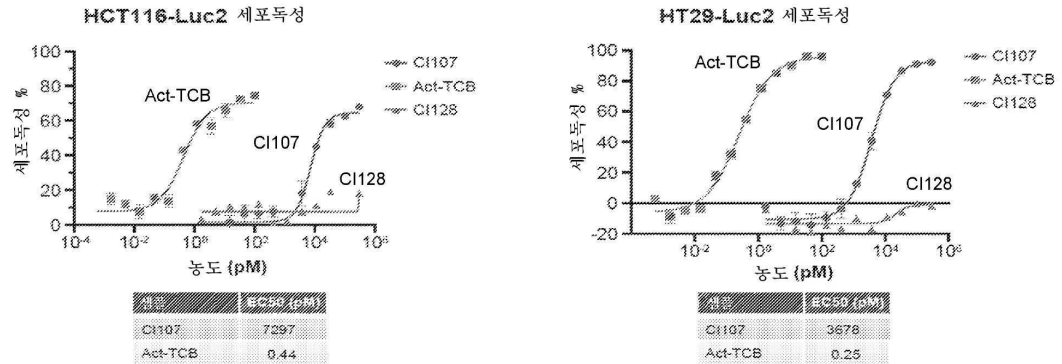
샘플	Kd (nM)
Cl107	98.19
Act-TCB	0.23
Cl128	NA

b

샘플	Kd (nM)
Cl107	NA
Act-TCB	0.62
Cl128	NA
Act-Cl128	0.57

c

도면9ab



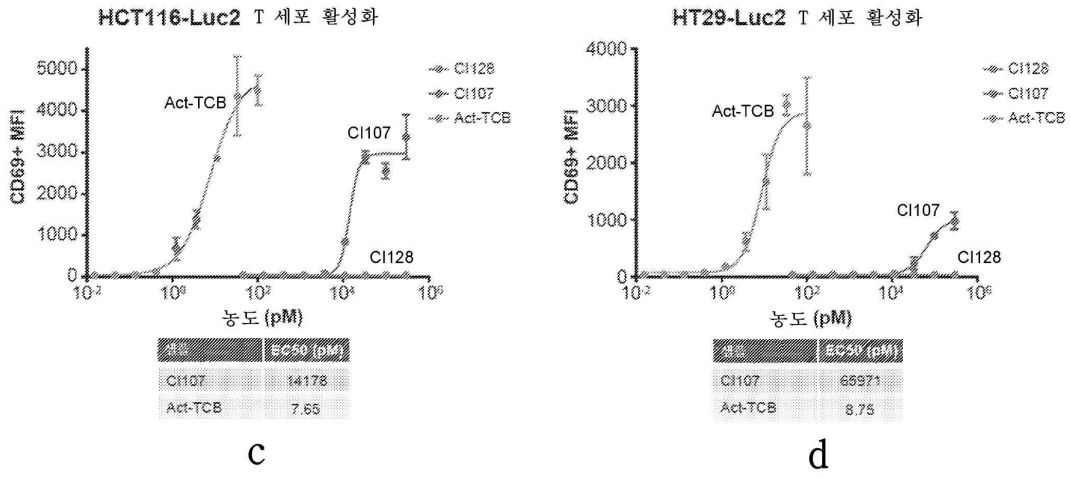
샘플	EC50 (pM)
Cl107	7297
Act-TCB	0.44

a

샘플	EC50 (pM)
Cl107	3678
Act-TCB	0.25

b

도면9cd



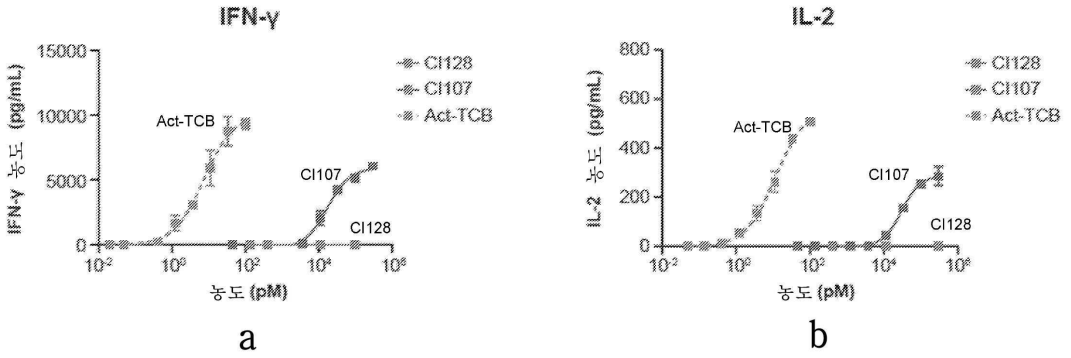
	EC50 (pM)
Cl107	14178
Act-TCB	7.65

c

	EC50 (pM)
Cl107	68971
Act-TCB	8.75

d

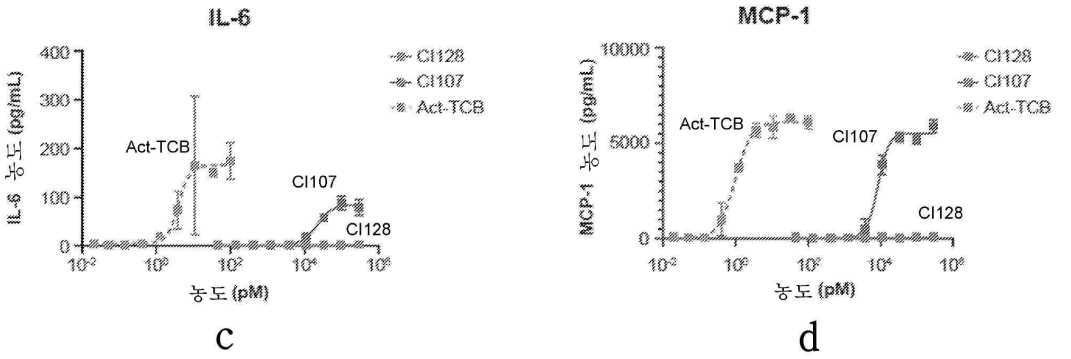
도면10ab



a

b

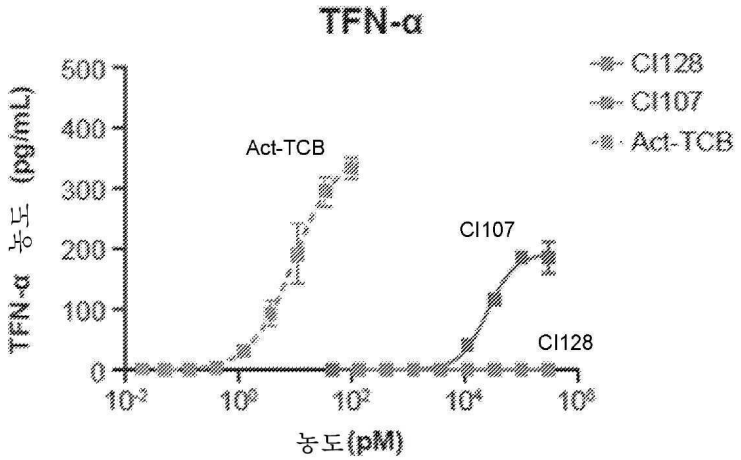
도면10cd



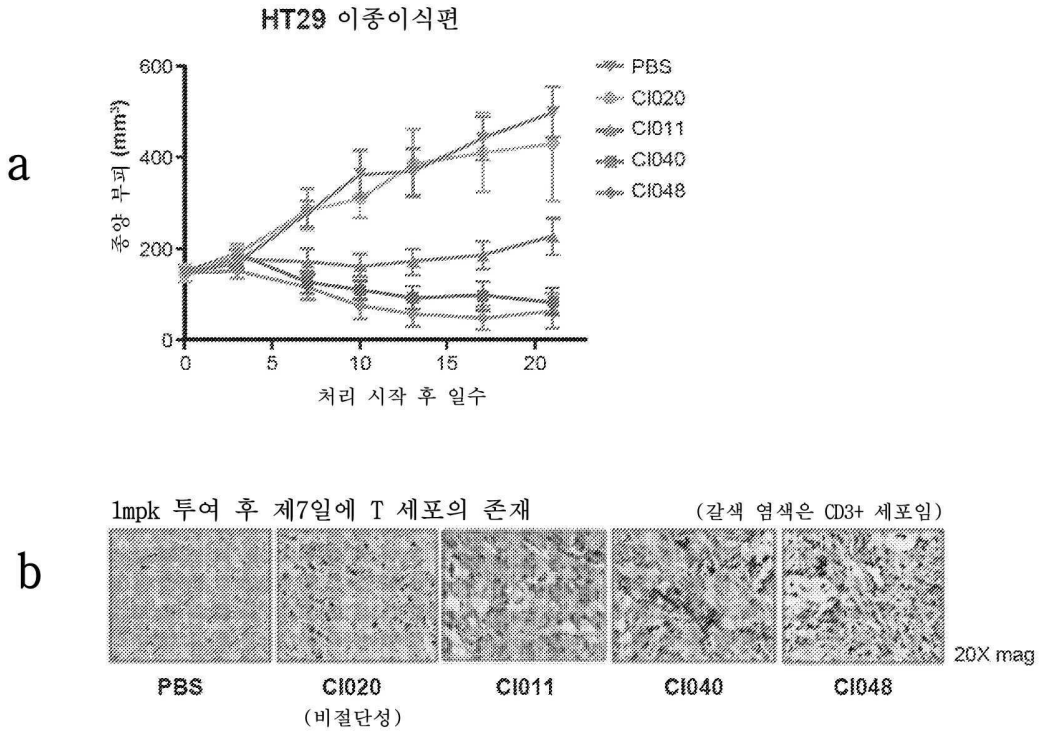
c

d

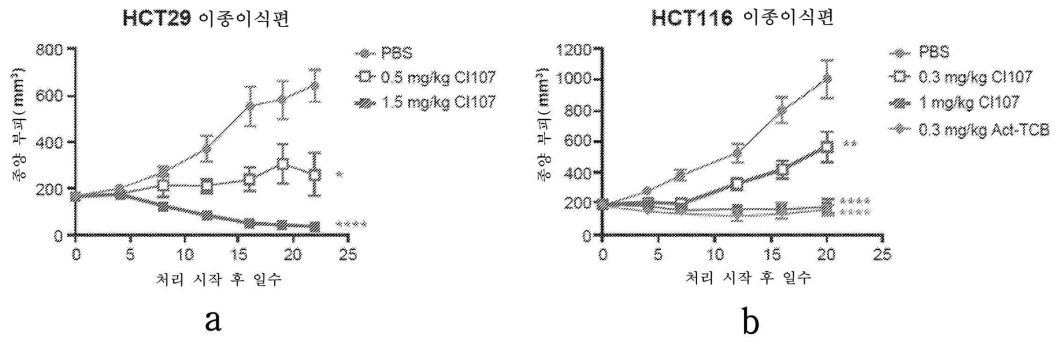
도면10e



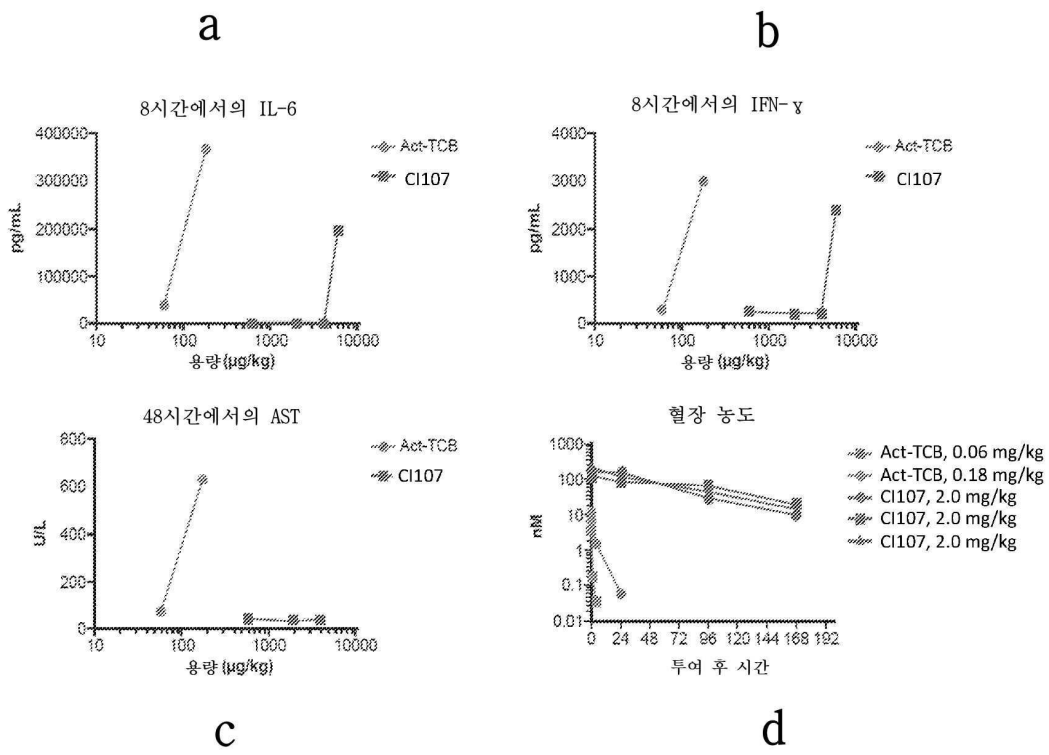
도면11



도면12



도면13


a
8시간에서의 IL-6
pg/mL
400000
300000
200000
100000
0
10
100
1000
10000
용량(μg/kg)
Act-TCB
CI107
b
8시간에서의 IFN-γ
pg/mL
4000
3000
2000
1000
0
10
100
1000
10000
용량(μg/kg)
Act-TCB
CI107
c
48시간에서의 AST
U/L
800
600
400
200
0
10
100
1000
10000
용량(μg/kg)
Act-TCB
CI107
d
혈장 농도
nM
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 24 48 72 96 120 144 168 192
투여 후 시간
Act-TCB, 0.06 mg/kg
Act-TCB, 0.18 mg/kg
CI107, 2.0 mg/kg
CI107, 2.0 mg/kg
CI107, 2.0 mg/kg

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.