(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005741
(43) 공개일자 2024년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2024.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/55* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/54 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7038337
(22) 출원일자(국제) 2022년04월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/059414
(87) 국제공개번호 WO 2022/214653
국제공개일자 2022년10월13일
(30) 우선권주장
21305462.0 2021년04월09일
유럽특허청(EPO)(EP)
21200350.3 2021년09월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
오제 이뮈노테라프틱스
프랑스공화국, 44200 낭뜨, 불르바르 브노니 굴랭 22
(72) 발명자
포이리에, 니콜라스
프랑스, 44200 낭뜨, 불르바르 브노니 굴랭 22, 오제 이뮈노테라프틱스 내.
모렐로, 오로르
프랑스, 44200 낭뜨, 불르바르 브노니 굴랭 22, 오제 이뮈노테라프틱스 내.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

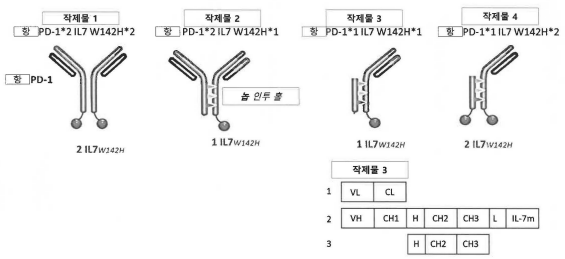
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **특성이 향상된 이작용성 분자용 신규한 스캐폴드**

(57) 요 약

본 발명은 특정 스캐폴드를 갖는 이작용성 분자 및 이의 용도에 관한 것이다

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 14/55 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
C07K 2319/74 (2013.01)
(72) 발명자
메리, 캐롤라인
프랑스, 44200 낭뜨, 불르바르 브노니 굴랭 22, 오제 이뮈노테라프틱스 내.
세이띠, 마고
프랑스, 44200 낭뜨, 불르바르 브노니 굴랭 22, 오제 이뮈노테라프틱스 내.

명 세 서

청구범위

청구항 1

면역 세포 표면 상에 특이적으로 발현된 표적에 결합하는 단일 항원 결합 도메인 및 단일 면역-자극 사이토카인을 포함하는 이작용성 분자로서,

상기 분자는, 제1 Fc 사슬의 C-말단을 통해, 선택적으로는 펩티드 링커를 통해, N-말단으로 공유결합으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함하고;

i) 면역-자극 사이토카인은, 선택적으로는 펩티드 링커를 통해, 상기 제1 Fc 사슬의 C-말단에 공유적으로 연결되거나; 또는 ii) 단일 항원 결합 도메인은 중쇄 및 경쇄 가변 사슬을 포함하고, 면역-자극 사이토카인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 연결되고;

면역 세포 표면에 특이적으로 발현되는 표적은 PD-1, CD28, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CD3, PDL2 및 PDL1로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

면역-자극 사이토카인은 IL-2(IL은 인터루킨임), IL-4, IL-5, IL-6, IL-12A, IL-12B, IL-13; IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24; IFNα, IFNβ, BAFF, LTα 및 LTβ, 또는 야생형 단백질과 적어도 80%의 동일성을 갖는 이들의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

면역-자극 사이토카인이 제1 Fc 사슬의 C-말단에, 바람직하게는 N-말단에 의해, 연결되는, 이작용성 분자.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬이 이종이량체 Fc 도메인, 특히 노브-인투-홀 이종이량체 Fc 도메인을 형성하는 것인, 이작용성 분자.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

면역-자극 사이토카인이 IL-2, IL-15 및 IL-21, 또는 야생형 단백질과 적어도 80%의 동일성을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

면역-자극 사이토카인이 IL-2 또는 서열번호 87과 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 서열번호 87에 대해 다음 치환 조합 중 어느 하나를 포함하는 IL-2 변이체로부터 선택되는, 이작용성 분자: R38E 및 F42A; R38D 및 F42A; F42A 및 E62Q; R38A 및 F42K; R38E, F42A, 및 N88S; R38E, F42A, 및 N88A; R38E, F42A, 및 V91E; R38E, F42A, 및 D84H; H16D, R38E 및 F42A; H16E, R38E 및 F42A; R38E, F42A 및 Q126S; R38D, F42A 및 N88S; R38D, F42A 및 N88A; R38D, F42A 및 V91E; R38D, F42A, 및 D84H; H16D, R38D 및 F42A; H16E, R38D 및 F42A; R38D, F42A 및 Q126S; R38A, F42K, 및 N88S; R38A, F42K, 및 N88A; R38A, F42K, 및 V91E; R38A, F42K, 및 D84H; H16D, R38A, 및 F42K; H16E, R38A, 및 F42K; R38A, F42K, 및 Q126S; F42A, E62Q, 및 N88S; F42A, E62Q, 및 N88A; F42A, E62Q, 및 V91E; F42A, E62Q, 및 D84H; H16D, F42A, 및 E62Q; H16E, F42A, 및 E62Q; F42A, E62Q, 및 Q126S; R38E, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 C125A; R38A,

F42K, 및 C125A; R38E, F42A, N88S, 및 C125A; R38E, F42A, N88A, 및 C125A; R38E, F42A, V91E, 및 C125A; R38E, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38E, F42A, 및 C125A; H16E, R38E, F42A, 및 C125A; R38E, F42A, C125A 및 Q126S; R38D, F42A, N88S, 및 C125A; R38D, F42A, N88A, 및 C125A; R38D, F42A, V91E, 및 C125A; R38D, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38D, F42A, 및 C125A; H16E, R38D, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, C125A, 및 Q126S; R38A, F42K, N88S, 및 C125A; R38A, F42K, N88A, 및 C125A; R38A, F42K, V91E, 및 C125A; R38A, F42K, D84H, 및 C125A; H16D, R38A, F42K, 및 C125A; H16E, R38A, F42K, 및 C125A; R38A, F42K, C125A 및 Q126S; F42A, E62Q, N88S, 및 C125A; F42A, E62Q, N88A, 및 C125A; F42A, E62Q, V91E, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 E62Q, 및 C125A; H16E, F42A, E62Q, 및 C125A; F42A, E62Q, C125A 및 Q126S; F42A, N88S, 및 C125A; F42A, N88A, 및 C125A; F42A, V91E, 및 C125A; F42A, D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 C125A; H16E, F42A, 및 C125A; F42A, C125A 및 Q126S; F42A, Y45A 및 L72G; 및 T3A, F42A, Y45A, L72G 및 C125A.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역-자극 사이토카인이 IL-15 또는 서열번호 88과 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 이러한 IL-15 변이체가 서열번호 88에 대하여 이하의 치환: N1D, V3I, V3M, V3R, N4D, D8N, D8A, K11L, K11M, K11R, D30N, D61N, E64Q, N65D, N71D, N71S, N72D, N72A, N72R, N72Y, S73I, N77A, N79D, N79E, N79S, Q108E, N112D, N112H, N112M 및 N112Y, preferably N4D, D61N, N65D, Q108E, N4D/N65D, D30N/N65D, D30N/E64Q, D30N/E64Q/N65D, N1D, N4D, D8N, D30N, D61N, E64Q, N65D, Q108E, N1D/D61N, N1D/E64Q, N4D, D61N, N4D/E64Q, D8N/D61N, D8N/E64Q, D61N/E64Q, N1D/D30N, E64Q/Q108E, N1D/N4D/D8N, D61N/E64Q/N65Q, N1D/D61N/E64Q/Q108E, N4D/D61N, N4D/D61N/E64Q/Q108E, N1D/N65D, N1D/Q108E, N4D/D30N, D30N/Q108E, N65D/Q108E, D30N/Q180E, E64Q/N65D, D61N/E64Q/N65D, N1D/N4D/N65D, N71S/N72A/N77A, 및 N4D/D61N/N65D, 바람직하게는 D30N/E64Q/N65D 중 어느 하나를 포함하는 것인, 이작용성 분자.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 4항 중 어느 한 항에 있어서,

면역-자극 사이토카인이 IL-21 또는 서열번호 89와 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 이러한 IL-21 변이체가 서열번호 89에 대하여 이하의 치환: R5A, R5D, R5E, R5G, R5H, R5I, R5K, R5L, R5M, R5N, R5Q, R5S, R5T, R5V, R5Y, I8A, I8D, I8E, I8G, I8N, I8S, R9A, R9D, R9E, R9G, R9H, R9I, R9K, R9L, R9M, R9N, R9Q, R9S, R9T, R9V, R9Y, R11D, R11S, Q12A, Q12D, Q12E, Q12N, Q12S, Q12T, Q12V, L13D, I14A, I14D, I14S, D15A, D15E, D15I, D15M, D15N, D15Q, D15S, D15T, D15V, I16D, I16E, Q19D, Y23D, R65D, R65G, R65P, I66D, I66G, I66P, N68Q, V69D, V69G, V69P, S70E, S70G, S70P, S70Y, S70T, K72D, K72G, K72P, K72A, K73A, K73D, K73E, K73G, K73H, K73I, K73N, K73P, K73Q, K73S, K73V, K75D, K75G, K75P, R76A, R76D, R76E, R76G, R76H, R76I, R76K, R76L, R76M, R76N, R76P, R76Q, R76S, R76T, R76V, R76Y, K77D, K77G, K77P, P78D, P79D, S80G, S80P, E109K, R110D, K112D, S113K, Q116A, Q116D, Q116E, Q116I, Q116K, Q116L, Q116M, Q116N, Q116S, Q116T, Q116V, K117D, I119A, I119D, I119E, I119M, I119N, I119Q, I119S, I119T, H120D 및 L123D, 바람직하게는 R5E 및 R76E, R5E 및 R76A, R5A 및 R76A, R5Q 및 R76A, R5A 및 R76E, R5Q 및 R76E, R9E 및 R76E, R9A 및 R76E, R9E 및 R76A, R9A 및 R76A, D15N 및 S70T, D15N 및 I71L, D15N 및 K72A, D15N 및 K73A, S70T 및 K73Q, S70T 및 R76A, S70T 및 R76D, S70T 및 R76E, I71L 및 K73Q, I71L 및 R76A, I71L 및 R76D, I71L 및 R76E, K72A 및 K73Q, K72A 및 R76A, K72A 및 R7 6D, K72A 및 R76E, K73A 및 R76A, K73A 및 R76D, 또는 K73A 및 R76E 중 어느 하나를 포함하는 것인, 이작용성 분자.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 도메인이 Fab 도메인, Fab', 단일쇄 가변 단편(scFV) 또는 단일 도메인 항체(sdAb)인, 이작용성 분자.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

면역 세포 표면에서 특이적으로 발현되는 표적이 PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 및 TIM3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 도메인이 PD-1에 결합하는, 이작용성 분자.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 또는 62의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64 또는 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어진, 이작용성 분자.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 따른 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 핵산 서열 또는 단리된 핵산 분자의 군.

청구항 13

청구항 12에 따른 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 따른 이작용성 분자, 청구항 12에 따른 단리된 핵산 또는 청구항 13에 따른 숙주 세포를, 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물.

청구항 15

약제로서 사용하기 위한, 특히 암 또는 감염 질환의 치료에서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 청구항 11항 중 어느 한 항에 따른 이작용성 분자, 청구항 12에 따른 단리된 핵산, 청구항 13에 따른 숙주 세포 또는 청구항 14의 약학 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

이펙터 기억 줄기 유사 T 세포의 자극에 의해 암 또는 바이러스 감염의 치료에서 사용하기 위한, 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 면역요법 분야에 관한 것이다. 본 발명은 이작용성 분자용 신규한 스캐폴드 및 의약에서의 이들의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 이작용성 분자는 현재 면역학, 특히 종양학 분야에서 발전의 대상이다. 실제로, 그들은 두 표적의 공동 참여를 통해 새로운 약리학적 특성을 가져오고, 종양으로의 표적화된 재배치 덕분에 두 개의 별개 분자의 조합에 비해 안전성 프로파일을 증가시킬 수 있으며 잠재적으로 단일 약물 제품과 관련된 개발 및 제조 비용을 줄일 수 있다. 그러나, 이러한 분자는 유리하지만 몇 가지 불편함을 나타낼 수 있다. 이작용성 분자의 설계는 결합 친화도 및 특이성, 폴딩 안정성, 용해도, 약동학, 이펙터 기능, 추가 도메인 부착과의 호환성 및 임상 개발과 호환되는 생산 수율 및 비용과 같은 몇 가지 주요 속성을 내포할 필요가 있다.

[0003] PD-1을 길항하고 IL-7에 연결된 항체를 기반으로 하는 이작용성 분자, 또는 다른 면역치료제가 특히 WO 2020/127377 및 WO 2020/127366에 개시되어 있다.

[0004] 그러나, 이작용성 분자를 위한 개선된 스캐폴드가 아직도 강하게 요구되고 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 특정의 스캐폴드를 갖고, 면역 세포 표면 상에 특이적으로 발현된 표적에 결합하는 단일 1가 항원 결합 도메인 및 단일 면역-자극 사이토카인을 포함하는 이작용성 분자에 관한 것이다. 이 스캐폴드는 본질적으로 이량체 Fc 도메인, Fc 도메인의 한 단량체의 N 말단(terminal end)에 연결된 면역 세포 표면 상에 특이적으로 발현된 표적에 결합하는 단일 1가 항원 결합 도메인 및 i) Fc 도메인의 동일한 단량체의 C 말단에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인 또는 ii) 중쇄 가변 사슬 및 경쇄 가변 사슬을 포함하는 단일 1가 항원 결합 도메인 중 어느 하나로 구성되고, 단일 면역-자극 사이토카인은 항원 결합 도메인의 경쇄의 C 말단에 연결된다.

[0006] 이러한 특정의 스캐폴드는 개선된 약동학적 프로파일과 연관되어 있다. 이러한 개선은 IL-2; IL-7, IL-15 및 IL-21와 같은 다양한 면역 자극 부분을 포함하는 이중기능성 분자에서 관찰되었다. 면역-자극 사이토카인이 없으면 이 스캐폴드에서는 개선이 관찰되지 않기 때문에 약동학 프로파일의 개선은 놀라운 일이다. 이 특별한 지지체를 가진 이작용성 분자는 동일한 세포에 있는 두 표적의 시스 표적화에 유리하여 표적 세포에 면역-자극 사이토카인을 선택적으로 전달할 수 있다. 또한, IL-7을 갖는 이작용성 분자와 관련하여, 이들 분자는 상승적 활성화 및 더 나은 생체내 항종양 효능을 유도할 수 있다. 마지막으로, 놀랍게도,특정의 스캐폴드를 갖는 이작용성 분자는 생산성이 더 양호하며 산업 규모 및 안전성에서의 생산에 있어 주요 이점인 사슬 오류로 인한 부산물을 방지한다. 게다가, 개선된 약동학 프로파일 및 더 양호한 생산성 외에도, 면역 활성 측면에서 큰 관심을 끄는 종양-반응성 종양 내 T 세포의 서브세트인, T 세포와 같은 효과기 기억 줄기의 활성을 향상시키는 일부 화합물(특히 IL7을 갖는 화합물)에 대해 새롭고 유리한 생물학적 효율성이 확인되었다.

[0007] 따라서, 본 발명은 면역 세포 표면 상에 특이적으로 발현된 표적에 결합하는 단일 항원 결합 도메인 및 단일 면역-자극 사이토카인을 포함하는 이작용성 분자로서,

[0008] 상기 분자는, 제1 Fc 사슬의 C-말단을 통해, 선택적으로는 펩티드 링커를 통해, N-말단으로 공유결합으로 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 단량체, 및 항원 결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함하고;

[0009] i) 면역-자극 사이토카인은, 선택적으로는 펩티드 링커를 통해, 상기 제1 Fc 사슬의 C-말단에 공유적으로 연결되거나; 또는 ii) 단일 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 사슬 및 경쇄 가변 사슬을 포함하고, 면역-자극 사이토카인은 경쇄의 C-말단에 공유적으로 연결되거나;

[0010] 면역 세포 표면에 특이적으로 발현되는 표적은 PD-1, CD28, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CD3, PDL2, 및 PDL1로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0011] 면역-자극 사이토카인은 IL-2(IL은 인터루킨임), IL-4, IL-5, IL-6, IL-12A, IL-12B, IL-13; IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24; IFNα, IFNβ, BAFF, LTα 및 LTβ, 또는 야생형 단백질 또는 이의 세포외 단편 및 IL-7과 적어도 80%의 동일성을 갖는 이들의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 이작용성 분자에 관한 것이다.

[0012] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 제1 Fc 사슬의 C-말단에, 바람직하게는 N-말단에 연결된다.

[0013] 특정의 양태에서, 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬은 이종이합체 Fc 도메인, 특히 노브-인투-홀(knob-into-hole) 이종이합체 Fc 도메인을 형성한다.

[0014] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인은 IL-2, IL-15 및 IL-21, 또는 야생형 단백질, 및 IL-7과 적어도 80% 동일성을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0015] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은, 예를 들어, 서열번호 1에 제시된 서열 하에 기재된 것과 같은 IL-7이다.

[0016] 또 다른 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-2 또는 서열번호 87과 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 서열번호: 87에 대해 하기 치환 중 어느 하나를 포함하는 IL-2 변이체로부터 선택된다: R38E 및

F42A; R38D 및 F42A; F42A 및 E62Q; R38A 및 F42K; R38E, F42A, 및 N88S; R38E, F42A, 및 N88A; R38E, F42A, 및 V91E; R38E, F42A, 및 D84H; H16D, R38E 및 F42A; H16E, R38E 및 F42A; R38E, F42A 및 Q126S; R38D, F42A 및 N88S; R38D, F42A 및 N88A; R38D, F42A 및 V91E; R38D, F42A, 및 D84H; H16D, R38D 및 F42A; H16E, R38D 및 F42A; R38D, F42A 및 Q126S; R38A, F42K, 및 N88S; R38A, F42K, 및 N88A; R38A, F42K, 및 V91E; R38A, F42K, 및 D84H; H16D, R38A, 및 F42K; H16E, R38A, 및 F42K; R38A, F42K, 및 Q126S; F42A, E62Q, 및 N88S; F42A, E62Q, 및 N88A; F42A, E62Q, 및 V91E; F42A, E62Q, 및 D84H; H16D, F42A, 및 E62Q; H16E, F42A, 및 E62Q; F42A, E62Q, 및 Q126S; R38E, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 C125A; R38A, F42K, 및 C125A; R38E, F42A, N88S, 및 C125A; R38E, F42A, N88A, 및 C125A; R38E, F42A, V91E, 및 C125A; R38E, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38E, F42A, 및 C125A; H16E, R38E, F42A, 및 C125A; R38E, F42A, C125A 및 Q126S; R38D, F42A, N88S, 및 C125A; R38D, F42A, N88A, 및 C125A; R38D, F42A, V91E, 및 C125A; R38D, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38D, F42A, 및 C125A; H16E, R38D, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, C125A, 및 Q126S; R38A, F42K, N88S, 및 C125A; R38A, F42K, N88A, 및 C125A; R38A, F42K, V91E, 및 C125A; R38A, F42K, D84H, 및 C125A; H16D, R38A, F42K, 및 C125A; H16E, R38A, F42K, 및 C125A; R38A, F42K, C125A 및 Q126S; F42A, E62Q, N88S, 및 C125A; F42A, E62Q, N88A, 및 C125A; F42A, E62Q, V91E, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 E62Q, 및 C125A; H16E, F42A, E62Q, 및 C125A; F42A, E62Q, C125A 및 Q126S; F42A, N88S, 및 C125A; F42A, N88A, 및 C125A; F42A, V91E, 및 C125A; F42A, D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 C125A; H16E, F42A, 및 C125A; F42A, C125A 및 Q126S; F42A, Y45A 및 L72G; T3A, F42A, Y45A, L72G 및 C125A; 또는 K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, 및 L72K을 포함하는 그룹에서 선택되는 치환 중 적어도 하나; 또는 이의 조합, 바람직하게는 3개의 치환 F42A, Y45A 및 L72G.

[0017] 또 다른 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-15 또는 서열번호 88과 적어도 90% 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 서열번호 88에 대해 하기 치환 중 어느 하나를 포함하는 IL-15 변이체에서 선택된다: N1D,V3I, V3M, V3R, N4D, D8N, D8A, K11L, K11M, K11R, D30N, D61N, E64Q, N65D, N71D, N71S, N72D, N72A, N72R, N72Y, S73I, N77A, N79D, N79E, N79S, Q108E, N112D, N112H, N112M 및 N112Y, preferably N4D, D61N, N65D, Q108E, N4D/N65D, D30N/N65D, D30N/E64Q, D30N/E64Q/N65D, N1D, N4D, D8N, D30N, D61N, E64Q, N65D, Q108E, N1D/D61N, N1D/E64Q, N4D, D61N, N4D/E64Q, D8N/D61N, D8N/E64Q, D61N/E64Q, N1D/D30N, E64Q/Q108E, N1D/N4D/D8N, D61N/E64Q/N65Q, N1D/D61N/E64Q/Q108E, N4D/D61N, N4D/D61N/E64Q/Q108E, N1D/N65D, N1D/Q108E, N4D/D30N, D30N/Q108E, N65D/Q108E, D30N/Q180E, E64Q/N65D, D61N/E64Q/N65D, N1D/N4D/N65D, N71S/N72A/N77A, 및 N4D/D61N/N65D, 바람직하게는 D30N/E64Q/N65D.

[0018] 또 다른 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-21 또는 서열번호 89와 적어도 90%의 동일성을 갖는 이의 변이체, 바람직하게는 서열번호 89에 대해 하기 치환 중 어느 하나를 포함하는 IL-21 변이체로부터 선택된다: R5A, R5D, R5E, R5G, R5H, R5I, R5K, R5L, R5M, R5N, R5Q, R5S, R5T, R5V, R5Y, I8A, I8D, I8E, I8G, I8N, I8S, R9A, R9D, R9E, R9G, R9H, R9I, R9K, R9L, R9M, R9N, R9Q, R9S, R9T, R9V, R9Y, R11D, R11S, Q12A, Q12D, Q12E, Q12N, Q12S, Q12T, Q12V, L13D, I14A, I14D, I14S, D15A, D15E, D15I, D15M, D15N, D15Q, D15S, D15T, D15V, I16D, I16E, Q19D, Y23D, R65D, R65G, R65P, I66D, I66G, I66P, N68Q, V69D, V69G, V69P, S70E, S70G, S70P, S70Y, S70T, K72D, K72G, K72P, K72A, K73A, K73D, K73E, K73G, K73H, K73I, K73N, K73P, K73Q, K73S, K73V, K75D, K75G, K75P, R76A, R76D, R76E, R76G, R76H, R76I, R76K, R76L, R76M, R76N, R76P, R76Q, R76S, R76T, R76V, R76Y, K77D, K77G, K77P, P78D, P79D, S80G, S80P, E109K, R110D, K112D, S113K, Q116A, Q116D, Q116E, Q116I, Q116K, Q116L, Q116M, Q116N, Q116S, Q116T, Q116V, K117D, I119A, I119D, I119E, I119M, I119N, I119Q, I119S, I119T, H120D 및 L123D, 바람직하게는 R5E 및 R76E, R5E 및 R76A, R5A 및 R76A, R5Q 및 R76A, R5A 및 R76E, R5Q 및 R76E, R9E 및 R76E, R9A 및 R76E, R9E 및 R76A, R9A 및 R76A, D15N 및 S70T, D15N 및 I71L, D15N 및 K72A, D15N 및 K73A, S70T 및 K73Q, S70T 및 R76A, S70T 및 R76D, S70T 및 R76E, I71L 및 K73Q, I71L 및 R76A, I71L 및 R76D, I71L 및 R76E, K72A 및 K73Q, K72A 및 R76A, K72A 및 R76D, K72A 및 R76E, K73A 및 R76A, K73A 및 R76D, 또는 K73A 및 R76E.

[0019] 선택적으로, 항원 결합 도메인은 Fab 도메인, Fab', 단일 사슬 가변 단편(scFV) 또는 단일 도메인 항체(sdAb)이다.

[0020] 특정의 양태에서, 면역 세포 표면에 특이적으로 발현되는 표적은 PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 및 TIM3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게는 PD-1이다.

[0021] 매우 특정한 양태에서, 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 또는 62의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64 또는 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하거나 본질적으로 이로 이루어진다.

[0022] 본 발명은 또한 본 개시에 따른 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 핵산 서열 또는 단리된 핵산 분자의 그룹, 및 단리된 핵산(들)을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0023] 본 발명은 또한 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산(들) 또는 숙주 세포를, 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0024] 마지막으로, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 특히 암 또는 감염 질환의 치료에서 사용하기 위한 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물; 약제의 제조를 위한, 특히 암 또는 감염 질환의 치료에서 사용하기 위한 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물의 용도; 및 치료 유효량의 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환, 특히 암 또는 감염 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0025] 선택적으로, 본 발명은 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포를 자극함으로써 암 또는 바이러스 감염의 치료에서 사용하기 위한 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물; 약제의 제조를 위한, 특히 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포를 자극함으로써 암 또는 바이러스 감염의 치료에서 사용하기 위한 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물의 용도; 치료 유효량의 본 개시에 따른 이작용성 분자, 핵산, 숙주 세포 또는 약학 조성물을 투여함으로써 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포를 자극하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암 또는 바이러스 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] **도 1: 실시예 1 및 2에서 사용된 상이한 분자의 개략적인 표현.** 아래의 구성 3의 도식적 표현에는 이러한 구성의 또 다른 표현이 있으며, 여기에서 분자의 각 사슬과 구성 요소가 추가로 설명되어 있다.

도 2: 항 PD-1 IL7 W142H 돌연변이는 PD-1에 대한 높은 결합 효율을 보여주고 PDL1 결합을 길항한다. A. PD-1 결합 ELISA 분석. 인간 재조합 PD-1(rPD1) 단백질을 고정화하고, 항체를 상이한 농도로 첨가하였다. 퍼옥시다제에 결합된 항-인간 Fc 항체로 밝혀냈다. 비색법을 TMB 기질을 사용하여 450 nm에서 결정하였다. 1개(항 PD-1*1 ▲ 회색) 또는 2개의 항 PD-1 암(항 PD-1*2 ◆)을 갖는 항 PD-1을 대조군으로서 시험하였다. IL7 변이체(항 PD-1*2 IL7 W142H*2 ● 흑색), (항 PD-1*2 IL7 W142H*1 ■ 흑색), (항 PD-1*1 IL7 W142H*2 ● 회색), (항 PD-1*1 IL7 W142H*1 ▼ 회색)을 포함하는 이작용성 분자도 시험하였다. B. ELISA에 의해 측정된 PD-1/PD-L1을 차단하는 길항 능력. PD-L1을 고정화하고, 복합 항체 + 비오티닐화된 재조합 인간 PD-1을 첨가하였다. 이러한 복합체는 고정 농도의 PD1(0.6 μg/mL) 및 서로 다른 농도의 항-PD1*2 IL7 W142H*1(■ 일반선), 항-PD1*2 IL7 W142H*2(○ 점선), 항 PD-1*1(회색▲ 회색 점선), 항-PD1*1 IL7 W142H*2(회색 ● 일반 회색선) 또는 항 PD1*1 IL7W142H*1(회색▼ 일반 회색선)로 생성하였다. 시험한 모든 작제물은 Fc와 IL-7 도메인 사이의 GGGGSGGGGSGGGGS 링커를 포함한다.

도 3: 1개 원자가의 항 PD-1와 1개 IL-7 W142H 사이토카인으로 작제된 항 PD-1 IL7 분자는 높은 효율로 pSTAT5를 활성화한다. 항 PD-1*1 IL7 W142H*1(●) 항 PD-1*2 IL7WT*2(■) 또는 항 PD1*2 IL7 W142H*1(▲) 처리 후 pSTAT5 신호전달 분석. 시험한 모든 W142H 작제물은 Fc와 IL-7 도메인 사이에 IgG1m 및 GGGGSGGGGSGGGGS 링커를 포함한다.

도 4: 항 PD-1*2 IL7*1, 항 PD-1*1 IL7*1, 항 PD-1*1 IL7*2 W142H 돌연변이체는 PD-1-CD127+ 세포 보다는 PD-1+ CD127+ 세포에 우선적으로 결합하여 PD-1+ CD127+ 세포 내로의 pSTAT5 신호전달을 활성화한다. CD127+을 발현하거나 CD127+ 및 PD-1+ 세포를 동시 발현하는 U937 세포를 세포 증식 염료(CPDe450 또는 CPDe670)로 염색하고 다양한 농도의 항 PD-1 IL-7 이작용성 분자와 인큐베이션하기 전에 1:1의 비율로 공동-배양하였다. 항-인간 IgG PE 및 pSTAT5 활성화로의 염색을 유세포 분석에 의해 인큐베이션 후에 정량화하였다. **A.** 각 세포 유형 및 각 작제물에 대해 EC50 결합(nM)을 계산하였다. **B.** 각 세포 유형 및 각 작제물에 대해 EC50 pSTAT5(nM)를 계산하였다. 이작용성 분자로 처치한 후, 세포를 고정, 투과화하고 AF647 표지된 항-pSTAT5(클론 47/Stat5(pY694)로 염색하였다. pSTAT5 활성화. 각 작제물 및 각 세포 유형 PD-1+ CD127+(백색 히스토그램) 및 U937 PD-1-CD127+(흑색 히스토그램)에 대해 EC50(nM)을 계산하였다. n=2개의 독립적인 실험. 이 분석에서, 항 PD-1*2 IL7 W142*1, 항 PD-1*1 IL7 W142*1 및 항 PD-1*1 IL7 W142*2를 시험하였으며 이들은 Fc와 IL-7 도메인 사이에

IgG1m 이소형 및 GGGGSGGGGSGGGGS 링커를 포함한다.

도 5: 복강내 주입 후 항 PD-1*2 IL7*1, 항 PD-1*1 IL7*1, 항 PD-1*1 IL7*2 W142H 돌연변이체 분자의 약동학. 1회 용량(34 nM/kg)의 항 PD-1*2 IL7 IL7*2 IgG4m(△), 항 PD-1*2 IL7 W142H*1 IgG1m(▼), 항 PD-1*1 IL7 W142H*1 IgG1m(● 회색), 또는 항 PD-1*1 IL7 W142H*2 IgG1m(○ 회색)을 인간화 PD1 마우스에 복강 내로 주입하였다. 주입 후 72시간 까지 혈청 중의 약물 농도를 ELISA로 평가하였다.

도 6: 실시예 3 내지 9에 사용된 항 PD-1/protX 이작용성 항체의 도식적 구조. 포맷 A: 항 PD-1*2/ProtX*2는 항 PD-1 항체의 Fc 도메인의 C-말단에 융합된 2개의 항 PD-1 아암과 2개의 단백질 X를 포함한다. **포맷 B:** 항 PD-1*2/ProtX*1은 항 PD-1 항체(사슬 B)의 Fc 도메인의 C-말단에 융합된 2개의 항 PD-1 아암과 1개의 단백질 X를 포함한다. **포맷 C:** 항 PD-1*1/protX*1은 항 PD-1 항체(사슬 B)의 Fc 도메인의 C-말단에 융합된 1개의 항 PD-1 암과 1개의 단백질 X를 포함한다. 포맷 C의 도식적 표현 아래에는, 분자의 각 사슬과 구성 요소가 추가로 설명되어 있는, 이러한 구성의 또 다른 표현이 있다. 포맷 B 및 C는 또한 노브(Knob) 돌연변이가 바람직하게는 사슬 A에 도입되고 홀(Hole) 돌연변이는 바람직하게는 체인 B에 도입되는 노브 인투 홀 전략을 포함한다.

도 7: 포유동물 세포에서 항 PD-1/ProtX 이작용성 항체의 생산성. 비율(1:3:3; 사슬 A: 사슬 B: VL)로 항 PD-1*2/protX*1 또는 항 PD-1*1/protX*1 분자를 코딩하는 DNA를 사용하여 CHO-S 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 항체를 함유하는 상등액을 정제하였다. 정제 후 수득된 이작용성 항체의 양을 UV 분광광도계(DO 280nm)로 정량화하고 생성물의 부피에 대해 정규화하였다. **도 7A.** 생산성의 원시 데이터, 각 도트는 하나의 항 PD-1*1/protX*1 항체의 생산성을 나타낸다. **도 7B.** 모든 항 PD-1*1/protX*1 항체 대 항 PD-1*2/protX*1 분자의 표준화된 생산성. **도 7C.** 개별 작제물의 원시 데이터 생산성.

도 8: 항 PD-1*1/IL-7wt*1 (A) 및 항 PD-1*1/IL-7v*1 (B)의 크기 배제 크로마토그래피. 정제된 항체를 SuperDex 200(10/300GL)을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 크기별로 분리하였다. 응집체, 이종이량체 항체 및 Fc 동종이량체에 해당하는 피크는 계산된 화합물의 %로 그래픽에 표시하였다.

도 9: 항 PD-1*1/protX*1 이작용성 항체는 인간 PD-1에 대한 높은 결합 효율을 보여준다. 인간 재조합 PD-1(rPD1) 단백질을 고정화하고, 항체를 다양한 농도로 첨가하였다. 퍼옥시다제에 결합된 항-인간 Fc 항체를 사용하여 현상을(revelation) 수행하였다. 비색법은 TMB 기판을 사용하여 450 nm에서 결정하였다. **도 9A.** 항 PD-1*1/IL-2*1, **도 9B.** 항 PD-1*1 IL-21*1, **도 9C.** 항 PD-1*1/IL-15*1.

도 10: 항 PD-1*/사이토카인*1 분자는 높은 효능으로 pSTAT5를 활성화시킨다. 도 10A. 항 PD-1*1 /IL-21*1, 항 PD-1*1/IL-15*1, 항 PD-1*1 /IL-7wt*1, 항 PD-1*1 /IL-7v*1로 처치한 인간 1차 T 세포의 pSTAT5 신호전달 분석. 건강한 지원자의 말초 혈액으로부터 단리한 인간 PBMC를 분자와 함께 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 고정하고, 투과화하고 항 CD3-BV421 및 항-pSTAT5 AF647(클론 47/Stat5(pY694))로 염색하였다. 데이터는 CD3+ 집단 내로의 pSTAT5 + 세포%에 해당한다. **도 10B.** 항 PD-1*2 IL7v*2(▼) 또는 항 PD-1*1 IL7v1*1(△) 분자로 처치한 후 인간 CD127+ CD132+ U937 세포주 내로의 pSTAT5 신호전달. 왼쪽 그래프는 pSTAT5 + 세포의 %에 해당하고 오른쪽 그래프는 pSTAT5 활성화의 50%에 도달하는 데 필요한 농도를 참조하여 계산된 EC50(nM)에 해당한다. 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 +/- SD를 나타낸다.

도 11: 항 PD-1*1/protX*1 분자는 PD-1- 세포보다 PD-1+ 세포에 우선적으로 높은 효율로 결합한다. 도 11a. PD-1+ 세포 및 U937 PD-1- 세포를 발현하는 U937 세포를 세포 증식 염료(CPDe450 또는 CPDe670)로 염색하고, 다양한 농도의 항 PD-1*1/IL2*1, 항 PD-1*1/IL15*1, 항 PD-1*1 IL-21*1 이중기능성 분자 또는 양성 대조군 염색으로 항 PD-1*1 및 항 PD-1*2와 함께 인큐베이션하기 전에 1:1 비율로 공동배양하였다. 염색 및 항-인간 IgG PE 및 pSTAT5 활성화를 PD-1+(일반 선) 또는 PD-1- 세포(점선)에서 유동 세포측정법에 의해 인큐베이션 후 정량화하였다. **도 11b.** PD-1+ CD127+ U937 세포(일반 선) 대 PD-1-CD127+ U937 세포주(점선)에 대한 항 PD-1*1/IL-7wt*1 분자의 결합. **도 11c.** PD-1+ CD127+ U937 세포(일반 선) 대 PD-1-CD127+ U937 세포주(점선)에 대한 항 PD-1*1/IL-7v*1 분자의 결합. **도 11d.** PD-1+ CD127+ 세포 대 PD-1- 세포 CD127+ 세포 내로의 pSTAT5 활성화 비교. PD-1+ CD127+(백색 히스토그램) 대 PD-1- CD127+ 세포(흑색 히스토그램)에 대한 pSTAT5 활성화의 EC50nM 비율을 계산하여 그래프로 기록하였다. N= 3개의 독립적인 실험.

도 12: 항 PD-1*1 IL7*1은 TCR 신호전달을 상승적으로 활성화한다. Promega PD-1/PD-L1 생물분석: (1) 이펙터 T 세포(PD-1을 안정적으로 발현하는 Jurkat, NFAT-유도된 루시퍼라제) 및 (2) 활성화 표적 세포(항원-독립적인 방식으로 동족 TCR을 활성화하도록 설계된 표면 단백질 및 PD-L1을 안정적으로 발현하는 CHO K1 세포)를 공동배양하였다. BioGloTM 루시페린을 첨가한 후, 발광을 정량화하고 T 세포 활성화를 반영한다. **도 12a.** 항-PD1*1(■

흑색), 별도의 화합물로서 항 PD-1*1 + 이소형*1 IL-7wt*1(▽), 항 PD-1*1 IL7wt*1(▲ 흑색)을 일련의 농도로 첨가하였다. 오른쪽 그래프 EC50(nM)은 각 작제물에 대해 계산하였다. **도 12b.** 항-PD1*1(■ 흑색), 별도의 화합물로서 항 PD-1*1 + 이소형*1 IL-7v*1(▽), 항 PD-1*1 IL7v*1(▲ 흑색)을 일련의 농도로 첨가하였다. 오른쪽 그래프 EC50(nM)은 각 작제물에 대해 계산하였다. 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 13: 항 PD1*2/IL7v*1 또는 항 PD-1*2/IL7v*2 분자에 비해 항 PD-1*1/IL7v*1은 생체 내에서 더 높은 약동학을 나타낸다. C57BL/6 마우스에 이중기능성 항 PD-1/IL-7v 분자의 1회 용량(34 nmol/kg)을 정맥 내로(도 13A) 또는 복강 내로(도 13B) 주입하였다. 항-인간 Fc 특이적 ELISA를 사용하여 여러 시점에서 혈청 내 항체 농도를 정량화하였다. 왼쪽 그래프, 데이터는 나노몰 농도로 표시된다. 오른쪽 그래프, 생체 내 약물 노출을 정의하기 위해 각 작제물에 대해 곡선 아래 면적을 계산하였다. 데이터는 그룹 당 2 내지 4 마리 마우스의 평균 +/- SEM이다.

도 14: 항 PD-1*1/protX*1은 항 PD1*2/ProtX*1 분자보다 생체 내에서 더 높은 약동학을 입증하였다. C57BL/6 마우스에 항 PD-1/IL-7, 항 PD-1/IL21, 항 PD-1/IL-2, 항 PD-1*1 또는 항 PD-1*2 백본으로 구성된 항 PD-1/IL-15를 1회 용량(34 nmol/kg)으로 정맥 주사하였다. 혈청 내 항체 농도를 항-인간 Fc 특이적 ELISA를 사용하여 여러 시점에서 정량화하였다. 생체내 약물 노출을 정의하기 위해 각 구성에 대해 곡선 아래 면적(AUC)을 계산하였다. 각 곡선은 한 가지 유형의 분자를 나타낸다.

도 15: 개별 항 PD1*2/ProtX*1 분자의 약동학 연구. 데이터는 항 PD-1*1 또는 항 PD-1*2 백본 및 1 또는 2개의 융합된 protX로 작제된 항 PD-1/IL-7, 항 PD-1/IL21, 항 PD-1/IL-2, 항 PD-1/IL-15 분자의 개별 작제물의 약동학 및 AUC를 나타낸다. **도 15.** 항 PD-1/IL-7wt **도 15B.** 항 PD-1/IL-21 **도 15C.** 항 PD-1/IL-2, 도 **15D.** 항 PD-1/IL-15. 데이터는 개별적인 실험의 그룹 당 1 내지 4 마리 마우스의 평균 +/- SEM을 의미한다.

도 16: 항 PD-1 단독(항 PD-1*1 및 항 PD-1*2)의 단일 주입 후 마우스에서의 약동학 연구. C57 BL6 마우스에 1개의 항 PD-1 원자가(항 PD-1*1 ■, 점선) 또는 2개의 항 PD-1 원자가(항 PD-1*2 ●, 일반선)로 작제된 항 PD-1 항체의 1회 용량(34 nmol/kg)을 주입하였다. **(도 16A)** 정맥 내 주입 및 **(도 16B)** 복강 내 주입. 항-인간 Fc 특이적 ELISA를 사용하여 여러 시점에서 혈청 내 항체 농도를 정량화하였다. 데이터는 nM 농도로 표시된다.

도 17: 항 PD-1*1 IL7v*1 분자는 생체 내에서 T 세포 증식을 유의하게 촉진한다. 1회 용량(34 nM/kg)의 항 PD-1 IL-7v 분자(항 PD-1*2 IL7v*1, 항 PD-1*1 IL7v*1, 항 PD-1*1 IL7v*2, 항 PD-1*2 IL7wt*1, 항 PD-1*1 또는 항 PD-*2)를 마우스에 복강 내로 주입하였다. 4일 차에, 종양 및 혈액을 수집하고, 다양한 T 세포 하위집단에서 T 세포를 ki67 증식 마커로 염색하였다. 혈액 중의 CD3 CD4+ 및 CD3 CD8+ 집단에서(**도 17A 및 17B**) 및 종양 내 TCF1+줄기-유사 CD8 T 세포 (CD45/CD3/CD8/CD44/TCF1+/TOX-)에서(**도 17C**) KI67 백분율을 정량화하였다. 통계적 유의성(*p<0,05)은 그룹 당 n=3 내지 8마리의 대조군 마우스와의 다중 비교를 위한 일원 ANOVA 검정으로 계산하였다.

도 18: 항 PD-1*1 IL7*1 분자는 항 PD-1 내성 간암종 동소위 모델에서 유의한 효능을 입증하였다. 인간화 PD-1 KI 면역적격 마우스를 실험에 사용하였다. Hepa1.6 간암종 세포를 간문맥을 통해 동소위적으로 주입하였다. 4일 차에, 마우스를 3회 용량의 PBS(음성 대조군), 항 PD-1*2, 및 항 PD-1*1 IL7*1로 처치하였다. 2개의 독립적인 실험을 수행하였다. **도 18A.** 항 PD-1*1IL7v*1 대 항 PD-1*2 및 PBS 처리로 처치한 마우스의 생존. **도 18B.** 항 PD-1*1IL7wt*1 대 항 PD-1*2 및 PBS 처리로 처치한 마우스의 생존.

도 19: 항 PD-1*1 IL7v*1 분자는 중피종 동소위 모델에서 높은 효능을 입증하였다. 인간화 PD-1 KI 면역적격 마우스를 실험에 사용하였다. AK7 중피종 세포를 복강 내로 주입하였다. 4일 차에, 마우스를 3회 용량의 PBS(음성 대조군), 항 PD-1*2, 항 PD-1*1 IL7v*1로 처치하였다. **도 19A.** 생물발광으로 측정한 종양 부담. AK7 세포는 루시퍼라제를 안정적으로 발현하여 생물발광의 생체 내 정량화를 가능하게 한다. **도 19B.** 처치 후 마우스의 생존.

도 20: 항 PD-1*1 IL7v*1 분자는 IL-7 사이토카인 단독 및 항 PD-1*1 IL7wt*1에 비해 더 높은 정도로 Treg의 억제 기능을 제거한다. CD8+ 이펙터 T 세포 및 자가 CD4+ CD25high CD127low Treg을 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 단리하고, 세포 증식 염료(CD8+ T 세포의 경우 CPDe670)로 염색하였다. 이어서 rIL-7, 항 PD-1*2, 재조합 IL-7 사이토카인, 항 PD-1*1 IL7WT*1 또는 항 PD-1*1 IL7v*1 (항 PD-1*1 IL7W142H*)(0.12 nM)의 존재 또는 부재 하에 OKT3 코팅된 플레이트(2 μg/mL)에서 1:1 비율로 Treg/CD8+Teff를 5일 동안 공동 배양하였다. 이펙터 T 세포의 증식을 CPD 마커의 손실에 기초한 세포형광측정법으로 분석하였다. 데이터는 공식 100-((Treg와 공동배양된 Teff%/Teff 증식 단독%)*100을 사용하여 분석된 Treg 억제 활성%을 나타낸다. 독립적인 실험의 n=4 공여자의 +/- SEM 데이터. 통계적 유의성은 다중 비교를 위해 Dunnett 검정을 사용하는 일원 ANOVA였

다.

도 21: 항 PD-1 민감성 동소위 모델 AK7 동소위 모델에서 항 PD-1*1 IL7v*1 분자의 유의한 장기 단독요법 효능. AK7 중피종 세포를 hPD-1KI 마우스에 복강 내로 주입하고 PBS(n=8 마우스), 항 PD-1*2 (n=8 마우스), 항 PD-1*1 IL7v*1(W142H*1)(n=14), 항 PD-1*1 IL7WT *1로 처치하였다. **(a) 처리 후 전체적인 생존.** 통계적 유의성을 log-rank 검정(*p<0,05)으로 계산하였다. **(b) 종양 재공격 후 항 PD-1*1 IL7v*1은 장기 기억 반응을 유도한다.** 항 PD-1*1 IL7v*1 처리로 치유된 마우스(n=7)를 복강 내 주입(3e6 세포)을 통해 AK7 중피종 세포로 재공격하였다. 대조군으로서, 나이브 마우스의 군(n=3)에 또한 주입하여 종양 부담 및 성장을 검증하였다. 그래프는 D-루시페린(150 mg/kg 및 바이오이미저를 사용한 분석)의 복강 내 주입 후 생물발광에 의해 정량화된 루시퍼라제 형질도입된 AK7 종양 세포 성장을 나타낸다(평균 +/- SEM).

도 22: 간암종 동소위 모델에서 항 PD-1*1 IL7v*1 분자의 전임상 효능. Hepa 1.6 종양 접종 후, 4/6 및 8일차에 마우스를 PBS, 항 PD-1, 항 PD-1*1 IL7v*1(항 PD-1*1 IL7W142H*1) 또는 항 PD-1*1 IL7wt*1로 처치하였다. 3개의 독립적인 실험에 대해 수득한 전체적인 생존 및 설명을 위해 합침. PBS(n=23); 항 PD-1*2(n=26), 이소형-IL-7(n=14), 항 PD-1*1 IL7v*1(n=20) 및 항 PD-1*1IL7wt*1(n=19) 통계적 유의성 p<005을 Log Rank 검정으로 계산하였다.

도 23: 종양 미세환경에서 줄기-유사 기억 CD8 T 세포 하위 집합의 증가를 나타내는 생체 내에서 항 PD-1*1 IL7v*1 분자를 처치한 후 유전자 서명. Hepa 1.6 종양 접종 후, 4/6 및 8일차에 마우스를 PBS, 항 PD-1(34.3nmol/kg) 또는 항 PD-1*1 IL7v*1 또는 항 PD-1*1 IL7wt *1(34.3 nmol/kg)(그룹 당 n=4)로 처치하였다. 10일차에, 종양을 수집하고, Nanostring Pancancer 면역 패널로 유전자 발현을 분석하였다. **(A)** 항 PD-1와 BICKI IL7v 처리 사이의 일반적인 상향조절된 유전자의 STRING 단백질-단백질 네트워크 분석을 통해 PBS, 항 PD-1 및 항 PD-1*1IL7v*1군 사이에서 차별적으로 발현된(DEG) 유전자의 히트맵 표현; (**B 및 C**) 초기 활성화된 T 세포 대 고갈된 T 세포의 유전자 서명 풍부. 고갈된 T 세포의 유전자 서명 및 나이브 유사/줄기 유사 기억 T 세포 서명을 Andreatta 등(문헌[Nature comm 2021, 12, 2965])에 대해 맞추었다 나이브-유사/줄기-유사 기억 T 세포(TCF7,CCR7, SELL, IL7R) 및 고갈된 CD8 T 세포 점수(LAG3, PRF1, CD8A, HAVRC2, GZMB, CD8B1, KLRD1, TNFRSF9, TIGIT, CTSW, CCL4, CD63, IFNG, CXCR6, FASL, CSF1).

도 24: 항 PD-1*1 IL7v*1 분자는 종양 미세환경 내로 줄기-유사 기억 CD8 T 세포(TCF1+) 하위 집합의 증식을 유도한다. (**A, B 및 C**) Hepa 1.6 종양 접종 후, 4/6 및 8일차에 마우스를 PBS, 항 PD-1(34.3 nmol/kg) 또는 항 PD-1*1 IL7v*1 또는 항 PD-1*1 IL7wt *1(34.3 nmol/kg)(그룹 당 n=4)로 처치하였다. 10일차에, 종양을 수집하고, T 세포를 CD3/CD8/CD44 마커 및 TCF1/TOX 인자의 발현에 대한 유세포 분석을 위해 염색하였다. (a) 종양 미세환경 내로의 CD4, CD8, 및 Treg 하위집단의 백분율 (b) TCF1+/-TOX 마커를 발현하는 CD44+ CD8+ 활성화된 T 세포의 백분율 (c) MC38 피하 모델에서 Hepa16 모델(D)에서의 KI67 마커의 %로 측정된 TCF1+/-TOX 마커를 발현하는 CD44+ CD8+ 활성화 T 세포의 증식, TCF1+/-TOX 마커를 발현하는 CD44+ CD8+ 활성화 T 세포의 증식을 처리(항 PD-1*2 항 PD-1*1 IL7v*1 (W142H*1)) 후 KI67 마커의 %로 측정하였다.

도 25: 항 PD-1*1 IL7v*1은 만성적으로 자극된 T 세포의 생존(A) 및 시험관 내에서 줄기-유사 T 세포의 유도된 증식(B)을 유지한다. NXG 면역결핍 마우스에 MDA-MB231 유방암 세포 암종 세포(3e6 세포)를 피하 주사하고, 8일차에 인간 PBMC를 복강 내로 인간화한 다음(3e6 세포), 종양 접종 후 12일, 15일 및 18일에 PBS, 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 IL7v*1을 i.p.로 처치하였다. 데이터는 그룹당 평균 +/- SEM N=3 내지 4마리의 마우스를 의미한다.

도 26: 유방암 세포 인간화 마우스 모델에서 항 PD-1*1 IL7v*1 분자의 단독요법 효능. NXG 면역결핍 마우스에 MDA-MB231 유방암 세포 암종 세포(3e6 세포)를 피하 주사하고, 8일째에(3e6 세포) 인간 PBMC로 복강 내로 인간화한 다음, 종양 접종 후 12일, 15일 및 18일에 PBS, 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 IL7v*1로 복강내로 처치하였다. 데이터는 평균 +/- SEM 그룹 당 및 공여자 당 N=3 내지 4마리

도 27: 폐암 A549 인간화 마우스 모드에서 항 PD-1*1 IL7v*1 분자의 단독요법 효능. NXG 면역결핍 마우스에 A549 폐 암종 세포를 피하 주사하고, 인간 PBMC로 21일째에 복강내로 인간화(10e6 세포)한 다음, 종양 접종 후 25일, 28일, 31일 및 34째일에 PBS, 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 IL7v*1로 복강 내로 처치하였다. **(A)** A549 종양 성장 그룹 당 n=5마리 마우스, 평균 +/- SEM 통계적 유의성 **p<005는 항 PD-1*1 IL7v*1 대 항 PD-1*2 군을 비교함으로써 Dunnett의 다중 비교 검정을 사용하여 계산되었다. **(B)** 35일째에 수집된 마우스의 혈청에서 ELISA에 의해 정량화된 인간 IFNg 분비(그룹 당 n= 2 내지 5마리 마우스)

도 28. 항 PD-1*1 IL7v*1은 항 PD-1*1 IL7wt*1 분자와 비교하여 더 우수한 약동학 프로파일을 입증했으며 생체 내에서 CD8 T 세포의 증식을 유도했다. 동물에게 0.8 mg/kg(n=1 cyno), 4.01 mg/kg(n=1 cyno), 25 mg/kg(n=1 cyno)의 1회 용량의 항 PD-1*1 IL-7v*1(항 PD-1*1 IL7 W142H*1) 또는 항 PD-1*1 IL7wt*1을 정맥 내로 주입하였다. (A) 동물 혈청 중의 약물 농도를 MSD 면역분석으로 정량화하였다. (B) CD8 T 세포 증식 측정을 상이한 용량의 항 PD-1*1 IL7v*1 항체의 주입 후 말초 혈액 T 세포에서 유세포 분석으로 평가하였다(용량 당 n=1 cyno)

도 29. IgG1 N297A 이소형 또는 IgG1 N297A LALA PG 이소형으로 작제한 항 PD-1*1 IL7v*1은 pSTAT5 활성화에 대한 유사한 효능을 나타냈다. 자극된 인간 PBMC를 상이한 용량에서 IgG1 N297A 이소형 또는 IgG1 LALA P329G 돌연변이로 작제된 항 PD-1*1 IL7v*1로 처치하였다. IL-7R 신호전달 활성화를 CD4 및 CD8 T 세포에 대한 세포내 pSTAT5 염색으로 측정하고 유세포 분석으로 분석하였다.

도 30. 항 PD-1*1/protX*1은 생체 내 독성이 없음을 나타내었다. C57BL/6 마우스에 PBS를 복강 내 주사하거나, 항 PD-1*1/IL7W142H*1(A 및 B) 또는 항 PD-1*1/L2*1(C) 항체를 2일마다 단일(x1) 또는 반복(x3) 주사하였다. 매일 마우스의 체중을 측정하고 데이터를 분자 주입 전의 초기 체중으로 정규화하였다(0일 = 100%). **(A)** 항 PD-1/IL7 W14H*1 분자를 20mg/kg으로 1회 또는 2일마다 5mg/kg으로 3회 주입하였다. **(B)** 항 PD-1/IL7 W14H*1 분자를 고용량을 50 또는 100mg/kg으로 1회 또는 2일마다 20mg/kg으로 3회 주입하였다. **(C)** 항 PD-1/IL-2*1 분자를 20mg/kg으로 1회 주입하거나 2일마다 5mg/kg으로 3회 주입하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] **개요**

[0028] 본 발명은 특정의 스캐폴드를 갖고 면역 세포 표면에서 특이적으로 발현되는 표적, 및 단일 면역-자극 사이토카인에 결합하는 단일 1가 항원 결합 도메인을 포함하는 이작용성 분자에 관한 것이다. 이러한 스캐폴드는 본질적으로 Fc 도메인의 하나의 단량체의 N 말단 단부에 연결된 면역세포 표면 상에 특이적으로 발현된 표적과 결합하는 단일 1가 항-PD-1 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인 단량체 또는 항원 결합 도메인이 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하는 경우 경쇄의 C 말단 단부에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인 이량체 Fc 도메인으로 본질적으로 이루어진다. 이러한 신규한 이작용성 분자는, 무엇보다도 개선된 약동학적 프로파일 및 더 나은 생산성을 제공한다.

[0029] **정의**

[0030] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 이하에 특정 용어가 정의된다. 추가 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 설명된다.

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 기타 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명료함 및/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에 정의되며, 본 명세서에 이러한 정의를 포함하는 것이 반드시 당업계에서 일반적으로 이해되는 것과의 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에 기술되거나 참조된 기술 및 절차는 일반적으로 잘 이해되고 당업자에 의해 통상적인 방법론을 사용하여 일반적으 로 사용된다.

[0032] 본 명세서에 사용되는 용어 "야생형 인터루킨-7 (wild type interleukin-7)", "wt-IL-7" 및 "wt-IL7"은 포유류 내인성 분비 당단백질, 특히 IL-7 폴리펩티드, 그의 유도체 및 유사체를 지칭한다. 예를 들어, wt-IL-7은 i) 천연 또는 자연-발생 IL-7 폴리펩티드, ii) IL-7 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편, iii) IL-7 폴리펩티드의 생물학적 활성 폴리펩티드 유사체, 또는 iv) 생물학적 활성 IL-7 폴리펩티드의 아미노산 서열을 갖는 재조합 또는 비-재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열을 지칭한다. IL-7은 펩티드 신호를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 이 분자에 대한 대체 명칭은 "pre-B 세포 성장 인자" 및 "림포포이에틴-1"이다. 바람직하게는, 용어 "wt-IL-7"은 인간 IL-7(wth-IL7)을 지칭한다. 예를 들어, 인간 wt-IL-7 아미노산 서열은 약 152개 아미노산(신호 펩티드 부재)이고 Genbank 수탁 번호 NP_000871.1을 가지며, 유전자는 염색체 8q12-13에 위치한다. 인간 IL-7은, 예를 들어, UniProtKB - P13232에 설명되어 있다.

[0033] 본 명세서에 사용되는 용어 "항체(antibody)"는 면역글로불린 분자의 유형을 기술하며 이의 최광의로 사용된다. 특히, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 단편, 즉, 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에

해당하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭된다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 상기 용어 "항체"는 온전한(intact) 면역글로불린 및 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"(예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일 사슬(scFv), 이의 돌연변이체, 항체 부분을 포함하는 분자, 디아바디, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 및 항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체를 포함하여, 요구되는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성(configuration)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 용어 항체는 인간화 항체를 지칭한다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 "항체 중쇄(antibody heavy chain)"는 항체 입체형태(conformation)에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더큰 것을 지칭한다. 항체 중쇄의 CDR은 전형적으로 "HCDR1", "HCDR2" 및 "HCDR3"으로 지칭된다. 항체 중쇄의 프레임워크 영역은 전형적으로 "HFR1", "HFR2", "HFR3" 및 "HFR4"로 지칭된다.

[0035] 본 명세서에 사용된 "항체 경쇄(antibody light chain)"는 항체 입체형태에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭하고, κ 및 λ 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 이소형을 지칭한다. 항체 경쇄의 CDR은 일반적으로 "LCDR1", "LCDR2" 및 "LCDR3"으로 지칭된다. 항체 경쇄의 프레임워크 영역은 일반적으로 "LFR1", "LFR2", "LFR3" 및 "LFR4"로 지칭된다.

[0036] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 항체의 "항원-결합 단편(antigen-binding fragment)" 또는 "항원-결합 도메인(antigen-binding domain)"은 항체의 일부, 즉, 가능하게는 천연 형태의 특정 항원에 대한 항원-결합능을 나타내는 본 발명의 항체 구조의 일부에 상응하는 분자를 의미하며; 이러한 단편은 특히 상응하는 4-사슬 항체의 항원-결합 특이성과 비교하여 상기 항원에 대해 동일하거나 실질적으로 동일한 항원-결합 특이성을 나타낸다. 유리하게는, 항원-결합 단편은 상응하는 4-사슬 항체와 유사한 결합 친화도를 갖는다. 그러나, 상응하는 4-사슬 항체에 대해 감소된 항원-결합 친화도를 가진 항원-결합 단편이 또한 본 발명 내에 포함된다. 항원-결합능은 항체와 표적 단편 사이의 친화도를 측정하여 결정될 수 있다. 이러한 항원-결합 단편은 또한 항체의 "기능성 단편"으로도 지정될 수 있다. 항체의 항원-결합 단편은 CDR(상보성 결정 영역(Complementary Determining Region) 또는 이들의 일부로 지정된 이들의 초가변 도메인을 포함하는 단편이다.

[0037] 본 명세서에 사용되는 용어 "인간화 항체(humanized antibody)"는 마우스와 같은 또 다른 포유류 종의 생식세포(germline)로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된(grafted) 항체(예컨대, 비-인간 항체로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체)를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체, 예컨대, 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 또한 인간화를 거친 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 일반적으로 하나 이상의 CDR 유래의 잔기가 비-인간 항체(공여자 항체)의 적어도 하나의 CDR 유래 잔기로 대체되는 동시에 본래 항체의 원하는 특이성, 친화도 및 능력(capacity)을 유지하는 인간 면역글로불린(수여자 항체)이다. 추가의 프레임워크 영역 변형이 인간 프레임워크 서열 내에서 이루어질 수 있다. 바람직하게는 인간화 항체는 80%, 85% 또는 90% 초과의 T20 인간성 점수를 갖는다. 항체의 "인간성"은 예를 들어 문헌[Gao SH, Huang K, Tu H, Adler A S BMC Biotechnology 2013: 13:55]에 기재된 바와 같이 항체의 가변 영역의 인간성을 정량화하기 위해 T20 스코어 분석기를 사용하여, 또는 T20 Cutoff Human Databases: http://abAnalyzerlakepharmacom을 사용하여 항체 서열의 T20 점수를 계산하기 위해 웹 기반 도구를 통해 측정될 수 있다.

[0038] "키메라 항체(chimeric antibody)"는 비인간 공급원, 바람직하게는 예컨대 마우스로부터의 유전 물질을 인간의 유전 물질과 조합함으로써 제조된 항체를 의미한다. 이러한 항체는 키메라 영역에 의해 연결된 인간 및 비-인간 항체 모두에서 유래한다. 키메라 항체는 일반적으로 인간으로부터의 불변 도메인과 다른 포유류 종으로부터의 가변 도메인을 포함하여, 치유적 치료에 사용될 때 비인간 동물로부터의 외래 항체에 대한 반응 위험을 줄인다.

[0039] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "결정화 가능한 단편 영역(fragment crystallizable region)" "Fc 영역(Fc region)" 또는 "Fc 도메인(Fc domain)"은 상호교환가능하고 Fc 수용체라고 하는 세포 표면 수용체와 상호작용하는 항체의 꼬리 영역을 지칭한다. Fc 영역 또는 도메인은 전형적으로 항체의 두 중쇄(즉, CH2 및 CH3 도메인)의 제2 및 제3 불변 도메인에서 유래된, 선택적으로 동일한, 2개의 도메인으로 구성된다. Fc 도메인의 일부는 CH2 또는 CH3 도메인을 지칭한다. 선택적으로, Fc 영역 또는 도메인은 CH1과 CH2 사이의 힌지 영역의 전부 또는 일부를 선택적으로 포함할 수 있다. 따라서, Fc 도메인은 힌지, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 선택적으로, Fc 도메인은 선택적으로 IgG1 힌지-CH2-CH3 및 IgG4 힌지-CH2-CH3을 갖는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터의 것이다.

[0040] IgG 항체의 맥락에서, IgG 이소형은 각각 3개의 CH 영역을 갖는다. 따라서, IgG의 맥락에서 "CH" 도메인은 다음과 같다: "CH1"은 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따른 위치 118-215를 나타낸다. "힌지"는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따른 위치 216-230을 나타낸다. "CH2"는 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따른 위치 231-340을

나타내고, "CH3"은 Kabat에서와 같이 EU 인덱스에 따른 위치 341-447을 나타낸다.

[0041] "아미노산 변화(amino acid change)" 또는 "아미노산 변형(amino acid modification)"은 본 명세서에서 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변화를 의미한다. "아미노산 변형"은 폴리펩티드 서열에서의 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함한다. 본 명세서에서 "아미노산 치환*amino acid substitution)" 또는 "치환(substitution)"은 모 폴리펩티드 서열의 특정 위치에 있는 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것을 의미한다. "아미노산 삽입(amino acid insertion)" 또는 "삽입(insertion)"은 모 폴리펩티드 서열의 특정 위치에 아미노산을 추가하는 것을 의미한다. "아미노산 결실(amino acid deletion)" 또는 "결실(deletion)"은 모 폴리펩티드 서열의 특정 위치에서 아미노산의 제거를 의미한다. 아미노산 치환은 보존적일 수 있다. 보존적 치환은 주어진 아미노산 잔기를 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하, 벌크 및/또는 소수성)을 갖는 측쇄("R-기")를 갖는 다른 잔기로 대체하는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "아미노산 위치(amino acid position)" 또는 "아미노산 위치 번호(amino acid position number)"는 상호교환적으로 사용되며, 일반적으로 아미노산에 대한 한 문자 코드로 특정되는, 아미노산 서열에서 특정 아미노산의 위치를 지칭한다. 아미노산 서열에서의 첫 번째 아미노산(즉, N 말단에서 시작)은 위치 1을 갖는 것으로 간주되어야 한다.

[0042] 보존적 치환은 주어진 아미노산 잔기를 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하, 벌크 및/또는 소수성)을 갖는 측쇄("R-기")를 갖는 다른 잔기로 대체하는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 보존적 치환 및 해당 규칙은 최신 기술에 잘 설명되어 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 하기 표에 반영된 아미노산 기 내의 치환으로 정의될 수 있다.

[0043] **표 A – 아미노산 잔기**

아미노산 그룹	아미노산 잔기
산성 잔기	ASP 및 GLU
염기성 잔기	LYS, ARG, 및 HIS
친수성 비하전 잔기	SER, THR, ASN, 및 GLN
지방족 비하전 잔기	GLY, ALA, VAL, LEU, 및 ILE
비극성 비하전 잔기	CYS, MET, 및 PRO
방향족 잔기	PHE, TYR, 및 TRP

[0044] **표 B – 대체 보존적 아미노산 잔기 치환 그룹**

1	알라닌 (A)	세린 (S)	트레오닌 (T)
2	아스파르트산 (D)	글루탐산 (E)	
3	아스파라긴 (N)	글루타민 (Q)	
4	아르기닌 (R)	라이신 (K)	
5	이소류신 (I)	류신 (L)	메티오닌 (M)
6	페닐알라닌 (F)	티로신 (Y)	트립토판 (W)

[0045] **표 C – 아미노산 잔기의 추가 대체 물리적 및 기능적 분류**

알코올 그룹-함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
사이클로알케닐-관련 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
소형 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
극소형 잔기	A, G, 및 S
턴 형성에 관련된 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	E, Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0046] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 2개의 서열 사이의 "서열 동일성(sequence identity)"은 "서열 동일성", "서열 유사성(sequence similarity)" 또는 "서열 상동성(sequence homology)" 매개변수에 의해 기술된다. 본 발명의 목적을 위해, 2개의 서열 (A)와 (B) 사이의 "백분율 동일성"은 비교창을 통해 최적 방식으로 정렬된 2개의 서열

을 비교함으로써 결정된다. 서열의 상기 정렬은 예를 들어 Needleman-Wunsch의 전체 정렬을 위한 알고리즘을 사용하여 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하여 다양한 치환, 결실 및 기타 변형에 할당된 유사성 측정을 사용하여 유사한 서열을 매칭시킨다. 전체 정렬이 얻어지면, 정렬된 동일한 아미노산 잔기의 전체 수를 서열 (A)와 (B) 사이의 가장 긴 서열에 포함된 잔기의 전체 수로 나누어 동일성 백분율이 얻어질 수 있다. 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 결정된다. 2개의 아미노산 서열을 비교하기 위해, 예를 들어 기본 설정: (I) Matrix: BLOSUM62, (ii) 갭 오픈(Gap open): 10, (iii) 갭 확장: 0.5, (iv) 출력 형식: 쌍, (v) 단부 간격 패널티: 실패, (vi) 단부 간격 오픈: 10, (vii) 단부 간격 확장: 0.5를 사용하여, 예를 들어 EMBL-EBI에서 제공하고 wwwebiacuk/Tools/services/web/toolformebi?tool=emboss_needle&context=protein에서 입수가능한 단백질의 쌍별 서열 정렬을 위한 도구 "엠보스 바늘(Emboss needle)"을 사용할 수 있다.

[0047] 대안적으로, 서열 동일성은 HHalign 알고리즘과 그의 기본 설정을 그의 핵심 정렬 엔진으로 사용하는 서열 분석 소프트웨어 Clustal Omega를 사용하여 전형적으로 결정될 수도 있다. 알고리즘은 문헌[Soding, J (2005) 'Protein homology detection by HMM-HMM comparison' Bioinformatics 21, 951-960]에 기본 설정과 함께 기재되어 있다.

[0048] 본 명세서에 사용되는 용어 "~로부터 유래(derive from)" 및 "~로부터 유래된(derived from)"은 모 화합물 또는 단백질의 구조로부터 유도된 구조를 갖고 구조가 본 명세서에 개시된 것과 충분히 유사하고 그 유사성에 기초하여 청구된 화합물과 동일하거나 유사한 특성, 활성 및 유용성을 나타내는 것으로 당업자에 의해 예상되는 화합물을 지칭한다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 "약학 조성물(pharmaceutical composition)"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 임의의 다른 화학 성분과 함께 본 발명에 따른 이작용성 분자를 포함하는 것과 같은 활성제 중 하나 이상의 제제를 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 유기체에 대한 활성제의 투여를 용이하게 하는 것이다. 본 발명의 조성물은 임의의 통상적인 투여 또는 사용경로에 적합한 형태일 수 있다. 한 양태에서, "조성물"은 전형적으로 활성제, 예를 들어, 화합물 또는 조성물과, 자연-발생 또는 비-자연-발생 담체, 비활성(예를 들어, 검출가능한 제제 또는 표지) 또는 활성제의 조합, 예컨대 보조제, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 방부제, 보조제 등을 의도하고, 약학으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본 명세서에 언급된 "허용가능한 비히클(acceptable vehicle)" 또는 "허용가능한 담체(acceptable carrier)"는 약학 조성물을 제형화하는데 유용한 것으로 당업자에게 공지된 임의의 공지된 화합물 또는 화합물의 조합이다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 "유효량(effective amount)" 또는 "치료적 유효량(therapeutic effective amount)"은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 활성제와 조합하여 대상체에게 치료 효과를 부여하는 데 필요한 활성제의 양, 예를 들어 표적 질환 또는 장애를 치료하거나, 원하는 효과를 내는 데 필요한 활성제의 양을 지칭한다. "유효량"은 작용제, 질환 및 그 중증도, 연령, 신체 상태, 체격, 성별 및 체중을 포함한 치료 대상체의 특성, 치료 기간, 동시 요법(있는 경우)의 성질, 특정 투여 경로 및 의료 종사자의 지식 및 전문 지식 내에서 유사한 요인에 따라 다르다. 이러한 요인은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 일상적인 실험만으로도 해결할 수 있다. 일반적으로 개별 성분 또는 이들의 조합의 최대 용량, 즉 건전한 의학적 판단에 따른 최고 안전 용량을 사용하는 것이 바람직하다.

[0051] 본 명세서에 사용되는 용어 "약제(medicament)"는 장애 또는 질환에 대한 치유 또는 예방 특성을 갖는 임의의 물질 또는 조성물을 지칭한다.

[0052] 용어 "치료(treatment)"는 질환 또는 질환의 증상을 치료, 방지, 예방 및 지연시키는 등 환자의 건강상태를 개선하기 위한 행위를 지칭한다. 질환의 치유적 치료 및/또는 예방적 치료를 모두 나타낸다. 치유적 치료는 직접적 또는 간접적으로 유발하는 질환 또는 질환의 증상 또는 고통을 경감, 개선 및/또는 제거, 감소 및/또는 안정화하는 치유 또는 치료를 초래하는 치료로 정의된다. 예방적 치료는 질환의 예방을 초래하는 치료 및 질환의 진행 및/또는 발병 또는 이의 발병 위험을 감소 및/또는 지연시키는 치료 둘 다를 포함한다. 특정의 양태에서, 이러한 용어는 질환, 장애, 감염 또는 이와 관련된 증상의 개선 또는 근절을 지칭한다. 다른 양태에서, 이 용어는 암의 확산 또는 악화를 최소화하는 것을 지칭한다. 본 발명에 따른 치료는 반드시 100% 또는 완전한 치료를 의미하지는 않는다. 오히려, 당업자가 잠재적인 이점 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 다양한 정도의 치료가 존재한다. 바람직하게는, 용어 "치료"는 장애/질환이 있는 대상체에 대한 하나 이상의 활성제를 포함하는 조성물의 적용 또는 투여를 지칭한다.

[0053] 본 명세서에 사용되는 용어 "장애(disorder)" 또는 "질환(disease)"은 유전적 또는 발달적 오류, 감염, 독극물,

영양 결핍 또는 불균형, 독성, 또는 불리한 환경 요인의 영향으로 인해 신체의 기관, 부분, 구조 또는 시스템이 잘못 기능하는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 이러한 용어는 건강 장애 또는 질환, 예를 들어, 정상적인 신체적 또는 정신적 기능을 방해하는 질환을 지칭한다. 보다 바람직하게는, 장애라는 용어는 암과 같이 동물 및/또는 인간에 영향을 미치는 면역 및/또는 염증성 질환을 지칭한다.

[0054] 본 명세서에 사용되는 "면역 세포(immune cells)"는 골수에서 생성된 조혈 줄기 세포(HSC), 림프구(T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 자연 살해 T 세포(NKT) 및 골수 유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포)에서 유래된 백혈구 세포(백혈구)와 같은 선천성 및 후천성 면역에 관여하는 세포를 지칭한다. 특히, 면역 세포는 B 세포, T 세포, 특히 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포, NK 세포, NKT 세포, APC 세포, 수지상 세포 및 단핵구를 포함하는 비제한적 목록에서 선택될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 "T 세포"는 예를 들어 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, T 헬퍼 1형 T 세포, T 헬퍼 2형 T 세포, T 헬퍼 17형 T 세포 및 억제성 T 세포를 포함한다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 용어 "T 이펙터 세포(T effector cell)", "T eff" 또는 "이펙터 세포(effector cell)"는 공동-자극과 같은 자극에 능동적으로 반응하는 여러 T 세포 유형을 포함하는 면역 세포의 그룹을 설명한다. 이것은 특히 (예를 들어, 다른 세포의 활성화를 조절하는 사이토카인을 생성하거나 세포독성 활성에 의해) 항원을 제거하는 기능을 하는 T 세포를 포함한다. 여기에는 특히 CD4+, CD8+, 세포독성 T 세포 및 헬퍼 T 세포(Th1 및 Th2)가 포함된다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 용어 "조절 T 세포(regulatory T cell)", Treg 세포" 또는 "T reg"는 면역계를 조절하고, 자가-항원에 대한 내성을 유지하고, 자가면역 질환을 예방하는 T 세포의 하위집단을 지칭한다. Treg는 면역억제제이며, 일반적으로 이펙터 T 세포의 유도 및 증식을 억제하거나 하향조절한다. Treg는 바이오마커 CD4, FOXP3 및 CD25를 발현하며, 나이브 CD4 세포와 동일한 계통에서 유래된 것으로 생각된다.

[0057] 용어 "고갈된 T 세포(exhausted T cell)"는 기능장애(즉, "고갈") 상태에 있는 T 세포의 집단을 지칭한다. T 세포 고갈은 기능의 점진적인 상실, 전사 프로파일의 변화 및 억제 수용체의 지속적인 발현을 특징으로 한다. 고갈된 T 세포는 그들의 사이토카인 생산 능력, 높은 증식 능력 및 세포독성 잠재력을 상실하여, 결국 결실을 초래한다. 고갈된 T 세포는 전형적으로 CD62L 및 CD127의 낮은 발현과 결합된 CD43, CD69 및 억제 수용체의 높은 수준을 나타낸다.

[0058] 용어 "이펙터 기억 줄기 유사 T 세포(effector memory stem like T cell)"는 체크포인트 단백질 PD-1 및 전사 인자 Tcf1의 발현을 포함하여, 고갈된 세포 및 중앙 기억 세포의 특징을 지닌 종양 반응성 종양 내 T 세포의 하위 집합을 지칭한다. 이러한 세포는 $Tcf1^{+}PD\text{-}1^{+}CD8^{+}$ T 세포라고 지칭될 수 있다. 이러한 세포는 종양 미세환경에 상주하며 면역요법에 의해 촉진되는 암의 면역 조절에 중요하다. 그들은 만성 바이러스 감염 및 암 동안 T 세포 반응을 유지하는 데 중요하며 PD-1 면역요법 후 나타나는 증식 폭발을 제공한다. 이 세포는 느린 자가 재생을 거치며 또한 보다 최종적으로 분화되고 고갈된 CD8 T 세포를 생성한다. 이들 세포 및 이들의 특성은 하기 기사에서 추가로 정의되며, 그의 개시내용은 본 명세서에 인용되어 포함된다: 문헌[Siddiqui et al, 2019, Immunity, 50, 195-211]; 및 문헌[Jadhav et al, 2019, PNAS, 116, 14113-14118)].

[0059] 용어 "면역 반응(immune response)"은, 예를 들어, 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구 및 상기 세포 또는 간에서 생성된 가용성 거대분자(항체, 사이토카인 및 보체 포함)의 작용을 지칭하며, 이는 침입하는 병원체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우 정상 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적 손상, 파괴 또는 인체로부터의 제거를 초래한다.

[0060] 본 명세서에 사용되는 용어 "길항제(antagonist)"는 다른 물질의 활성 또는 기능을 차단하거나 감소시키는 물질을 지칭한다. 특히, 이 용어는 참조 물질(예를 들어, PD-L1 및/또는 PD-L2)로서 세포 수용체(예를 들어, PD-1)에 결합하여 일반적인 생물학적 효과(예를 들어, 면역 억제 미세환경의 생성)의 전체 또는 일부를 생성하는 것을 방지하는 항체를 지칭한다. 본 발명에 따른 인간화 항체의 길항제 활성은 경쟁적 ELISA에 의해 평가될 수 있다.

[0061] 본 명세서에 사용되는 용어 "작용제(agonist)"는 활성화 수용체의 기능을 활성화시키는 물질을 지칭한다. 특히, 본 용어는 세포 활성화 수용체에 참조 물질로서 결합하고, 생물학적 천연 리간드와 적어도 부분적으로 동일한 효과(예를 들어, 수용체의 활성화 효과 유도)를 갖는 항체를 지칭한다.

[0062] 약동학(PK)은 신체를 통한 약물의 이동을 지칭하는 반면, 약력학(PD)은 약물에 대한 신체의 생물학적 반응을 지칭한다. PK는 시간의 함수로서 흡수, 분포, 생체이용률, 대사 및 배설을 특성화하여 약물의 노출을 설명한다.

PD는 생화학적 또는 분자적 상호작용의 관점에서 약물 반응을 설명한다. PK 및 PD 분석은 약물 노출을 특성화하고, 투여량의 변화를 예측 및 평가하고, 제거율 및 흡수율을 추정하고, 제형의 상대적 생체이용률/생물학적 동등성을 평가하고, 대상체 내 및 대상체 간 변동성을 특성화하고, 농도-효과 관계를 이해하고, 안전 마진 및 효능 특성을 설정하는 데 사용된다. "PK 개선"은 예를 들어, 분자의 증가된 반감기, 특히 대상체에게 주사될 때 분자의 더 긴 혈청 반감기와 같은 상기 특성 중 하나가 개선됨을 의미한다.

[0063] 본 명세서에 사용되는 용어 "약동학(pharmacokinetics)" 및 "PK"는 상호교환적으로 사용되며 살아있는 유기체에 투여되는 화합물, 물질 또는 약물의 운명을 지칭한다. 약동학은 특히 해방(Liberation)(즉, 조성물로부터 물질의 방출), 흡수(Absorption)(즉, 혈액 순환에서 물질의 유입), 분포(Distribution)(즉, 신체를 통한 물질의 분산 또는 전파), 대사(Metabolism)(즉, 물질의 변형 또는 분해) 및 배설(Excretion)(즉, 유기체로부터 물질의 제거 또는 청소(clearance))를 나타내는, ADME 또는 LADME 체계를 포함한다. 대사와 배설의 두 단계는 또한 제거라는 제목으로 함께 그룹화될 수 있다. 특히 제거 반감기, 제거 일정 속도, 청소율(즉, 단위 시간 당 약물이 제거된 혈장의 부피), Cmax(최대 혈청 농도) 및 약물 노출(곡선 아래 면적에 의해 결정됨, 문헌[Scheff et al, Pharm Res 2011 May;28(5):1081-9] 참조)과 같은 상이한 약동학 매개변수가 당업자에 의해 모니터링될 수 있다.

[0064] 본 명세서에 사용되는 용어 "단리된(isolated)"은 인용된 물질(예를 들어, 항체, 폴리펩티드, 핵산 등)이 자연에서 발생하는 다른 물질로부터 실질적으로 분리되거나 이에 상대적으로 풍부함을 나타낸다. 특히, "단리된" 항체는 자연 환경의 구성요소로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다.

[0065] 본 명세서에 사용되는 용어 "및/또는(and/or)"은 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 2개의 특정된 특징 또는 구성요소 각각의 특정 개시로 간주되어야 한다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 각각이 개별적으로 설정된 것처럼 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각의 특정 개시로 간주된다.

[0066] 단수 표현("a" 또는 "an")은 문맥상 요소 중 하나 또는 둘 이상이 문맥상 명확하지 않거나, 둘 이상의 요소가 설명되는 한 변형되는 요소 중 하나 또는 복수를 나타낼 수 있다(예를 들어, "시약"은 하나 이상의 시약을 의미할 수 있음).

[0067] 임의의 및 모든 값(수치 범위의 하한 및 상한 포함)과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 "약(about)"은 최대 +/- 10%(예를 들어, +/- 0.5%, +/- 1 %, +/- 1.5%, +/- 2%, +/- 2.5%, +/- 3%, +/- 3.5%, +/- 4%, +/- 4.5%, +/- 5%, +/- 5.5%, +/- 6%, +/- 6.5%, +/- 7%, +/- 7.5%, +/- 8%, +/- 8.5%, +/- 9%, +/- 9.5%)의 허용 가능한 편차 범위를 갖는 임의의 값을 의미한다. 값 문자열의 시작 부분에 "약"이라는 용어를 사용하면 각 값이 수정된다(즉, "약 1, 2 및 3"은 약 1, 약 2 및 약 3을 나타냄) 또한, 값 목록이 본 명세서에 설명되어 있는 경우(예를 들어, 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85% 또는 86%), 목록에는 이의 모든 중간 값 및 분수 값(예를 들어, 54%, 85.4%)이 포함된다.

[0068] **이작용성 분자**

[0069] 본 발명은 개선된 특성을 갖는 스캐폴드를 갖는 이작용성 분자에 관한 것이다.

[0070] 보다 특히, 본 발명은 특정 스캐폴드를 갖고 면역 세포 상에서 특이적으로 발현되는 표적 및 단일 면역-자극 사이토카인에 결합하는 단일 1가 항원 결합 도메인을 포함하는 이작용성 분자에 관한 것이다. 이 스캐폴드는 본질적으로 이량체 Fc 도메인인, Fc 도메인의 하나의 단량체의 N 말단 단부에 연결된 면역 세포 상에서 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 단일 1가 항원 결합 도메인 및 i) Fc 도메인의 동일한 단량체의 C 말단 단부에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인, 및 선택적으로 펩티드 링커, 또는 ii) 단일 1가 항원 결합 도메인이 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하고 단일 면역-자극 사이토카인이 상기 항원 결합 도메인의 경쇄의 C 말단 단부에 연결되는 것 중 하나로 이루어진다.

[0071] 특정의 양태에서, 이작용성 분자는 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 Fc 사슬에 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체로서, 상기 제1 Fc 사슬은 선택적으로 펩티드 링커를 통해 면역-자극 사이토카인에 공유적으로 연결되는 것, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는, 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함하며, 상기 제1 및 제2 Fc 사슬은 이량체 Fc 도메인을 형성한다.

[0072] 대안적인 양태에서, 이작용성 분자는 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 Fc 사슬에 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는, 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함하며, 상기 제1 및 제2 Fc 사슬은 이량체 Fc 도메인을 형성하고, 단일 1가 항원 결합 도메인은 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하고 단일 면역-자극 사이토카인은 상기 항원 결합 도메인의

경쇄의 C 말단 단부에 연결된다.

[0073] 따라서, 2개의 단량체는 각각 하나의 Fc 사슬을 포함하고, Fc 사슬은 이량체 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 일 양태에서, 이량체 Fc 융합 단백질은 동종이량체 Fc 도메인이다. 또 다른 양태에서, 이량체 Fc 융합 단백질은 이종이량체 Fc 도메인이다.

[0074] 보다 특히, 이량체 Fc 도메인이 이종이량체 Fc 도메인인 경우, 이작용성 분자는 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 이종이량체 Fc 사슬의 N-말단 단부에 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체로서, 상기 제1 이종이량체 Fc 사슬은, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 면역-자극 사이토카인에 이의 C-말단 단부에 공유적으로 연결되는 것, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는 상보적인 제2 이종이량체 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함한다. 선택적으로, 상보적인 제2 이종이량체 Fc 사슬을 포함하는 상기 제2 단량체는 임의의 다른 기능성 모이어티, 특히 다른 항원 결합 도메인 또는 임의의 사이토카인이 없다. 보다 더 특히, 이작용성 분자는 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 이종이량체 Fc 사슬의 N-말단 단부에 C-말단 단부를 통해 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체로서, 상기 제1 이종이량체 Fc 사슬은, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 면역-자극 사이토카인의 N-말단 단부에 이의 C-말단 단부를 통해 공유적으로 연결된 것, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는, 바람직하게는 임의의 다른 기능성 모이어티가 없는, 상보적인 제2 이종이량체 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함한다. 이러한 이작용성 분자는 예를 들어 도 6에서 면역-자극 사이토카인 또는 포맷 C의 예시로서 IL-7와 함께, 도 1에서 "작제물 3"으로 예시되어 있다.

[0075] 선택적으로, 단일 항원-결합 도메인은 Fab, 'Fab', scFV 및 sdAb로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0076] 따라서, 일 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 하기를 포함하거나 이로 이루어진다:

[0077] (a) 제1 Fc 사슬이 있는 하나의 중쇄, 및 (ii) 하나의 경쇄를 포함하는, 면역 세포 표면 상에서 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 항원-결합 도메인,

[0078] (b) 면역-자극 사이토카인, 및

[0079] (c) 상보적인 제2 Fc 사슬,

[0080] 상기 면역-자극 사이토카인은, 제1 Fc 사슬의 C-말단 단부에, 바람직하게는 이의 N-말단 단부에 의해, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 공유적으로 연결된다. 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬은 함께 이량체 Fc 도메인을 형성한다.

[0081] 특정의 양태에서, 이작용성 분자는 하기를 포함한다:

[0082] - 이의 C-말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 연결된 VH-CH1-힌지-CH2-CH3을 포함하는 하나의 항체 중쇄,

[0083] - 특히 면역 세포 표면에서 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 항원 결합 도메인을 함께 형성하는 VL-CL(불변 경쇄), VH-CH1 모이어티 및 VL-CL 모이어티를 포함하는 하나의 항체 경쇄, 및

[0084] - 항체 중쇄의 CH2-CH3와 이량체 Fc 도메인을 형성하는, CH2-CH3, 선택적으로 힌지-CH2-CH3을 포함하는 하나의 Fc 사슬.

[0085] 대안적 양태에 따르면, 이량체 Fc 도메인이 이종이량체 Fc 도메인인 경우, 이작용성 분자는 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 이종이량체 Fc 사슬의 N-말단 단부에 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체, 및 항원-결합 도메인 및 면역-자극 사이토카인이 없는 상보적인 제2 이종이량체 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 포함하며, 상기 항원-결합 도메인은 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하고, 면역-자극 사이토카인은 상기 항원-결합 도메인의 경쇄의 C 말단 단부에서, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 연결된다. 선택적으로, 상기 면역-자극 사이토카인은, 이의 N 말단 단부에 의해 상기 항원-결합 도메인의 경쇄의 C 말단 단부에서, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 연결된다.

[0086] 따라서, 이러한 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 하기를 포함하거나 이로 이루어진다:

[0087] (a) (i) 제1 Fc 사슬을 갖는 하나의 중쇄, 및 (ii) 하나의 경쇄를 포함하는, 면역 세포 표면 상에서 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 항원-결합 도메인,

[0088] (b) 면역-자극 사이토카인, 및

[0089] (c) 상보적인 제2 Fc 사슬,

[0090] 상기 면역-자극 사이토카인은 경쇄의 C-말단 단부에, 바람직하게는 이의 N-말단 단부에 의해, 선택적으로 펩티드 링커를 통해 공유적으로 연결된다. 제1 Fc 사슬 및 제2 Fc 사슬은 함께 이량체 Fc 도메인을 형성한다.

[0091] 특정의 양태에서, 이작용성 분자는 하기를 포함한다:

[0092] - VH-CH1-힌지-CH2-CH3을 포함하는 하나의 항체 중쇄,

[0093] - 이의 C-말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 연결된 VL-CL(불변 경쇄)을 포함하는 하나의 항체 경쇄, VH-CH1 모이어티와 VL-CL 모이어티는 함께 면역 세포 표면 상에 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 항원 결합 도메인을 형성함, 및

[0094] - 항체 중쇄의 CH2-CH3와 이량체 Fc 도메인을 형성하는, CH2-CH3, 선택적으로 힌지-CH2-CH3을 포함하는 하나의 Fc 사슬.

[0095] 면역-자극 사이토카인, 면역 세포 표면 상에서 특이적으로 발현되는 표적에 결합하는 항원 결합 도메인, Fc 도메인 및 선택적인 링커는 임의의 양태에서 아래에 추가로 정의된 바와 같다.

[0096] **면역-자극 사이토카인**

[0097] 면역-자극 사이토카인은 면역 세포를 자극하거나 활성화할 수 있다. 면역 세포는 B 세포, T 세포, 특히 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포, NK 세포, NKT 세포, APC 세포, 수지상 세포 및 단핵구를 포함하는 비제한적인 목록에서 선택될 수 있다. 바람직한 양태에서, 면역 세포는 T 세포, 보다 구체적으로 CD8+ T 세포, 이펙터 T 세포 또는 고갈된 T 세포이다. 특히 바람직한 양태에서, 면역 세포는 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포이다.

[0098] 바람직하게는, 면역-자극 사이토카인은 사이토카인 및 케모카인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특히, 면역-자극 사이토카인은 10 kDa 내지 50 kDa의 크기를 갖는다. 바람직하게는, 면역-자극 사이토카인은 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질이다. 한 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 비항체 실체 또는 부분이다.

[0099] 예를 들어, 면역-자극 사이토카인은 T 세포 성장 인자, 특히 나이브 T 세포의 수와 레퍼토리를 증가시키는 성장 인자, 수지상 세포(DC)의 수를 증가시키는 성장 인자, DC 및 기타 항원 제시 세포(APC)를 활성화시키는 작용제, 암 백신을 허용하고 강화하는 보조제, T 세포를 활성화하고 자극하는 작용제, T 세포 체크포인트 차단의 억제제, 면역 T 세포의 성장과 생존을 증가시키는 T 세포 성장 인자, 암세포 및 면역세포 유래 면역억제성 사이토카인을 억제, 차단 또는 중화시키는 작용제로부터 선택될 수 있다. 특정의 양태에서, 사이토카인은 T 세포와 같은 효과기 기억 줄기를 활성화하고 자극할 수 있다.

[0100] 면역-자극 사이토카인은 생물학적 활성이 변경되도록 돌연변이되거나 변경될 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 활성이 증가, 감소 또는 완전히 억제된다.

[0101] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-2(IL은 인터류킨임), IL-4, IL-5, IL-6, IL-12A, IL-12B, IL-13; IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IFNα(인터페론 알파), IFNα(인터페론 베타), BAFF, LTα 및 LTβ 또는 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹에서 선택된다. 면역-자극 사이토카인은 IL-7일 수도 있다.

[0102] 특히, 면역-자극 사이토카인은 아래 표 D의 목록에서 선택할 수 있다.

명칭	공식 명칭	Uniprot 참조
IL-2	인터루킨-2, IL-2 (T-세포 성장 인자, TCGF)	P60568
IL-4	인터루킨-4 (B-세포 자극 인자 1, BSF-1, 비네트라킨, 림프구 자극 인자 1, 피트라킨라)	P05112
IL-5	인터루킨-5, B-세포 분화 인자 I, 호산구 분화 인자, T-세포 대체 인자, TRF	P05113
IL-6	인터루킨-6, IL-6 (B-세포 자극 인자 2, BSF-2) (CTL 분화 인자, CDF) (하이브리도마 성장 인자) (인터페론 베타-2, IFN-베타-2)	P05231
IL-7	인터루킨-7	P13232
IL-12A	인터루킨-12 서브유닛 알파, IL-12A (세포독성 림프구 성숙 인자 35 kDa 서브유닛, CLMF p35) (IL-12 서브유닛 p35) (NK 세포 자극 인자 사슬 1, NKSF1)	P29459
IL-12B	인터루킨-12 서브유닛 beta, IL-12B (세포독성 림프구 성숙 인자 40 kDa 서브유닛, CLMF p40) (IL-12 서브유닛 p40) (NK 세포 자극 인자 사슬 2, NKSF2)	P29460
IL-13	인터루킨-13,	P35225
IL-15	인터루킨-15, IL-15	P40933
IL-18	인터루킨-18 (이복타데킨, 인터페론 감마-유도 인자, IFN-감마-유도 인자, 인터루킨-1 감마, IL-1 감마)	Q14116
IL-21	인터루킨-21, IL-21, Za11	Q9HBE4
IL-23	인터루킨-23 서브유닛 알파, IL-23 서브유닛 알파, IL-23-A, 인터루킨-23 서브유닛 p19, IL-23p19	Q9NPF7
IL-24	인터루킨-24, 흑색종 분화-관련 유전자 7 단백질, MDA-7, 종양원성 억제 16 단백질	Q13007
IFNα	인터페론 알파-1 (즉, 인터페론 알파-D), 인터페론 알파-2, (즉, 인터페론 알파-A), 인터페론 알파-4 (즉, 인터페론 알파-4B, 인터페론 알파-76, 인터페론 알파-M), 인터페론 알파-14 (즉, 인터페론 알파-H, 인터페론 lambda-2-H), 인터페론 알파-8 (즉, 인터페론 알파-B, 인터페론 알파-B2), 인터페론 알파-7 (즉, 인터페론 알파-J, 인터페론 알파-J1), 인터페론 알파-17 (즉, 인터페론 알파-88, 인터페론 알파-I, 인터페론 알파-T), 인터페론 알파-5 (즉, 인터페론 알파-61, 인터페론 알파-G), 인터페론 알파-6 (즉, 인터페론 알파-54, 인터페론 알파-K), 인터페론 알파-10 (즉, 인터페론 알파-6L, 인터페론 알파-C), 인터페론 알파-16 (즉, 인터페론 알파-WA)를 포함하는 인터페론 알파	P01562, P01563, P05014, P01570, P32881, P01567, P01571, P01569, P05013, P01566, P05015
IFNβ	인터페론 베타, 섬유아세포 인터페론,	P01574
BAFF	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 13B, TNFSF13B, B-세포-활성화 인자, CD257	Q9WU72
LTα	TNFB_HUMAN 림포독신-알파, LT-알파 (TNF-beta) (종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 1)	P01374
LTβ	림포독신-베타 (LT-beta) 종양 괴사 인자 C	Q06643

[0103] 표 D: 면역자극 사이토카인 목록

[0104] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-2 또는 이의 변이체가 아니다.

[0105] 따라서, 면역-자극 사이토카인은 IL-2(IL은 인터루킨임), IL-4, IL-5, IL-6, IL-12A, IL-12B, IL-13; IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24; IFNα(인터페론 알파), IFNβ(인터페론 베타), BAFF, LTα 및 LTβ, 또는 야생형 단백질 또는 이의 세포외 단편과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹에서 선택된다. 면역-자극 사이토카인은 IL-7일 수도 있다.

[0106] 특히, 면역-자극 사이토카인은 IL-2, IL-15 및 IL-21 또는 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹에서 선택된다.

[0107] 매우 구체적인 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖거나 부가, 결실, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 내지 10개 변형을 갖는 IL-7 또는 이의 변이체이다.

[0108] 매우 구체적인 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-7, 특히 서열번호 1에 제시된 서열을 갖는 IL-7이다.

[0109] 매우 구체적인 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-15 또는 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖거나 부가, 결실, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체이다.

[0110] 매우 구체적인 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-21 또는 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 갖거나 부가, 결실, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부

터 선택되는 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체이다.

[0111] IL-2 및 IL-2 변형체

[0112] 매우 구체적인 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 인터류킨-2(IL-2), 바람직하게는 인간 IL-2, 예를 들어 UniProt 등록 번호 P60568로 개시된 바와 같은 것 또는 이의 돌연변이 또는 변이체이다.

[0113] IL-2 변이체는 바람직하게는 서열번호 87의 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나, 서열번호 87의 서열에 대한 첨가, 결실, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 10개의 변형을 갖는 것이다.

[0114] IL-2는 독성을 감소시키거나 효능을 증가시키기 위해 다양한 방식으로 돌연변이를 일으킬 수 있다. Huet 등(Blood 101, 4853-4861 (2003), 미국 특허 공개 번호 2003/0124678)은 IL-2의 혈관 투과성 활성을 제거하기 위해 IL-2의 38번 위치에 있는 아르기닌 잔기를 트립토판으로 대체했다. Shanafelt 등(Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000))은 NK 세포에 비해 T 세포에 대한 선택성을 향상시키기 위해 아스파라긴 88을 아르기닌으로 돌연변이시켰다. Heatonet 등(Cancer Res 53, 2597-602 (1993); US Pat. No. 5,229,109)은 NK 세포로부터 전염증성 사이토카인의 분비를 감소시키기 위해 Arg38Ala 및 Phe42Lys라는 두 가지 돌연변이를 도입했다. Gillieset 등(미국 특허 공개 번호 2007/0036752)은 VLS를 감소시키기 위해 중간 친화도 IL-2 수용체에 대한 친화도에 기여하는 IL-2의 3개 잔기(Asp20Thr, Asn88Arg 및 Gln126Asp)를 대체했다. Gillieset 등(WO 2008/0034473)은 또한 아미노산 치환 Arg38Trp 및 Phe42Lys에 의해 IL-2와 CD25의 인터페이스를 돌연변이시켜 CD25와의 상호작용 및 Treg 세포의 활성화를 감소시켜 효능 강화했다. 한 양태에서, 면역치료제는, 예를 들어, WO 2012/107417 또는 WO 2018/184964에 설명된 IL-2 돌연변이체이다.

[0115] 선택적으로, IL-2 변이체는 Q11, H16, L18, L19, D20, Q22, R38, F42, K43, Y45, E62, P65, E68, V69, L72, D84, S87, N88, V91, I92, T123, Q126, SI 27, 1129, 및 S130으로 이루어진 그룹에서 선택된 인간 IL-2(신호 펩타이드 없음; 서열번호 87)의 위치에서 하나 또는 여러 개의 치환을 포함할 수 있다. 선택적으로, IL-2 변이체는 인간 IL-2(신호 펩티드 없음; 서열번호 87) F42A 또는 F42K에 대한 치환을 포함할 수 있다. 선택적으로, IL-2 변이체는 R38A, R38D, R38E, E62Q, E68A, E68Q, E68K 및 E68R, and/or H16E, H16D, D20N, M23A, M23R, M23K, S87K, S87A, D84L, D84N, D84V, D84H, D84Y, D84R, D84K, N88A, N88S, N88T, N88R, N88I, V91A, V91T, V91E, I92A, E95S, E95A, E95R, T123A, T123E, T123K, T123Q, Q126A, Q126S, Q126T, Q126E, SI 27 A, S127E, S127K, 및 S127Q, 및/또는 C125A로 이루어진 그룹에서 선택된 인간 IL-2(신호 펩타이드 없음; 서열번호 87)의 위치에서 하나 또는 여러 개의 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0116] 선택적으로, IL-2 변이체는 인간 IL-2(신호 펩타이드 없음; 서열번호 87)에 비해 다음 치환 조합 중 하나를 포함할 수 있다: R38E 및 F42A; R38D 및 F42A; F42A 및 E62Q; R38A 및 F42K; R38E, F42A, 및 N88S; R38E, F42A, 및 N88A; R38E, F42A, 및 V91E; R38E, F42A, 및 D84H; H16D, R38E 및 F42A; H16E, R38E 및 F42A; R38E, F42A 및 Q126S; R38D, F42A 및 N88S; R38D, F42A 및 N88A; R38D, F42A 및 V91E; R38D, F42A, 및 D84H; H16D, R38D 및 F42A; H16E, R38D 및 F42A; R38D, F42A 및 Q126S; R38A, F42K, 및 N88S; R38A, F42K, 및 N88A; R38A, F42K, 및 V91E; R38A, F42K, 및 D84H; H16D, R38A, 및 F42K; H16E, R38A, 및 F42K; R38A, F42K, 및 Q126S; F42A, E62Q, 및 N88S; F42A, E62Q, 및 N88A; F42A, E62Q, 및 V91E; F42A, E62Q, 및 D84H; H16D, F42A, 및 E62Q; H16E, F42A, 및 E62Q; F42A, E62Q, 및 Q126S; R38E, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 C125A; R38A, F42K, 및 C125A; R38E, F42A, N88S, 및 C125A; R38E, F42A, N88A, 및 C125A; R38E, F42A, V91E, 및 C125A; R38E, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38E, F42A, 및 C125A; H16E, R38E, F42A, 및 C125A; R38E, F42A, C125A 및 Q126S; R38D, F42A, N88S, 및 C125A; R38D, F42A, N88A, 및 C125A; R38D, F42A, V91E, 및 C125A; R38D, F42A, D84H, 및 C125A; H16D, R38D, F42A, 및 C125A; H16E, R38D, F42A, 및 C125A; R38D, F42A, C125A, 및 Q126S; R38A, F42K, N88S, 및 C125A; R38A, F42K, N88A, 및 C125A; R38A, F42K, V91E, 및 C125A; R38A, F42K, D84H, 및 C125A; H16D, R38A, F42K, 및 C125A; H16E, R38A, F42K, 및 C125A; R38A, F42K, C125A 및 Q126S; F42A, E62Q, N88S, 및 C125A; F42A, E62Q, N88A, 및 C125A; F42A, E62Q, V91E, 및 C125A; F42A, E62Q, 및 D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 E62Q, 및 C125A; H16E, F42A, E62Q, 및 C125A; F42A, E62Q, C125A 및 Q126S; F42A, N88S, 및 C125A; F42A, N88A, 및 C125A; F42A, V91E, 및 C125A; F42A, D84H, 및 C125A; H16D, F42A, 및 C125A; H16E, F42A, 및 C125A; F42A, C125A 및 Q126S; F42A, Y45A 및 L72G; and T3A, F42A, Y45A, L72G 및 C125A.

[0117] 선택적으로, IL-2 변이체는 인간 IL-2(신호 펩티드 없음; 링번호 87)에 비해 다음 치환 중 하나, 특히 다음을 포함하는 그룹에서 선택된 치환 중 적어도 하나를 포함할 수 있다: K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F,

R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, 및 L72K; 또는 이의 조합, 바람직하게는 3개의 치환 F42A, Y45A 및 L72G.

[0118] CD25에 대한 친화도가 감소된 인간 IL-2(hIL-2)의 돌연변이는, 예를 들어, 인간 IL-2(신호 펩타이드 없음; 서열번호 87) 잔기 위치에 상응하는, 아미노산 위치 3, 35, 38, 42, 43, 45 또는 72 또는 이들의 조합에서 아미노산 치환에 의해 생성될 수 있다.

[0119] 바람직하게는, 돌연변이 IL-2는 인간 IL-2(신호 펩티드 없음; 서열번호 87)에 대해 아미노산 치환 T3A, F42A, Y45A, L72G 및/또는 C125A, 바람직하게는 F42, Y45A 및 L72G, 더욱 바람직하게는 예를 들어, WO 2018/184964에 개시된 것과 같은, T3A, F42A, Y45A, L72G 및 C125A을 포함하는 인간 IL-2 분자이다. 훨씬 더 바람직하게는, 면역-자극 사이토카인은 인간 IL-2(신호 펩티드 없음; 서열번호 87)에 대해 치환 F42A, Y45A 및 L72G, 바람직하게는 T3A, F42A, Y45A, L72G 및 C125A을 갖는 IL-2 돌연변이체이다.

[0120] IL-12A 및 IL-12B 변이체

[0121] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-12A 또는 IL-12B의 변이체이다.

[0122] 예를 들어, N21D, Q35D, E38Q, D55Q, D55K, N71D, N71Q, L75A, N76D, E79Q, N85D, N85Q, L89A, F96A, M97A, L124A, M125A, Q130E, Q135E, N136D, E143Q, Q146E, N151D, N151K, E153K, E153Q, K158E, E162Q, E163Q, D165N, I171A, N195D, 및 N195Q로 이루어진 그룹으로부터 선택된 야생형 IL-12A에 대해 하나 또는 수개의 치환을 갖는 IL-12A의 변이체일 수 있다. 선택적으로, IL-12A의 변이체는 하기 치환 조합 중 하나를 갖는다: N71D/N85D/N195D, N151D/E153Q, N151D/D165N, Q130E/N151D, N151D/K158E, E79Q/N151D, D55Q/N151D, N136D/N151D, N21D/N151D, E143Q/N151D, N71Q/N85Q, N71Q/N195Q, N85Q/N195Q, N71Q/N85Q/N195Q, N71D/N85D, N71D/N195D, 및 N85D/N195D.

[0123] 예를 들어, E59K, E59Q, D18N, D18K, E32Q, E33Q, D34N, D34K, Q42E, S43E, S43K, E45Q, Q56E, D62N, E73Q, D87N, K99E, K99Y, E100Q, N103D, N103Q, N113D, N113Q, Q144E, D161N, R159E, K163E, E187Q, N200D, N200Q, N218Q, Q229E, E235Q, C252S, Q256N, K258E, K260E, E262Q, K264E, N281D, N281Q, 및 E299Q으로 이루어진 그룹에서 선택된 야생형 IL-12B에 대해 하나 또는 TNRODLM 치환을 갖는 IL-12B의 변이체일 수 있다. 선택적으로, IL-12A의 변이체는 하기 치환 조합 중 하나를 갖는다: N103D/N113D/N200D/N281D, Q42E/E45Q, E45Q/Q56E, Q42E/E59Q, Q56E/E59Q, Q42E/E45Q/Q56E, E45Q/Q56E/E59Q, E32Q/E59Q, D34N/E59K, D34N/E59K/K99E, D34K/E59K/K99E, E32Q/D34N/E59K/K99E, E32K/D34N/E59K/K99E, D34N/E59Q, E59Q/E187Q, S43E/E59Q, S43K/E49Q, E59Q/K163E, E59Q/K99E, E59Q/K258E, E59Q/K260E, E59K/K99E, D18K/E59K/K99E, E59K/K99E/K264E, E59K/K99Y, E59Y/K99Y, E59Y/K99E, E45K/E59K/K99E, E59K/K99E/Q144E, E59K/K99E/Q144K, E59K/K99E/R159E, E59K/K99E/K264E, D18K/E59K/K99E/K264E, DI8K/E59K/K99E/C252S, D18K/E59K/K99E/C252S/K264E, E59K/K99Y/C252S, E59K/K99E/C252S/K264E, E59K/K99E/C252S, N103D/N113D, N103D/N200D, N103D/N281D, N113D/N200D, N113D/N281D, N200D/N281D, N103D/N113D/N200D, N103D/N113D/N281D, N103D/N200D/N281D, N113D/N200D/N281D, N103Q/N113Q, N103Q/N200Q, N103Q/N281Q, N113Q/N200Q, N113Q/N281Q, N200Q/N281Q, N103Q/N113Q/N200Q, N103Q/N113Q/N281Q, N103Q/N200Q/N281Q, N113Q/N200Q/N281Q, N103Q/N113Q/N200Q/N281Q, E59K/K99E/N103Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N113Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N200Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N281Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N103Q/N113Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N103Q/N200Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N103Q/N281Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N113Q/N200Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N113Q/N281Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N200Q/N281Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N103Q/N113Q/N200Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N103Q/N200Q/N281Q/C252S/K264E, E59K/K99E/N113Q/N200Q/N281Q/C252S/K264E, 및 E59K/K99E/N103Q/N113Q/N200Q/N281Q/C252S/K264E.

[0124] 본 명세서에 언급된 바와 같이 "/"는 누적되는 치환을 의미한다. 따라서, 돌연변이 Q42E/E45Q는 Q42E 및 E45Q의 치환을 의미한다.

[0125] IL-15 변이체

[0126] 특정의 양태에서, 면역-자극 사이토카인은 IL-15의 변이체이다.

[0127] IL-15 변이체는 바람직하게는 서열번호 88의 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99%의 동일성을 갖거나, 또는서열번호 88의 서열에 대하여 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합

으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 10개의 변형을 갖는다.

[0128] 선택적으로, IL-15 변이체는 N1D,V3I, V3M, V3R, N4D, D8N, D8A, K11L, K11M, K11R, D30N, D61N, E64Q, N65D, N71D, N71S, N72D, N72A, N72R, N72Y, S73I, N77A, N79D, N79E, N79S, Q108E, N112D, N112H, N112M 및 N112Y, preferably N4D, D61N, N65D, 및 Q108E로 이루어진 그룹에서 선택된 인간 IL-15(신호 펩티드 없음; 서열번호 88)의 위치에서 하나 또는 수개의 치환을 포함할 수 있다.

[0129] 선택적으로, IL-15 변이체는 인간 IL-15(신호 펩티드 없음; 서열번호 88)에 대해 하기 치환 중 하나를 포함할 수 있다: N4D/N65D, D30N/N65D, D30N/E64Q, D30N/E64Q/N65D, N1D, N4D, D8N, D30N, D61N, E64Q, N65D, Q108E, N1D/D61N, N1D/E64Q, N4D, D61N, N4D/E64Q, D8N/D61N, D8N/E64Q, D61N/E64Q, N1D/D30N, E64Q/Q108E, N1D/N4D/D8N, D61N/E64Q/N65Q, N1D/D61N/E64Q/Q108E, N4D/D61N, N4D/D61N/E64Q/Q108E, N1D/N65D, N1D/Q108E, N4D/D30N, D30N/Q108E, N65D/Q108E, D30N/Q180E, E64Q/N65D, D61N/E64Q/N65D, N1D/N4D/N65D, N71S/N72A/N77A, 및 N4D/D61N/N65D, 바람직하게는 D30N/E64Q/N65D.

[0130] 본 명세서에 언급된 바와 같이 "/"는 누적되는 치환을 의미한다. 따라서, 돌연변이 N4D/N65D는 N4D 및 N65D의 치환을 의미한다.

[0131] IL-21 변이체

[0132] 특정 양태서, 면역-자극 사이토카인은 IL-21의 변이체이다.

[0133] IL-21 변이체는 바람직하게는 서열번호 89의 야생형 사이토카인과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99%의 동일성을 갖거나, 또는서열번호 89의 서열에 대하여 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 10개의 변형을 갖는다.

[0134] 선택적으로, IL-21 변이체는 인간 IL-21에 대해 다음 치환 중 하나를 포함할 수 있다: R5A, R5D, R5E, R5G, R5H, R5I, R5K, R5L, R5M, R5N, R5Q, R5S, R5T, R5V, R5Y, I8A, I8D, I8E, I8G, I8N, I8S, R9A, R9D, R9E, R9G, R9H, R9I, R9K, R9L, R9M, R9N, R9Q, R9S, R9T, R9V, R9Y, R11D, R11S, Q12A, Q12D, Q12E, Q12N, Q12S, Q12T, Q12V, L13D, I14A, I14D, I14S, D15A, D15E, D15I, D15M, D15N, D15Q, D15S, D15T, D15V, I16D, I16E, Q19D, Y23D, R65D, R65G, R65P, I66D, I66G, I66P, N68Q, V69D, V69G, V69P, S70E, S70G, S70P, S70Y, S70T, K72D, K72G, K72P, K72A, K73A, K73D, K73E, K73G, K73H, K73I, K73N, K73P, K73Q, K73S, K73V, K75D, K75G, K75P, R76A, R76D, R76E, R76G, R76H, R76I, R76K, R76L, R76M, R76N, R76P, R76Q, R76S, R76T, R76V, R76Y, K77D, K77G, K77P, P78D, P79D, S80G, S80P, E109K, R110D, K112D, S113K, Q116A, Q116D, Q116E, Q116I, Q116K, Q116L, Q116M, Q116N, Q116S, Q116T, Q116V, K117D, I119A, I119D, I119E, I119M, I119N, I119Q, I119S, I119T, H120D 및 L123D, 바람직하게는 R5E 및 R76E, R5E 및 R76A, R5A 및 R76A, R5Q 및 R76A, R5A 및 R76E, R5Q 및 R76E, R9E 및 R76E, R9A 및 R76E, R9E 및 R76A, R9A 및 R76A, D15N 및 S70T, D15N 및 I71L, D15N 및 K72A, D15N 및 K73A, S70T 및 K73Q, S70T 및 R76A, S70T 및 R76D, S70T 및 R76E, I71L 및 K73Q, I71L 및 R76A, I71L 및 R76D, I71L 및 R76E, K72A 및 K73Q, K72A 및 R76A, K72A 및 R76D, K72A 및 R76E, K73A 및 R76A, K73A 및 R76D, or K73A 및 R76E.

[0135] **면역 세포를 특이적으로 표적화하는 항원 결합 도메인**

[0136] 본 발명에 따르면, 항원 결합 도메인은 면역 세포 표면에 발현된 표적, 특히 면역 세포에서만 또는 특이적으로 발현되는 표적에 특이적으로 결합한다. 특히, 항원 결합 도메인은 종양 세포에서 발현되는 표적을 향하지 않는다.

[0137] 항원 결합 도메인의 "결합(binding)" 능력과 관련하여, 용어 "결합하다(bind)" 또는 "결합하는(binding)"은 또 다른 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 분자를 인식하고 접촉하는 항체 단편 및 항체 유도체를 포함하는 항체를 지칭한다. 특정 표적에 대해, "특이적 결합(specific binding)", "특이적으로 결합한다(specifically binds to)", "~에 대해 특이적(specific for)", "선택적으로 결합한다(selectively binds)" 및 "선택적인(selective for)"이라는 용어는 항원 결합 도메인이 특정 표적을 인식하고 결합하지만, 샘플 내 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 항원에 특이적으로(또는 우선적으로) 결합하는 항체는 예를 들어 다른 분자에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합력, 더 쉽게 및/또는 더 긴 지속 시간으로 항원에 결합하는 항체이다. 바람직하게는, 용어 "특이적 결합"은 10^{-7} M 이하의 결합 친화도로 항체와 항원 사이의 접촉을 의미한다. 특정의 양태에서, 항체는 10^{-8}M, 10^{-9}M 또는 10^{-10}M 이하의 친화도로 결합한다.

[0138] 선택적으로, 항원-결합 도메인은 Fab 도메인, Fab', 단일-사슬 가변 단편(scFV) 또는 단일 도메인 항체(sdAb)일 수 있다. 항원-결합 도메인 바람직하게는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0139] 항원-결합 도메인이 Fab 또는 Fab'인 경우, 이작용성 분자는 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 불변 도메인(즉, CH 및 CL)을 포함하고, 중쇄는 이의 C-말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 연결된다.

[0140] 본 명세서에 사용된 용어 "표적(target)"은 본 발명에 따른 항원 결합 도메인에 의해 특이적으로 인식되거나 표적화되고 면역 세포의 외부 표면에 발현되는 탄수화물, 지질, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 항원 또는 에피토프를 의미한다. 면역 세포 표면에서의 표적 발현과 관련하여, "발현된(expressed)"이라는 용어는 세포의 외부 표면에 존재하거나 제시되는 탄수화물, 지질, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 항원 또는 에피토프와 같은 표적을 의미한다. "특이적으로 발현된(specifically expressed)"이라는 용어는 표적이 면역세포에서는 발현되지만, 특히 종양 세포와 같은, 다른 세포 유형에서는 실질적으로 발현되지 않는 것을 의미한다.

[0141] 일 양태에서, 표적은 건강한 대상체 또는 특히 암과 같은 질병을 앓고 있는 대상체의 면역 세포에 의해 특이적으로 발현된다. 이는 표적이 다른 세포보다 면역세포에서 발현 수준이 더 높거나, 전체 면역세포에서 표적을 발현하는 면역세포의 비율이 나머지 전체 세포에서 표적을 발현하는 다른 세포의 비율보다 높다는 것을 의미한다. 바람직하게는 발현 수준 또는 비율은 인자 2, 5, 10, 20, 50 또는 100만큼 더 높다. 보다 구체적으로, 특정 유형의 면역 세포, 예를 들어 T 세포, 보다 구체적으로 CD8+ T 세포, 이펙터 T 세포 또는 고갈된 T 세포, 또는 특정 맥락에서 예를 들어 암 또는 감염과 같은 질병을 앓고 있는 대상체에 대해 결정될 수 있다.

[0142] 본 명세서에 사용된 바와 같이,"면역 세포(Immune cells)"는 선천성 및 후천성 면역에 관여하는 세포, 예를 들어 골수에서 생성된 조혈 줄기 세포(HSC)에서 유래된 백혈구 세포(백혈구), 림프구(T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 자연 살해 T 세포(NKT)) 및 골수-유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포)를 지칭한다. 특히, 면역 세포는 B 세포, T 세포, 특히 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포, NK 세포, NKT 세포, APC 세포, 대식세포, 수지상 세포 및 단핵구를 포함하는 비제한적 목록에서 선택될 수 있다.

[0143] 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 B-세포, T-세포, 자연 살해, 수지상 세포, 단핵구 및 선천성 림프구 세포(ILC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 표적 발현 면역 세포에 특이적으로 결합한다.

[0144] 보다 더 바람직하게는, 면역 세포는 T 세포이다. 본 명세서에 사용된 “T 세포” 또는 “T 림프구”는 예를 들어 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, T 헬퍼 1형 T 세포, T 헬퍼 2형 T 세포, T 조절자, T 헬퍼 17형 T 세포 및 억제 T 세포를 포함한다. 매우 특정한 양태에서, 면역 세포는 고갈된 T 세포이다.

[0145] 특정의 양태에서, 면역 세포는 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포이다.

[0146] 표적은 면역 세포, 특히 T 세포의 표면에서 발현되는 수용체일 수 있다. 수용체는 억제제 수용체일 수 있다. 대안적으로, 수용체는 활성화 수용체일 수 있다.

[0147] 한 양태에서, 표적은 PD-1, CD28, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CD3, PDL1; PDL2 및 PDL1로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이러한 표적은 아래 표 E에 더욱 구체적으로 설명되어 있다.

[0148]

명칭	공식 명칭	Uniprot 참조
2B4	자연 살해 세포 수용체 2B4 (NK 세포 유형 I 수용체 단백질 2B4, NKR2B4) (비-MHC 제한 살해 관련) (SLAM 패밀리 구성원 4, SLAMF4) (신호전달 림프구 활성화 분자 4) (CD 항원 CD244)	Q07763
4-1BB	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 9 (4-1BB 리간드 수용체, CD137)	Q07011
BTLA	B- 및 T-림프구 감쇠인자 (B- 및 T-림프구-관련 단백질) (CD 항원 CD272)	Q7Z6A9
CD101	면역글로불린 수퍼패밀리 구성원 2, IgSF2 (세포 표면 당단백질 V7) (Glu-Trp-Ile EWI 모티프-함유 단백질 101, EWI-101) (CD 항원 CD101)	Q93033
CD160	CD160 항원 (자연 살해 세포 수용체 BY55)	O95971

[0149]

CD27	CD27 항원 (CD27L 수용체) (T-세포 활성화 항원 CD27) (T14) (종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 7) (CD 항원 CD27)	P26842
CD28	T-세포-특이적 표면 당단백질 CD28 (TP44)	P10747
CD28H	막횡단 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 2 (CD28 상동체) (면역글로불린 및 프롤린-풍부 수용체 1, IGPR-1)	Q96BF3
CD3	T-세포 표면 당단백질 CD3	P07766 (CD3e) P04234 (CD3d) P09693 (CD3g)
CD30	종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 8 (CD30 리간드, CD30-L) (CD 항원 CD153)	P32971
CD38	ADP-리보실 사이클라제/사이클릭 ADP-리보스 하이드롤라제 1 (ADPRC 1, cADPr 하이드롤라제 1)	P28907
CD39	엑토뉴클레오사이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제-1 (NTPDase 1, 엑토-아피라제, ATPDase 1, 또는 림프성 세포 활성화 항원)	P49961
CD40L	CD40 리간드 (T-세포 항원 Gp39, TNF-관련 활성화 단백질, 종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 5, CD154)	P29965
CD44	CD44 항원 (에피칸, 세포외 기질 수용체 III, GP90 림프구 호밍/부착 수용체, HUTCH-I, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 헤르메스 항원, 히알루로네이트 수용체, 식세포 당단백질 1, 식세포 당단백질 I)	P16070
CTLA-4	세포독성 T-림프구 단백질 4 (세포독성 T-림프구-관련 항원 4, CTLA-4) (CD 항원 CD152)	P16410
DR3	사멸 수용체 3 (종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 25, WSL, Apo-3, LARD)	Q93038
GITR	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 18 (활성화-유도성 TNFR 패밀리 수용체, 글루코코르티코이드-유발 TNFR-관련 단백질, CD357)	Q9Y5U5
HVEM	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 14 (헤르페스 바이러스 진입 매개인자 A, 헤르페스바이러스 진입 매개인자 A, HveA) (종양 괴사 인자 수용체-like 2, TR2) (CD 항원 CD270)	Q92956
ICOS	유도성 T-세포 보조자극인자 (활성화-유도성 림프구 면역조절 분자, CD278)	Q9Y6W8
LAG3	림프구 활성화 유전자 3 단백질, LAG-3 (단백질 FDC) (CD 항원 CD223)	P18627
LFA-1	백혈구 부착 당단백질 LFA-1 알파 사슬 (인테그린 알파-L, CD11 항원-유사 패밀리 구성원 A)	P20701
NKG2D	NKG2-D 유형 II 통합 막 단백질 (킬러 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 K 구성원 1, NK 세포 수용체 D, NKG2-D-활성화 NK 수용체, CD314)	P26718
OX40	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 4 (ACT35 항원, AX 전사적으로 활성화된 당단백질 1 수용체)	P43489
PD-1	프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 (CD279)	Q15116
PDL1	프로그래밍된 세포 사멸 1 리간드 1, PDL1, PD-L1, PDCD1 리간드 1, B7-H1, CD274	Q9NZQ7

PDL2	프로그래밍된 세포 사멸 1 리간드 2, PD-1 리간드 2, PD-L2, PDCD1 리간드 2, 프로그래밍된 사멸 리간드 2 (부티로필린 B7-DC, B7-DC) (CD 항원 CD273)	Q9BQ51
SIRPG	신호-조절 단백질 감마, SIRP-감마 (CD172 항원-유사 패밀리 구성원 B) (신호-조절 단백질 베타-2, SIRP-b2, SIRP-베타-2) (CD 항원 CD172g)	Q9P1W8
TIGIT	Ig 및 ITIM 도메인이 있는 T-세포 면역수용체(V-세트 및 면역글로불린 도메인-함유 단백질 9) (V-세트 및 막횡단 도메인-함유 단백질 3)	Q495A1
Tim-1	A 형 간염 바이러스 세포 수용체 1 (T-세포면역글로불린 및 뮤신 도메인-함유 단백질 1, 신장 손상 분자 1, KIM-1, T-세포 면역글로불린 뮤신 수용체 1, T-세포 막 단백질 1, CD365)	Q96D42
TIM3	A 형 간염 바이러스 세포 수용체 2, HAVcr-2 (T-세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인-함유 단백질 3, TIMD-3) (T-세포 면역글로불린 뮤신 수용체 3, TIM-3) (T-세포 막 단백질 3)	Q8TDQ0

[0150] **표 E.** 관심 표적의 예.

[0151] 그런 다음, 이 양태에서 항원 결합 도메인은 PD-1, CD28, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CD3, PDL2 및 PDL1으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 표적에 특이적으로 결합한다.

[0152] 특정의 양태에서, 면역 세포는 고갈된 T 세포 또는 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포이이고 항원 결합 도메인의 표

적은 고갈된 T 세포 또는 이펙터 기억 줄기 유사 T 세포의 표면 상에 발현된 인자이다. T 세포 고갈은 T 세포의 기능, 증식 능력 및 세포독성 가능성이 점진적으로 상실되어 결국에는 결실을 초래하는 상태이다. T 세포 고갈은 PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT 및 CD160을 포함한 지속적인 항원 노출 또는 억제 수용체와 같은 여러 요인에 의해 유발될 수 있다. 바람직하게는, 그러한 인자, 특히 그러한 고갈 인자는 PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG3, BTLA, TIGIT 및 CD160으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0153] 바람직한 양태에서, 항원 결합 도메인은 표적에 대해 길항제 활성을 갖는다.

[0154] PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT 및 CD160에 대한 수많은 항체가 이미 당업계에 기술되어 있다.

[0155] 몇몇 항-PD-1이 이미 임상적으로 승인되었고, 나머지는 아직 임상 개발 중이다. 예를 들어, 항-PD1 항체는 펨브롤리주맙(키트루다 람브롤리주맙, MK-3475로도 알려짐), 니볼루맙(옵디보, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538), 피딜리주맙(CT-011), 세미플리맙(리브타요), 캄렐리주맙, AUNP12, AMP-224, AGEN-2034, BGB-A317(티슬레이주맙), PDR001(스파르탈리주맙), MK-3477, SCH-900475, PF-06801591, JNJ-63723283, 게놀림주맙(CBT-501), LZM-009, BCD-100, SHR-1201, BAT-1306, AK-103(HX-008), MEDI-0680(AMP-514로도 알려짐) MEDI0608, JS001(문헌[Si-Yang Liu et al, J Hematol Oncol10:136 (2017)] 참조), BI-754091, CBT-501, INCSHR1210(SHR-1210로도 알려짐), TSR-042(ANB011로도 알려짐), GLS-010(WBP3055로도 알려짐), AM-0001(Armo), STI-1110(국제특허공개 WO 2014/194302호 참조), AGEN2034(WO 2017/040790 참조), MGA012(WO2017/19846 참조), 또는 IBI308(국제특허공개 WO 2017/024465호, 국제특허공개 WO 2017/025016호, 국제특허공개 WO 2017/132825호, 및 국제특허공개 WO 2017/133540호 참조), 국제특허공개 WO 2006/121168호에 기재된 단일클론 항체 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3, 및 5F4로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. PD-1을 표적으로 하는 이작용성 또는 이중특이성 분자는 또한 RG7769(Roche), XmAb20717(Xencor), MEDI5752(AstraZeneca), FS118(F-star), SL-279252(Takeda) 및 XmAb23104(Xencor)와 같이 알려져 있다.

[0156] 특정의 양태에서, 항-PD1 항체는 펨브롤리주맙(키트루다 람브롤리주맙, MK-3475로도 알려짐) 또는 니볼루맙(옵디보, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538)일 수 있다.

[0157] TIM3에 대한 항체 및 TIM3을 표적으로 하는 이중작용성 또는 이중특이적 분자도 Sym023, TSR-022, MBG453, LY3321367, INCAGN02390, BGTB-A425, LY3321367, RG7769(Roche)와 같이 알려져 있다. 일부 양태에서, TFM-3 항체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO2013006490, WO2016/161270, WO 2018/085469, 또는 WO 2018/129553, WO 2011/155607, U.S. 8,552,156, EP 2581113 및 U.S 2014/044728에 개시된 바와 같다.

[0158] CTLA-4에 대해 유도된 항체 및 CTLA-4를 표적으로 하는 이중작용성 또는 이중특이적 분자도 이필리무맙, 트레멜리무맙, MK-1308, AGEN-1884, XmAb20717(Xencor), MEDI5752(AstraZeneca)와 같이 알려져 있다. 항-CTLA-4 항체는 또한 WO18025178, WO19179388, WO19179391, WO19174603, WO19148444, WO19120232, WO19056281, WO19023482, WO18209701, WO18165895, WO18160536, WO18156250, WO18106862, WO18106864, WO18068182, WO18035710, WO18025178, WO17194265, WO17106372, WO17084078, WO17087588, WO16196237, WO16130898, WO16015675, WO12120125, WO09100140 및 WO07008463에 개시되어 있다.

[0159] LAG3에 대해 유도된 항체 및 LAG-3을 표적으로 하는 이중작용성 또는 이중특이적 분자도 BMS-986016, IMP701, MGD012 또는 MGD013(이중특이적 PD-1 및 LAG-3 항체)과 같이 알려져 있다. 항-LAG-3 항체는 또한 WO2008132601, EP2320940, WO19152574에 개시되어 있다. BTLA에 대해 유도된 항체는 또한 hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 또는 hu Mab4C7과 같이 당업계에 알려져 있다. BTLA에 대한 항체 TAB004는 현재 진행성 악성 종양이 있는 피험자를 대상으로 임상 시험 중이다. 항-BTLA 항체는 WO08076560, WO10106051(예를 들어, BTLA8.2), WO11014438(예를 들어, 4C7), WO17096017 및 WO17144668(예를 들어, 629.3)에도 개시되어 있다.

[0160] TIGIT에 대해 유도된 항체는 또한 BMS-986207 or AB154, BMS-986207 CPA.9.086, CHA.9.547.18, CPA.9.018, CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541.7, 및 WO19232484에 개시된 것과 같은 CHA.9.541.8와 같이 당업계에 공지되어 있다.

항-TIGIT 항체는 또한 WO16028656, WO16106302, WO16191643, WO17030823, WO17037707, WO17053748, WO17152088, WO18033798, WO18102536, WO18102746, WO18160704, WO18200430, WO18204363, WO19023504, WO19062832, WO19129221, WO19129261, WO19137548, WO19152574, WO19154415, WO19168382 및 WO19215728에 개시되어 있다.

[0161] CD160에 대해 유도된 항체는 WO06015886에 개시된 CL1-R2 CNCM I-3204, 또는 WO10006071, WO10084158, WO18077926에 개시된 다른 항체와 같이 당업계에 또한 공지되어 있다.

[0162] PD-L1에 대한 항체도 해당 분야에 알려져 있다. 인간 PD-L1에 결합하고 본 발명에 유용한 모노클로날 항체의 예는 WO 2007/005874, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2010/089411, WO 2013/019906, WO 2013/079174, WO 2014/100079, WO 2015/061668, 및 US 8,552,154, US 8,779,108 및 US 8,383,796에 기재되어 있다. 특정 항-인간 PD-L1 단클론 항체는, 예를 들어, 제한 없이, 아벨루맙(MSB0010718C), 두르발루맙(MEDI4736, ADCC를 제거하기 위해 Fc 도메인에 삼중 돌연변이가 있는 조작된 IgG1 카파 단클론 항체), 아테졸리주맙(MPLDL3280A), MPDL3280A(IgG1 조작 항 PD-L1 항체), 및 BMS-936559(완전 인간 항 PD-L1, IgG4 단일클론 항체)을 포함한다.

[0163] 바람직한 양태에서, 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 및 TIM3에 특이적인 항체, 이의 단편 또는 유도체이다.

[0164] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 PD-1이고 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 PD-1에 특이적인 항체 모방체이다. 그런 다음, 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-PD1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-PD1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 PD-1의 길항제이다.

[0165] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 CTLA-4이고 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 CTLA-4에 특이적인 항체 모방체이다. 그런 다음, 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원 결합이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 CTLA-4의 길항제이다.

[0166] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 BTLA이고 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 BTLA에 특이적인 항체 모방체이다. 그런 다음, 특정 측면에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-BTLA 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 BTLA의 길항제이다.

[0167] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 TIGIT이고, 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 TIGIT에 특이적인 항체 모방체이다. 그런 다음, 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-TIGIT 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 TIGIT의 길항제이다.

[0168] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 LAG-3이고 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 LAG-3에 특이적인 항체 모방체이다. 이어서, 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-LAG-3 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-LAG-3 항체 또는 이의 항원 결합이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 LAG-3의 길항제이다.

[0169] 또 다른 특정의 양태에서, 표적은 TIM3이고, 이작용성 분자의 항원 결합 도메인은 항체, 이의 단편 또는 유도체 또는 TIM3에 특이적인 항체 모방체이다. 그런 다음, 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자에 포함된 항원 결합 도메인은 항-TIM3 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항-TIM3 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 TIM3의 길항제이다.

[0170] 본 개시의 매우 구체적인 양태에서, 항원 결합 도메인은 PD-1을 표적으로 하고 국제특허공개 WO2020/127366호에 개시된 항체로부터 유래되며, 이의 개시내용은 본 명세서에 인용되어 포함된다.

[0171] 이어서, 항원-결합 도메인은 하기를 포함한다:

[0172] (i) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및

[0173] (ii) LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인,

[0174] 여기서:

[0175] - 중쇄 CDR1(HCDR1)은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 51의 위치 3을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0176] - 중쇄 CDR2(HCDR2)는 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 53의 위치 13, 14 및 16을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0177] - 중쇄 CDR3(HCDR3)은 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 X1은 D 또는 E이고 X2는 T, H, A, Y, N, E 및 S로 이루어진 그룹, 바람직하게는 H, A, Y, N, E 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 선택적으로, 서열번호 54의 위치 2, 3, 7 및 8을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0178] - 경쇄 CDR1(LCDR1)은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 X는 G 또는 T이고, 선택적으로, 서열번호 63의 위치 5, 6, 10, 11 및 16을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0179] - 경쇄 CDR2(LCDR2)는 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0180] - 경쇄 CDR3(LCDR3)은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 16의 위치 1, 4 및 6을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있다.

[0181] 일 양태에서, 항원-결합 도메인은 하기를 포함한다:

[0182] (i) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및

[0183] (ii) LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인,

[0184] 여기서:

[0185] - 중쇄 CDR1(HCDR1)은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 51의 위치 3을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0186] - 중쇄 CDR2(HCDR2)는 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 53의 위치 13, 14 및 16을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0187] - 중쇄 CDR3(HCDR3)은 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 X1은 D이고 X2는 T, H, A, Y, N, E 및 S로 이루어진 그룹, 바람직하게는 H, A, Y, N, E로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나; X1은 E이고 X2는 T, H, A, Y, N, E 및 S로 이루어진 그룹, 바람직하게는 H, A, Y, N, E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 선택적으로, 서열번호 54의 위치 2, 3, 7 및 8을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0188] - 경쇄 CDR1(LCDR1)은 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서 X1은 G 또는 T이고, 선택적으로, 서열번호 63의 위치 5, 6, 10, 11 및 16을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0189] - 경쇄 CDR2(LCDR2)는 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음;

[0190] - 경쇄 CDR3(LCDR3)은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 선택적으로, 서열번호 16의 위치 1, 4 및 6을 제외한 임의의 위치에 치환, 부가, 결실 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3개의 변형이 있음.

[0191] 또 다른 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 하기를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다: (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 또는 62의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64 또는 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄.

[0192] 또 다른 양태에서, 항원-결합 도메인은 하기를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다:

[0193] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 55의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0194] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 56의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0195] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 57의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0196] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 58의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0197] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 59의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0198] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 60의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0199] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 61의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0200] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 62의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 64의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0201] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 55의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0202] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 56의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0203] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 57의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0204] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 58의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0205] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 59의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0206] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 60의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0207] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 61의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄; 또는

[0208] (i) 서열번호 51의 CDR1, 서열번호 53의 CDR2 및 서열번호 62의 CDR3을 포함하는 중쇄; 및 (ii) 서열번호 65의 CDR1, 서열번호 66의 CDR2 및 서열번호 16의 CDR3을 포함하는 경쇄.

[0209] 일 양태에서, 항원-결합 도메인은 하기를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다:

[0210] (a) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH), 여기서 X1은 D 또는 E이고 X2는 T, H, A, Y, N, E 및 S로 이루어진 그룹, 바람직하게는 H, A, Y, N, E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0211] 선택적으로 서열번호 17의 위치 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 및 112를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있음;

[0212] (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL), 여기서 X는 G 또는 T이고, 선택적으로 서열번호 26의 위치 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 및 105를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의

변형이 있음.

[0213] 또 다른 양태에서, 항원-결합 도메인 하기를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다:

[0214] (a) 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH), 선택적으로 각각 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25의 위치 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 및 112를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있음;

[0215] (b) 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL), 선택적으로 서열번호 27 또는 서열번호 28의 위치 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 및 105를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있다.

[0216] 또 다른 양태에서, 항원-결합 도메인 하기를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다:

[0217] (a) 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변 영역(VH);

[0218] (b) 서열번호 27 또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변 영역(VL).

[0219] 일 양태에서, 이작용성 분자는 프레임워크 영역, 특히 중쇄 가변 영역 프레임워크 영역(HFR) HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 영역(LFR) LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4를 포함하고, 특히 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4는 각각 서열번호 41, 42, 43 및 44의 아미노산 서열을 포함하고, 선택적으로 HFR3, 즉 서열번호 43의 위치 27, 29 및 32를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있다. 바람직하게는, 이작용성 분자는 서열번호 41의 HFR1, 서열번호 42의 HFR2, 서열번호 43의 HFR3 및 서열번호 44의 HFR4를 포함한다. 또한, 이작용성 분자는 각각 서열번호 45, 46, 47 및 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 프레임워크 영역(LFR) LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4를 포함할 수 있으며, 선택적으로 치환, 부가, 결실 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있다. 바람직하게는, 이작용성 분자는 서열번호 45의 LFR1, 서열번호 46의 LFR2, 서열번호 47의 LFR3 및 서열번호 48의 LFR4를 포함한다.

[0220] 또 다른 양태에서, 항원-결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 하기 하기의 조합을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다:

[0221]

VH (서열번호), 선택적으로 하기 서열번호의 위치 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 및 112 를 제외한 임의의 위치에서 치환(들), 부가(들), 결실(들) 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3 개의 변형이 있음:	VL (서열번호), 선택적으로 하기 서열번호의 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 및 105 의 임의의 위치에서 치환(들), 부가(들), 결실(들) 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 1, 2, 또는 3 개의 변형(들)이 있음:
18	27
18	28
19	27
19	28
20	27
20	28
21	27
21	28
22	27
22	28
23	27
23	28
24	27
24	28
25	27
25	28

[0222] 매우 특정한 양태에서, 항원-결합 도메인은 서열번호 24의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호 28의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다.

[0223] **바람직한 조합**

[0224] 면역 세포 표면에 특이적으로 발현되는 표적과 면역-자극 사이토카인의 특정 조합이 본 명세서에서 고려된다.

[0225] 제1 양태에서, 이작용성 분자는 PD-1 및 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 및 이의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 PD-1과 IL-12, IL-15, IL-21 및 이들의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 다음 조합 중 하나를 포함한다: a) PD-1 및 IL-2 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; b) PD-1 및 IL-7에 결합하는 항원 결합 도메인; c) PD-1 및 IL-12 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; d) PD-1 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; e) PD-1 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; 또는 f) PD-1 및 IL-21 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인.

[0226] 제2 양태에서, 이작용성 분자는 PD-L1 및 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 및 이의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 다음 조합 중 하나를 포함한다: a) PD-L1 및 IL-2 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; b) PD-L1 및 IL-7에 결합하는 항원 결합 도메인; c) PD-L1 및 IL-12 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; d) PD-L1 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; e) PD-1 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; 또는 f) PD-L1 및 IL-21 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인.

[0227] 제3 양태에서, 이작용성 분자는 PD-L2 및 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 및 이의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 다음 조합 중 하나를 포함한다: a) PD-L2 및 IL-2 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; b) PD-L2 및 IL-7에 결합하는 항원 결합 도메인; c) PD-L2 및 IL-12 또는 그의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; d) PD-L2 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; e) PD-L2 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; 또는 f) PD-L2 및 IL-21 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인.

[0228] 제4 양태에서, 이작용성 분자는 CTLA-4 및 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 및 이의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 다음 조합 중 하나를 포함한다: a) CTLA-4 및 IL-2 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; b) CTLA-4 및 IL-7에 결합하는 항원 결합 도메인; c) CTLA-4 및 IL-12 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; d) CTLA-4 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; e) CTLA-4 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; 또는 f) CTLA-4 및 IL-21 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인.

[0229] 제5 양태에서, 이작용성 분자는 TIM3과 IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 및 이의 변이체, 및 IL-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역-자극 사이토카인에 결합하는(바람직하게는 길항하는) 항원 결합 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이작용성 분자는 다음 조합 중 하나를 포함한다: a) TIM3 및 IL-2 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; b) TIM3 및 IL-7에 결합하는 항원 결합 도메인; c) TIM3 및 IL-12 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; d) TIM3 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; e) PD-1 및 IL-15 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인; 또는 f) TIM3 및 IL-21 또는 이의 변이체에 결합하는 항원 결합 도메인.

[0230] **펩티드 링커**

[0231] 특정의 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 항원 결합 도메인과 면역-자극 분자를 Fc 사슬에 연결하는 펩티드 링커를 추가로 포함한다. 펩티드 링커는 일반적으로 면역-자극 분자와 그 사이에 링커와 연결된 항원 결합 도메인이 그의 기능을 발휘하기에 충분한 공간적 자유를 갖도록 하기에 충분한 길이와 유연성을 갖는다.

[0232] 본 개시의 양태에서, 면역-자극 분자는 바람직하게는 펩티드 링커를 통해 Fc 사슬에 연결된다. 본 개시의 이러한 양태에서, 항원 결합 도메인은 VH 도메인, 특히 CH1 도메인을 Fc 사슬의 CH2 도메인에 연결하기 위한 중쇄에서 자연적으로 발견되는 힌지에 의해 Fc 사슬에 연결될 수 있다.

[0233] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "링커(linker)"는 적어도 하나의 아미노산의 서열을 지칭한다. 이러한 링

커는 입체 장애를 방지하는 데 유용할 수 있다. 링커는 일반적으로 길이가 3 내지 44개의 아미노산 잔기이다. 바람직하게는, 링커는 3 내지 30개의 아미노산 잔기를 갖는다. 일부 양태에서, 링커는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 아미노산 잔기를 갖는다.

[0234] 링커 서열은 자연 발생 서열 또는 비-자연 발생 서열일 수 있다. 치료 목적으로 사용되는 경우, 링커는 바람직하게는 이작용성 분자가 투여되는 대상체에서 비-면역원성이다. 링커 서열의 하나의 유용한 군은 국제특허공개 WO 96/34103호 및 국제특허공개 WO 94/04678 에 기재된 바와 같은 중쇄 항체의 힌지 영역으로부터 유래된 링커이다. 다른 예는 폴리-알라닌 링커 서열이다. 링커 서열의 추가의 바람직한 예는 (Gly4Ser)4, (Gly4Ser)3, (Gly4Ser)2, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser 및 (Gly3Ser2)3, 특히 (Gly4Ser)3을 포함하는 상이한 길이의 Gly/Ser 링커이다. 바람직하게는, 링커는 (Gly4Ser)4, (Gly4Ser)3, 및 (Gly3Ser2)3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게는 링커는 (GGGGS)3이다.

[0235] 일 실시형태에서, 이작용성 분자에 포함된 링커는 (Gly4Ser)4, (Gly4Ser)3, (Gly4Ser)2, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser 및 (Gly3Ser2)3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게는 (Gly4Ser)3이다. 바람직하게는, 링커는 (Gly4Ser)4, (Gly4Ser)3, 및 (Gly3Ser2)3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0236] 특정 실시형태에서, 이작용성 분자에 포함된 링커는 서열번호 67, 68, 69 또는 70에 제시된 서열을 갖는 링커로 이루어진 그룹에서 선택된다.

[0237] **Fc 도메인**

[0238] 이작용성 분자의 Fc 도메인은 항원 결합 모이어티의 부분, 특히 IgG 면역글로불린의 중쇄일 수 있다. 실제로, 항원 결합 도메인이 Fab인 경우, 이작용성 분자는 가변 중쇄(VH), CH1, 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하여, 하나의 중쇄를 포함할 수 있다. 그러나, 이작용성 분자는 또한 scFv, 또는 디아바디와 같은 다른 구조를 가질 수 있다. 예를 들어, 이는 와 같은 항원 유도체에 연결된 Fc 도메인을 포함할 수 있다.

[0239] Fc 도메인은 인간 면역글로불린 중쇄, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 부류로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 이작용성 분자는 IgG1 또는 IgG4 중쇄 불변 도메인을 포함한다.

[0240] 바람직하게는, Fc 도메인은 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 선택적으로, 이는 힌지 영역, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, CH2 및/또는 CH3 도메인은 인간 IgG4 또는 IgG1 중쇄로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, Fc 도메인은 힌지 영역의 전부 또는 일부를 포함한다. 힌지 영역은 면역글로불린 중쇄, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 부류로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 힌지 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4로부터 유래된다. 보다 바람직하게는, 힌지 영역은 인간 또는 인간화 IgG1 또는 IgG4 중쇄로부터 유래된다.

[0241] IgG1 힌지 영역에는 3개의 시스테인이 있으며, 그 중 2개는 면역글로불린의 두 중쇄 사이의 이황화 결합에 관여한다. 이러한 동일한 시스테인은 Fc 부분 사이에 효율적이고 일관된 이황화 결합 형성을 허용한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 힌지 영역은 IgG1, 보다 바람직하게는 인간 IgG1에서 유래된다. 일부 양태에서, 인간 IgG1 힌지 영역 내의 제1 시스테인은 다른 아미노산, 바람직하게는 세린으로 돌연변이된다.

[0242] IgG4의 힌지 영역은 사슬간 이황화 결합을 비효율적으로 형성하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 발명에 적합한 힌지 영역은 바람직하게는 중쇄-유래 모이어티 사이의 이황화 결합의 정확한 형성을 향상시키는 돌연변이를 함유하는 IgG4 힌지 영역으로부터 유래될 수 있다(Angal S, et al. (1993) Mol. Immunol., 30:105-8). 보다 바람직하게는, 힌지 영역은 인간 IgG4 중쇄로부터 유래된다.

[0243] 이작용성 분자는 이량체 Fc 도메인을 포함한다. 따라서, 2개의 단량체는 각각 하나의 Fc 사슬을 포함하며, Fc 사슬은 이량체 Fc 도메인을 형성할 수 있다. 이량체 Fc 도메인은 동종이량체일 수 있으며, 각각의 Fc 단량체는 동일하거나 본질적으로 동일하다. 대안적으로, 이량체 Fc 도메인은 이종이량체일 수 있으며, 각각의 Fc 단량체는 상이하고 이종이량체 Fc 도메인의 형성을 촉진하기 위해 상보적이다.

[0244] 보다 구체적으로, Fc 도메인은 이종이량체 Fc 도메인이다. 이종이량체 Fc 도메인은 각각의 단량체의 아미노산 서열의 변경에 의해 이루어진다. 이종이량체 Fc 도메인은 이종이량체 형성을 촉진하고/하거나 동종이량체에 비해 이종이량체의 용이한 정제를 허용하기 위해 각 사슬에서 상이한 불변 영역의 아미노산 변이체에 의존한다. 본 발명의 이종이량체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 다수의 메카니즘이 있다. 또한, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 메카니즘은 높은 이종이량체화를 보장하기 위해 조합될 수 있다. 따라서, 이종이량체의 생성

을 유도하는 아미노산 변이체는 "이종이량체화 변이체"로 지칭된다. 이종이량체화 변이체는 입체 변이체(예를 들어, 아래에 설명된 "노브 및 홀" 또는 "스큐" 변이체 및 아래에 설명된 "전하 쌍" 변이체) 및 이종이량체로부터 동종이량체의 정제를 허용하는 "pi 변이체"를 포함할 수 있다. 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함되는, 국제특허공개 WO 2014/145806호는 "노브 및 홀", "정전기 스티어링" 또는 "전하 쌍", pi 변이체, 및 일반적인 추가 Fc 변이체를 포함하는 이종이량체화를 위한 유용한 메카니즘을 개시하고 있다. 또한, 문헌[Ridgway et al, Protein Engineering 9(7):617 (1996)]; 문헌[Atwell et al, J Mol Biol 1997 270:26]; 미국 특허 제 8,216,805 호, 문헌[Merchant et al, Nature Biotech 16:677 (1998)]를 참고하며, 이들 모두는 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된다. "정전기 스티어링"에 대해서는 문헌[Gunasekaran et al, J Biol Chem 285(25): 19637 (2010)]을 참고하며, 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된다. pi 변이체에 대해서는, 미국 특허 US 2012/0149876 호를 참고하며, 그 전체 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된다.

[0245] 그 다음, 바람직한 양태에서, 이종이량체 Fc 도메인은 "노브 및 홀" 기술을 기반으로 하는 제1 Fc 사슬 및 상보적 제2 Fc 사슬을 포함한다. 예를 들어, 제1 Fc 사슬은 노브 사슬을 특징짓는 치환을 포함하는 것을 의미하는, "노브(knob)" 또는 K 사슬이며, 제2 Fc 사슬은 홀 사슬을 특징짓는 치환을 포함하는 것을 의미하는, "홀(hole)" 또는 H 사슬이다. 그리고 그 역으로, 제1 Fc 사슬은 홀 사슬을 특징짓는 치환을 포함하는 것을 의미하는, "홀" 또는 H 사슬이고, 제2 Fc 사슬은 노브 사슬을 특징짓는 치환을 포함하는 것을 의미하는, "노브" 또는 K 사슬이다. 바람직한 양태에서, 제1 Fc 사슬은 "홀" 또는 H 사슬이고, 제2 Fc 사슬은 "노브" 또는 K 사슬이다.

[0246] 선택적으로, 이종이량체 Fc 도메인은 하기 표 F에 나타낸 바와 같은 치환을 포함하는 하나의 이종이량체 Fc 사슬 및 하기 표 F에 나타낸 바와 같은 치환을 포함하는 다른 이종이량체 Fc 사슬을 포함할 수 있다.

[0247]

하기 치환을 갖는 Fc 사슬 (홀 사슬 또는 H 사슬)	*하기 치환을 갖는 상보적 Fc 사슬 (노브 사슬 또는 K 사슬)*
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/368E	C220R/E224R/P228R/K409R
S364K/E357Q	L368D/K370S
L368D/K370S	S364K
L368E/K370S	S364K
T411T/E360E/Q362E	D401K
L368D/K370S	S364K/E357L
K370S	S364K/E357Q
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
F368D/K370S	S364K
F368D/K370S	S364K/E357F
F368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
F368E/K370S	S364K
K370S	S364K/E357Q
T366S/F368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

[0248] 표 F (넘버링은 EU 인덱스에 따름)

[0249] 바람직한 양태에서, 제1 Fc 사슬은 "홀" 또는 H 사슬이고, 치환 T366S/L368A/Y407V/Y349C를 포함하고, 제2 Fc 사슬은 "노브" 또는 K 사슬이고, 치환 T366W/S354C를 포함한다.

[0250] 선택적으로, Fc 사슬은 추가 치환을 추가로 포함할 수 있다.

[0251] 특히, 세포-표면 분자, 특히 면역 세포 상의 것들을 표적화하는 이작용성 분자의 경우, 이펙터 기능을 제거하는 것이 요구될 수 있다. 조작된 Fc 영역이 또한 이작용성 분자의 이펙터 기능을 감소시키거나 증가시키기 위해 바람직할 수 있다.

[0252] 특정의 양태에서, 아미노산 변형은 Fc 영역 변이체를 생성하기 위해 Fc 영역 내로 도입될 수 있다. 특정의 양태에서, Fc 영역 변이체는 전부는 아니지만 일부의 이펙터 기능을 보유한다. 이러한 이작용성 분자는, 예를 들어, 생체 내 항체의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능이 불필요하거나 유해한 적용에서 유용할 수 있다. 변경된 이펙터 기능을 갖는 수많은 치환 또는 치환들 또는 결실이 당업계에 공지되어 있다.

[0253] 일 양태에서, Fc 도메인의 불변 영역은 Fc 수용체에 대한 친화도를 감소시키거나 Fc 이펙터 기능을 감소시키는 돌연변이를 함유한다. 예를 들어, 불변 영역은 IgG 중쇄의 불변 영역 내의 글리코실화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 바람직하게는, CH2 도메인은 CH2 도메인 내의 글리코실화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유한다.

[0254] 특정의 양태에서, Fc 도메인은 FcRn에 대한 결합을 증가시키도록 변형되어, 이작용성 분자의 반감기를 증가시킨다. 다른 양태 또는 추가 양태에서, Fc 도메인은 FcγR에 대한 결합을 감소시켜, ADCC 또는 CDC를 감소시키거나 FcγR에 대한 결합을 증가시켜 ADCC 또는 CDC를 증가시키도록 변형된다.

[0255] Fc 부분과 비-Fc 부분의 접합부 근처에 있는 아미노산의 변경은 국제특허공개 WO 01/58957호에 나타난 바와 같이 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 극적으로 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드의 접합 영역은 면역글로불린 중쇄 및 에리트로포이에틴의 자연-발생 서열에 비해 바람직하게는 접합점의 약 10개 아미노산 내에 있는 변경을 함유할 수 있다. 이러한 아미노산 변화는 소수성을 증가시킬 수 있다. 한 실시형태에서, 불변 영역은 C-말단 라이신 잔기가 대체된 IgG 서열로부터 유래된다. 바람직하게는, IgG 서열의 C-말단 라이신은 혈청 반감기를 추가로 증가시키기 위해 알라닌 또는 류신과 같은 비-라이신 아미노산으로 대체된다.

[0256] 일 실시형태에서, Fc 도메인의 불변 영역은 하기 표 G에 기재된 돌연변이 중 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다.

조작된 Fc	이소형	돌연변이	FcR/C1q 결합	이펙터 기능
hIgG1e1-Fc	IgG1	T250Q/M428L	FcRn 에 대한 결합 증가	반감기 증가
hIgG1e2-Fc	IgG1	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	FcRn 에 대한 결합 증가	반감기 증가
hIgG1e3-Fc	IgG1	E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S	FcγRI 에 대한 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소
hIgG1e4-Fc	IgG1	E333A	FcγRIIIa 에 대한 결합 증가	ADCC 및 CDC 증가
hIgG1e5-Fc	IgG1	S239D/A330L/I332E	FcγRIIIa 에 대한 결합 증가	ADCC 증가
hIgG1e6-Fc	IgG1	P257I/Q311	FcRn 에 대한 결합 증가	반감기 불변
hIgG1e7-Fc	IgG1	K326W/E333S	C1q 에 대한 결합 증가	CDC 증가
hIgG1e9-Fc	IgG1	S239D/I332E/G236A	FcγRIIa/FcγRIIb 비율 증가	대식세포 식세포작용 증가
hIgG1e9-Fc	IgG1	N297A	FcγRI 에 대한 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소
hIgG1e9-Fc	IgG1	LALA (L234A/L235A)	FcγRI 에 대한 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소
hIgG1e10-Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E)	FcγRI 에 대한 결합 감소 FcRn 에 대한 결합 증가	ADCC 및 CDC 감소 반감기 증가
hIgG1e11-Fc	IgG1	K322A	C1q 에 대한 결합 감소	CDC 감소
hIgG1e12-Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E) + K444A		ADCC 및 CDC 감소 반감기 증가 항체의 C-말단 라이신의 절단 제거
hIgG4e1-Fc	IgG4	S228P	-	Reduced Fab-arm exchange
hIgG4e1-Fc	IgG4	LALA (L234A/L235A)	FcRn 에 대한 결합 증가	반감기 증가
hIgG4e2-Fc	IgG4	S228P+ YTE (S228P + M252Y/S254T/T256E)	- FcRn 에 대한 결합 증가	Fab-아암 교체 감소 반감기 증가
hIgG4e3-Fc	IgG4	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E) + K444A		ADCC 및 CDC 감소 반감기 증가 항체의 C-말단 라이신의 절단 제거

[0257]

[0258] **표 G: 항체의 적합한 인간 조작된 Fc 도메인.** 중쇄 불변 영역의 잔기 넘버링은 EU 넘버링에 따름 (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969); www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs)

[0259] 특정의 양태에서, 이작용성 분자는 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 또는 IgG1 Fc 도메인을 포함하며, 선택적으로 T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; P329G; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A 및 K444A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 바람직하게는 선택적으로 M252Y/S254T/T256E와 조합된 N297A, 및 선택적으로 P329G가 있는 L234A/L235A로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 치환 또는 치환의 조합이 있다.

[0260] 치환 L234A/L235A/P329G의 조합이 있는 인간 IgG1 중쇄 불변 도메인 또는 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 이작용성 분자는 상기 이작용성 분자에 의해 야기되는 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 크게 감소시키거나 함께 억제하여, 비특

이적인 세포독성을 감소시킨다.

[0261] 또 다른 양태에서, 이작용성 분자는 임의로 S228P; L234A/L235A; L234A/L235A/P329G, P329G, S228P + M252Y/S254T/T256E, K444A K444E, K444D, K444G 및 K444A로 이루어진 그룹으로부터 선택된 치환 또는 치환의 조합과 함께, 인간 IgG4 중쇄 불변 도메인 또는 인간 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 훨씬 더 바람직하게는, 이작용성 분자, 바람직하게는 결합 모이어티는 IgG4를 안정화시키는 S228P를 갖는 IgG4 Fc-영역을 포함한다.

[0262] 본 명세서에서 언급된 바와 같이, "/" 및 "+"은 누적되는 돌연변이를 지칭한다. 따라서, 돌연변이 S228P + M252Y/S254T/T256E는 S228P, M252Y, S254T 및 T256E 돌연변이를 의미한다.

[0263] 치환 P329G이 있는 인간 IgG4 중쇄 불변 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 이작용성 분자는 상기 이작용성 분자에 의해 야기되는 ADCC 및/또는 CDC를 감소시키고, 이에 따라 비특이적인 세포독성을 감소시킨다.

[0264] 인간 IgG의 모든 하위 부류는 순환에서 절단되기 쉬운 항체 중쇄(K444)의 C-말단 라이신 잔기를 가지고 있다. 혈액에서 이러한 절단은 연결된 면역-자극 사이토카인을 이작용성 분자에 방출함으로써 이작용성 분자의 생체활성을 손상시키거나 감소시킬 수 있다. 이러한 문제를 피하기 위해, IgG 도메인의 K444 아미노산은 단백질 분해 절단을 줄이기 위해 알라닌으로 치환될 수 있으며, 이는 항체에 일반적으로 사용되는 돌연변이이다. 그런 다음, 한 양태에서, 이작용성 분자는 K444A, K444E, K444D, K444G 또는 K444S, 바람직하게는 K444A로 이루어진 적어도 하나의 추가 아미노산 치환을 포함한다.

[0265] 선택적으로, 이작용성 분자는 추가의 이황화 결합을 생성하고 이작용성 분자의 유연성을 잠재적으로 제한하기 위해 Fc 도메인의 C-말단 도메인에 추가의 시스테인 잔기를 포함한다.

[0266] 일 양태에서, 이작용성 분자는 서열번호 39 또는 52의 하나의 중쇄 불변 도메인 및/또는 서열번호 40의 하나의 경쇄 불변 도메인, 특히 서열번호 39 또는 52의 하나의 중쇄 불변 도메인 또는 Fc 도메인 및 서열번호 40의 하나의 경쇄 불변 도메인, 특히 예를 들어 하기 표 H에 개시된 것들을 포함한다.

중쇄 불변 도메인 (IgG4m-S228P) 서열번호 39	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
경쇄 불변 도메인 (CLkappa) 서열번호 40	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
중쇄 불변 도메인 (IgG1m-N298A) 서열번호 52	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0267] **표 H.** 본 발명에 따른 이기능성 분자에 적합한 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 예.

[0268] 하나의 특정한 양태에서, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 전술된 바와 같은 "노브 인투 홀(knob into holes)" 변형을 포함하는 Fc 도메인의 이종이량체를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 Fc 도메인은 상기 기재된 바와 같은 IgG1 또는 IgG4 Fc 도메인이고, 더욱 더 바람직하게는 상기 기재된 바와 같은 돌연변이 N297A를 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다.

[0269] 예를 들어, 제1 Fc 사슬은 "홀" 또는 H 사슬이고, 치환 T366S/L368A/Y407V/Y349C 및 선택적으로 N297A를 포함하고, 제2 Fc 사슬은 "노브" 또는 K 사슬이고, 치환 T366W/S354C 및 선택적으로 N297A를 포함한다. 바람직하게는, 제1 Fc 사슬은 "홀" 또는 H 사슬이고 치환 T366S/L368A/Y407V/Y349C 및 N297A를 포함하고, 제2 Fc 사슬은 "노브" 또는 K 사슬이고, 치환 T366W/S354C 및 N297A를 포함한다. 보다 특히, 제2 Fc 사슬은 서열번호 75를 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있고/있거나 제1 Fc 사슬은 서열번호 77을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다.

[0270] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 면역-자극 사이토카인은 이종이량체 Fc 도메인의 노브-사슬 및/또는 홀 사슬에 연결된다. 따라서, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 Fc 도메인의 홀-사슬 또는 노브-사슬에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 이작용성 분자는 Fc 도메인의 홀-사슬에

연결된 단일 면역-자극 사이토카인을 포함한다.

[0271] 제1 양태에서, 이작용성 분자는 Fc 도메인의 노브-사슬의 C-말단에 연결된 면역-자극 사이토카인을 포함하며, 이러한 Fc 도메인의 노브-사슬은 항원 결합 도메인에 연결된다.

[0272] 제2 양태에서, 이작용성 분자는 Fc 도메인의 홀-사슬의 C-말단에 연결된 면역-자극 사이토카인을 포함하며, 이러한 Fc 도메인의 홀-사슬은 이의 N- 말단 단부에서 항원 결합 도메인에 연결된다.

[0273] 선택적으로, 이작용성 분자는 Fc 도메인의 홀-사슬의 C-말단에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인을 포함하며, 상기 이작용성 분자는 Fc 도메인의 홀 사슬의 N-말단 단부에 연결된 단일 항원 결합 도메인만을 포함한다. 이러한 양태에서, 노브 사슬 도메인은 면역-자극 사이토카인 및 항원 결합 도메인이 결여되어 있다.

[0274] 선택적으로, 이작용성 분자는 Fc 도메인의 노브-사슬의 C-말단에 연결된 단일 면역-자극 사이토카인을 포함하며, 상기 이작용성 분자는 Fc 도메인의 노브 사슬의 N-말단 단부에 연결된 단일 항원 결합 도메인만을 포함한다. 이러한 양태에서, 홀 사슬 도메인은 면역-자극 사이토카인 및 항원 결합 도메인이 결여되어 있다.

[0275] 따라서, 본 발명의 목적은 N-말단에서 C-말단까지 항원-결합 도메인(또는 적어도 그의 중쇄에 상응하는 부분), Fc 사슬(노브 또는 홀 Fc 사슬), 바람직하게는 Fc 도메인의 홀-사슬, 및 면역-자극 사이토카인을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 상보적 사슬은 면역-자극 사이토카인 및 항원 결합 도메인이 결여되어 있는 상보적 Fc 사슬, 바람직하게는 Fc 도메인의 노브-사슬을 포함한다.

[0276] 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 PD-1을 표적화 하고 하기를 포함한다:

[0277] (a) 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄, 선택적으로 각각 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36의 위치 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 및 112을 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있음, 그리고 상기 치환은 홀 또는 노브 사슬, 바람직하게는 홀 사슬, 보다 구체적으로 표 F에 개시된 바와 같은 것, 특히, 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에서, T363S/L365A/Y4047V/Y346C 또는 T363W/S351C, 바람직하게는 T363S/L365A/Y4047V/Y346C, 및 선택적으로 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36 중 어느 하나에서의 N294A에 해당함;

[0278] (b) 서열번호 37 또는 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄, 선택적으로 서열번호 37 또는 서열번호 38의 위치 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 및 105를 제외한 임의의 위치에서 치환, 부가, 결실, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 변형이 있음.

[0279] 또 다른 양태에서, 이작용성 분자는 중쇄(CH) 및 경쇄(CL)의 하기들 조합 중 임의의 것을 포함하거나 이로 이루어진다:

CH (서열번호), 선택적으로 하기 서열번호의 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36 의 위치 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 and 112 을 제외한 임의의 위치에서 치환(들), 부가(들), 결실(들)로부터 선택되는 1, 2, 또는 3 개의 변형(들)이 있음:	CL (서열번호), 선택적으로 하기 서열번호의 위치 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 and 105 를 제외한 임의의 위치에 치환(들), 부가(들), 결실(들)로부터 선택되는 1, 2, 또는 3 개의 변형(들)이 있음:
29	37
29	38
30	37
30	38
31	37
31	38
32	37
32	38
33	37
33	38
34	37
34	38
35	37
35	38
36	37
36	38

[0280]

[0281] 상기 중쇄는 홀 또는 노브 사슬, 바람직하게는 홀 사슬, 보다 구체적으로 표 F에 개시된 바와 같은 것, 특히 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36에서, 특히 T366S/L368A/Y407V/Y349C 또는 T366W/S354C, 바람직하게는 T366S/L368A/Y407V/Y349C, 및 선택적으로 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36 중 임의의 하나에서 N297A에 해당하는 치환을 포함하고, 상기 치환 위치는 EU 넘버링에 따라 정의된다.

[0282] 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 PD-1을 표적화하고, 서열번호 37 또는 38을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄를 포함한다.

[0283] 선택적으로, 중쇄는, 예를 들어, 서열번호 49에 기재된 것과 같은 펩티드 신호를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 펩티드 신호는 중쇄의 N-말단에 포함된다.

[0284] 선택적으로, 경쇄는 예를 들어, 서열번호 50에 기재된 바와 같은 펩티드 신호를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 펩티드 신호는 경쇄의 N-말단에 포함된다.

[0285] 따라서, 이작용성 분자는 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 및 36 중 어느 하나를 포함하는 하나의 중쇄를 포함할 수 있고, Fc 사슬은 이종이량체 Fc 도메인을 형성하기 위해 Fc 사슬의 이종이량체화를 촉진하기 위해 선택적으로 변형된다. 보다 구체적으로, 중쇄는 홀 또는 노브 사슬, 바람직하게는 홀 사슬, 보다 구체적으로 표 F에 개시된 바와 같은 것, 특히 T366S/L368A/Y407V/Y349C 또는 T366W/S354C, 바람직하게는 T366S/L368A/Y407V/Y349C, 및 선택적으로 서열번호 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 또는 36 중 어느 하나에서의 N297A에 해당하는 치환을 포함하며, 상기 치환 위치는 EU 넘버링에 따라 정의된다. 중쇄는, 선택적으로 링커를 통해, 이의 C 말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 연결된다.

[0286] 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 서열번호 38을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 및 서열번호 35를 포함하는 하나의 중쇄를 포함하고, Fc 사슬은 선택적으로 Fc 사슬의 이종이량체화를 촉진하도록 변형되어 이종이량체 Fc 도메인을 형성한다. 일 양태에서, 중쇄는 이의 C 말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 선택적으로 링커를 통해 연결된다. 대안적인 양태에서, 경쇄는 이의 C 말단 단부에서 면역-자극 사이토카인에 선택적으로 링커를 통해 연결된다.

[0287] 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체 및 Fc 사슬 서열번호 77을 포함하는 제2 단량체를 포함할 수 있으며, 이는 N-말단 단부에서, 선택적으로 링커에 의해, (예를 들어, 서열번호 79의) 항원 결합 도메인에 연결된다. 보다 바람직하게는, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체 및 Fc 사슬 서열번호

77을 포함하는 제2 단량체를 포함할 수 있으며, 이는 N-말단 단부에서, 선택적으로 링커에 의해, (예를 들어, 서열번호 79의) 항원 결합 도메인에 연결되고, C-말단 단부에서, 선택적으로 링커에 의해, 본 명세서에 개시된 임의의 면역-자극 사이토카인에 연결된다.

[0288] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인은 IL-2(서열번호 87), IL-15(서열번호 88), IL-21(서열번호 89) 또는 야생형 단백질과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 야생형 단백질에 대해 부가, 삭제, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다. 선택적으로, 면역-자극 사이토카인은 IL-7(서열번호 1)일 수 있다.

[0289] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-2인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 84의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있다.

[0290] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-2인 경우, 이작능성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 90의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 87의 IL-2 또는 이의 변이체에, 선택적으로 링커에 의해, 말단이 연결된다.

[0291] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-7인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 93의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있다.

[0292] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-7인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 90의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있으며, 선택적으로 링커에 의해 이의 말단에서 서열번호 1의 IL-7에 연결된다.

[0293] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-15인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 85의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있다.

[0294] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-15인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 90의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있으며, 선택적으로 링커에 의해 이의 말단에서 서열번호 88의 IL-15 또는 이의 변이체에 연결된다.

[0295] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-21인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 86의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있다.

[0296] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인이 IL-21인 경우, 이작용성 분자는 서열번호 75의 제1 단량체, 서열번호 90의 제2 단량체, 및 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있으며, 선택적으로 링커에 의해, 이이 말단에서 IL-21 또는 이의 변이체에 연결된다.

[0297] 또 다른 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 서열번호 77의 제1 단량체 및 Fc 사슬 서열번호 75를 포함하는 제2 단량체를 포함할 수 있으며, 이는 선택적으로 링커에 의해 N-말단에서 (예를 들어, 서열번호 79의) 항원 결합 도메인에, 그리고 선택적으로 링커에 의해 C-말단에서 본 명세서에 개시된 임의의 면역-자극 사이토카인에 연결된다.

[0298] 또 다른 매우 특정한 양태에서, 이작용성 분자는 서열번호 77의 제1 단량체, 선택적으로 링커에 의해 N-말단에서 (예를 들어, 서열번호 79의) 항원 결합 도메인에 연결되는, Fc 사슬 서열번호 75를 포함하는 제2 단량체, 및 선택적으로 링커에 의해 말단에서 본 명세서에 개시된 임의의 면역-자극 사이토카인에 연결되는, 서열번호 37, 38 또는 80, 바람직하게는 서열번호 38 또는 80의 제3 단량체를 포함할 수 있다.

[0299] 선택적으로, 면역-자극 사이토카인은 IL-2(서열번호 87), IL-15(서열번호 88) 및 IL-21(서열번호 89), 또는 야생형 단백질과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 야생형 단백질에 대해 부가, 결실, 치환 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된 1 내지 10개의 변형을 갖는 이의 변이체로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다. 선택적으로, 면역-자극 사이토카인은 IL-7(서열번호 1)일 수 있다.

[0300] **이작용성 분자의 제조 - 본 발명의 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포**

[0301] 본 발명에 따른 이작용성 분자를, 특히 포유류 세포에 의해 생산하기 위해, 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 서열 또는 핵산 서열군이 하나 이상의 발현 벡터에 서브클로닝된다. 이러한 벡터는 일반적으로 포유류 세포를 형

질감염하기 위해 사용된다. 항체 서열을 포함하는 분자를 생산하기 위한 일반적인 기술은, 그 내용이 본 명세서에 인용되어 포함된 문헌[Coligan et al (eds), Current protocols in immunology, at pp 10.19.1-10.19.11(Wiley Interscience 1992)], 및 문헌["Antibody engineering: a practical guide" from W H Freeman and Company (1992)]에 기술되어 있으며, 이에는 분자 생산과 관련된 주석이 각 텍스트 전체에 분산되어 있다.

[0302] 일반적으로, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0303] (1) 본 발명의 재조합 이작용성 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터로 적절한 숙주 세포를 형질감염 또는 형질전환하는 단계;

[0304] (2) 숙주 세포를 적절한 배지에서 배양하는 단계; 및

[0305] (3) 선택적으로 배지 또는 숙주 세포로부터 이작용성 분자를 단리 또는 정제하는 단계.

[0306] 본 발명은 또한 상기 개시된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산, 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터, 본 발명의 벡터로 형질전환되었거나 재조합 이작용성 분자를 코딩하는 서열로 직접적으로 형질전환된 유전적으로 조작된 숙주 세포, 및 재조합 기술에 의해 본 발명의 이작용성 분자를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0307] 핵산, 벡터 및 숙주 세포가 보다 특히 후술되어 있다.

[0308] **핵산 서열**

[0309] 본 발명은 또한 상기 정의된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자 또는 상기 정의된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자 군에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산은 PCR과 같은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 증폭될 수 있다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다.

[0310] 특히, 본 명세서에 정의된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자는 하기를 포함한다:

[0311] - 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 Fc 사슬에 공유적으로 연결된 항원-결합 도메인을 포함하는 제1 단량체를 코딩하는 제1 핵산 분자로서, 상기 제1 Fc 사슬은 선택적으로 펩티드 링커를 통해 면역-자극 사이토카인에 공유적으로 연결된 것, 및

[0312] - 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 코딩하는 제2 핵산 분자,

[0313] - 선택적으로 항원-결합 도메인의 경쇄를 코딩하는 제3 핵산 분자.

[0314] 대안적인 양태에서, 본 명세서에 정의된 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자는 다음을 포함한다:

[0315] - 선택적으로 펩티드 링커를 통해 제1 Fc 사슬에 공유결합으로 연결된 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 단량체를 코딩하는 제1 핵산 분자,

[0316] - 상보적인 제2 Fc 사슬을 포함하는 제2 단량체를 코딩하는 제2 핵산 분자, 및

[0317] - 항원 결합 도메인의 경쇄를 코딩하는 제3 핵산 분자로서, 상기 경쇄는, 선택적으로 펩티드 링커를 통해, 면역-자극 사이토카인에 공유적으로 연결되어 있음.

[0318] 일 실시형태에서, 핵산 분자는 단리된, 특히 비-천연 핵산 분자이다.

[0319] **벡터**

[0320] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 정의된 핵산 분자 또는 핵산 분자 군을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0321] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "벡터(vector)"는 유전 물질을 세포 내로 전달하기 위한 비히클로서 사용되는 핵산 분자이다. "벡터"라는 용어는 플라스미드, 바이러스, 코스미드 및 인공 염색체를 포함한다. 일반적으로, 조작된 벡터는 복제 기점, 다중클로닝 부위 및 선택가능한 마커를 포함한다. 벡터 자체는 일반적으로 삽입(트랜스진)과 벡터의 "백본(backbone)" 역할을 하는 더 큰 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열, 일반적으로 DNA 서열이다. 현대 벡터는 트랜스진 삽입물 및 백본 외에 추가 기능을 포함할 수 있다: 프로모터, 유전적 마커, 항생제 내성, 리포터 유전자, 표적화 서열, 단백질 정제 태그. 발현 벡터(발현 작제물)라고 하는 벡터는 구체적으로 표적 세포에서 트랜스진의 발현을 위한 것으로, 일반적으로 제어 서열을 갖는다.

[0322] 이작용성 분자, 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자는 당업자에 의해 벡터로 클로닝된 다음, 숙주 세포로 형질

전환될 수 있다. 이들 방법에는 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술, 생체 내 재조합 기술 등이 포함된다. 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 본 명세서에 기재된 이작용성 분자 및 전사/번역을 위한 적절한 조절 성분의 핵산 서열을 함유하는 발현 벡터를 작제할 수 있다.

[0323] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 이작용성 분자를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 하나의 바람직한 양태에서, 발현 벡터는 프로모터 및 분비 신호 펩티드를 코딩하는 핵산 서열, 및 선택적으로 스크리닝을 위한 적어도 하나의 약물-내성 유전자를 추가로 포함한다. 발현 벡터는 번역을 개시하기 위한 리보솜-결합 부위, 전사 종결자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0324] 적합한 발현 벡터는 전형적으로 (1) 박테리아 숙주에서 발현 벡터의 성장 및 선택을 제공하기 위해 박테리아 복제 기점 및 항생제 내성 마커를 코딩하는 원핵 DNA 요소; (2) 프로모터와 같은 전사 개시를 제어하는 진핵 DNA 요소; 및 (3) 전사 종결/폴리아데닐화 서열과 같은 전사물의 처리를 제어하는 DNA 요소를 함유한다.

[0325] 발현 벡터는 인산칼슘 형질감염, 리포솜-매개 형질감염, 전기천공법 등을 비롯한 다양한 기술을 사용하여 숙주 세포에 도입될 수 있다. 바람직하게는, 형질감염된 세포가 선택되고 증식되며, 여기서 발현 벡터는 숙주 세포 게놈에 안정적으로 통합되어 안정한 형질전환체를 생성한다.

[0326] **숙주 세포**

[0327] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 이작용성 분자 생산 목적을 위한, 상기 정의된 바와 같은 벡터 또는 핵산 분자 또는 핵산 분자의 군을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0328] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 벡터, 외인성 핵산 분자, 및 본 발명에 따른 이작용성 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 수혜자일 수 있거나, 수혜자인, 임의의 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함하는 것으로 의도된다. "숙주 세포"라는 용어는 또한 단일 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 포함하는 것으로 의도된다. 적합한 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포를 포함하며, 또한 박테리아, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 및 동물 세포, 예컨대 곤충 세포 및 포유동물 세포, 예를 들어 뮤린, 래트, 토끼, 마카크 또는 인간을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0329] 적합한 숙주 세포는 특히 글리코실화와 같은 적절한 번역후 변형을 제공하는 진핵 숙주 세포이다. 바람직하게는, 이러한 적합한 진핵 숙주 세포는 진균류, 예컨대 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)), 사카로마이세스 세레비지애(, Saccharomyces cerevisiae), 스키조사카로마이세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe); 미팀나 세파라테(Mythimna separate)와 같은 곤충 세포; 담배와 같은 식물 세포, 및 BHK 세포, 293 세포, CHO 세포, NSO 세포 및 COS 세포와 같은 포유류 세포일 수 있다.

[0330] 바람직하게는, 본 발명의 숙주 세포는 CHO 세포, COS 세포, NSO 세포 및 HEK 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0331] 그런 다음 숙주 세포는 본 발명에 따른 이작용성 분자를 안정적으로 또는 일시적으로 발현한다. 이러한 발현 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0332] 이작용성 분자의 생산 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 이러한 방법은 상기 제공된 바와 같은 이작용성 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 그의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 단계, 및 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 이작용성 분자를 회수하는 단계를 포함한다. 특히, 이작용성 분자의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 이작용성 분자를 코딩하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입된다. 이작용성 분자는 이후 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 단리 및/또는 정제된다. 이러한 방법에는 통상적인 재생 처리, 단백질 침전제에 의한 처리(예컨대, 염 침전), 원심분리, 삼투에 의한 세포 용해, 초음파 처리, 과원심분리, 분자체 크로마토그래피 또는 겔 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, HPLC, 기타 액체 크로마토그래피 및 이들의 조합이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, Coligan에 의해 기술된 바와 같이, 이작용성 분자 단리 기술은 특히 단백질-A 세파로스를 사용한 친화성 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 단백질 A는 바람직하게는 본 발명의 이작용성 분자를 단리하기 위해 사용된다.

[0333] **약학 조성물 및 이의 투여 방법**

[0334] 본 발명은 또한 바람직하게는 활성 성분 또는 화합물로서 본 명세서에 기재된 이작용성 분자, 핵산 분자, 핵산 분자의 군, 상기 기재된 바와 같은 벡터 및/또는 숙주 세포를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 제형은 멸

균될 수 있고, 원하는 경우 본 발명의 이작용성 분자, 본 발명의 핵산, 벡터 및/또는 숙주 세포와 유해하게 상호작용하지 않아, 임의의 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 보조제, 예컨대 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 염, 항산화제 및/또는 안정화제와 혼합될 수 있다. 선택적으로, 약학 조성물은 추가 치료제를 추가로 포함할 수 있다.

[0335] 특히, 본 발명에 따른 약학 조성물은 국소, 장내, 경구, 비경구, 비강내, 정맥내, 근육내, 피하 또는 안내 투여 등을 포함하는 임의의 통상적인 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다. 투여를 용이하게 하기 위해, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이작용성 분자는 생체 내 투여를 위한 약학 조성물로 제조될 수 있다. 이러한 조성물을 제조하는 수단은 당업계에 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21st edition(2005)] 참조).

[0336] 약학 조성물은 원하는 정도의 순도를 갖는 이작용성 분자를 동결건조된 제형 또는 수용액 형태의 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 항산화제 및/또는 안정화제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 적합한 담체, 부형제, 항산화제, 및/또는 안정화제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A Ed (1980)]에 기재되어 있다.

[0337] 전달을 용이하게 하기 위해, 이작용성 분자 또는 이의 코딩 핵산 중 임의의 것이 샤페론 제제와 접합될 수 있다. 샤페론 제제는 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민, 저밀도 지단백질 또는 글로불린), 탄수화물(예를 들어, 덱스트란, 풀루란, 키틴, 키토산, 이눌린, 사이클로덱스트린 또는 히알루론산), 또는 지질과 같은 자연 발생 물질일 수 있다. 이는 또한 합성 중합체, 예를 들어 합성 폴리펩티드와 같은 재조합 또는 합성 분자일 수 있다.

[0338] 본 발명에 따른 약학 조성물은 실질적으로 투여 즉시 또는 투여 후 임의의 예정된 시간 또는 기간에 활성 성분(예를 들어, 본 발명의 이작용성 분자)을 방출하도록 제형화될 수 있다. 일부 양태에서 약학 조성물은 조성물의 전달이 치료될 부위의 감작화 이전에 그리고 유발하기에 충분한 시간과 함께 일어나도록 시간-방출, 지연 방출 및 지속 방출 전달 시스템을 사용할 수 있다. 당업계에 공지된 수단을 사용하여 조성물이 표적 조직 또는 기관에 도달할 때까지 조성물의 방출 및 흡수를 방지하거나 최소화하거나, 조성물의 적시 방출을 보장할 수 있다. 이러한 시스템은 조성물의 반복 투여를 피할 수 있고, 이에 따라 대상체 및 의사에게 편의성을 증가시킬 수 있다.

[0339] 본 발명의 제형이 인간 혈액과 등장성일 수 있다는 것, 즉 본 발명의 제형이 인간 혈액과 본질적으로 동일한 삼투압을 갖는다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 이러한 등장성 제형은 일반적으로 약 250 mOSm 내지 약 350 mOSm의 삼투압을 갖는다. 등장성은 예를 들어 증기압 또는 빙결형 삼투압계에 의해 측정될 수 있다.

[0340] 약학 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 조건 하에서 멸균되고 안정해야 한다. 미생물의 존재 방지는 멸균 절차(예를 들어, 미세여과) 및/또는 다양한 항균제 및 항진균제의 포함에 의해 보장될 수 있다.

[0341] 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다.

[0342] **대상체, 요법 및 투여**

[0343] 본 발명은, 의약으로 사용하기 위한, 또는 질환의 치료에 사용하기 위한, 또는 대상체에서의 투여를 위한, 또는 의약으로 사용하기 위한 본 명세서에 개시된 바와 같은 이작용성 분자, 이를 코딩하는 핵산 또는 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 이는 또한 치료적 유효량의 약학 조성물 또는 이작용성 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0344] 치료할 대상체는 인간, 특히 태아기의 인간, 신생아, 어린이, 유아, 청소년 또는 성인, 특히 바람직하게는 적어도 30세, 40세의 성인, 바람직하게는 적어도 50세의 성인, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60세의 성인, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70세의 성인일 수 있다.

[0345] 특정의 양태에서, 대상체는 면역억제되거나 면역저하될 수 있다.

[0346] 의학 분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 치료할 질환의 유형 또는 질환의 부위에 따라, 본 명세서에 개시된 이작용성 분자 또는 약학 조성물이 예를 들어, 경구, 비경구, 장내, 흡입 스프레이, 국소, 직장, 비강, 협측, 질 또는 이식된 저장소를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 이작용성 분자 또는 약학 조성물은 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활막내, 종양내, 흉골내, 경막내, 병변

내, 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 통해 투여된다.

[0347] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 이작용성 분자의 약학 조성물의 형태, 투여 경로 및 투여량은 감염의 유형 및 중증도에 따라, 그리고 환자, 특히 연령, 체중, 체격, 성별 및/또는 일반적인 신체 상태에 따라 당업자에 의해 조정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다.

[0348] **질환 치료에 있어서의 용도**

[0349] 본 발명의 이작용성 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포, 조성물 및 방법은 수많은 시험관 내 및 생체 내 유용성 및 용도를 갖는다. 특히, 본 명세서에 제공된 이작용성 분자, 핵산 분자, 핵산 분자의 군, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물은 치료 방법 및/또는 치료 목적으로 사용될 수 있다.

[0350] 본 발명은 또한 대상체의 장애 및/또는 질환의 치료에 사용하기 위한, 및/또는 의약 또는 백신으로 사용하기 위한, 이작용성 분자, 이를 코딩하는 핵산 또는 벡터, 또는 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 이는 또한 대상체의 질환 및/또는 장애를 치료하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이작용성 분자; 이를 코딩하는 핵산 또는 벡터, 이를 포함하는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 치료적 유효량의 약학 조성물 또는 이작용성 분자, 이를 코딩하는 핵산 또는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0351] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에게 상기 정의된 바와 같은 이작용성 분자 또는 약학 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암, 감염성 질환 및 만성 바이러스 감염으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 질환 및/또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 이러한 질환의 예는 이하에서 보다 구체적으로 설명된다.

[0352] 일 양태에서, 치료 방법은 (a) 치료가 필요한 환자를 식별하는 단계; 및 (b) 본 명세서에 기재된 치료적 유효량의 이작용성 분자, 핵산, 벡터 또는 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0353] 치료를 필요로 하는 대상체는 질환에 걸리거나, 질환에 걸릴 위험이 있거나, 질환이 의심되는 인간일 수 있다. 이러한 환자는 일상적인 건강 검진으로 식별할 수 있다.

[0354] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 이작용성 분자는 면역을 향상시키기 위해, 바람직하게는 장애 및/또는 질환을 치료하기 위해, 예를 들어 생체 내에서 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응이 변형되도록 본 발명의 이작용성 분자, 핵산, 벡터 또는 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 변형시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 면역 반응이 강화, 증가, 자극 또는 상향 조절된다. 이작용성 분자 또는 약학 조성물은 치료를 필요로 하는 대상체에서 T 세포 활성화와 같은 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 이작용성 분자 또는 약학 조성물을 사용하여 T 세포 고갈을 감소시키거나 고갈된 T 세포를 재활성화할 수 있다.

[0355] 본 발명은 특히 대상체에게 치료적 유효량의 임의의 이작용성 분자, 핵산, 벡터 또는 본 명세서에 기재된 것을 포함하는 약학 조성물을 투여하여, 대상체에서 면역 반응을 향상시키는 단계를 포함하는, 대상체의 면역반응을 향상시키는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 이작용성 분자 또는 약학 조성물을 사용하여 T 세포 고갈을 감소시키거나 고갈된 T 세포를 재활성화할 수 있다.

[0356] 본 발명에 따른 IL-7 변이체를 포함하는 이작용성 분자는 CD127+ 면역 세포, 특히 CD127+ T 세포를 표적으로 한다. 이러한 세포는 다음과 같은 특별한 관심 영역에서 발견될 수 있다: 림프절의 상주 림프구 세포(주로 피질 주위, 여포에 가끔 세포가 있음), 편도선(여포 간 영역), 비장(주로 백색 펄프의 동맥주위 림프초(PALS) 내에 있고 적색 펄프에 일부 흩어져 있는 세포), 흉선(주로 수질에; 또한 피질에도 있음), 골수(산란 분포), 소화관(위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 직장) 전체의 GALT(장내 림프조직, 주로 간-소낭 부위 및 고유판), 담낭의 MALT(점막-연관-림프-조직(Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue)) 따라서, 본 발명의 이작용성 분자는 이러한 영역에 위치하거나 관련된 질환, 특히 암을 치료하는 데 특히 중요하다.

[0357] 이러한 이작용성 분자 및 이를 포함하는 약학 조성물은 환자, 특히 암이 있는 환자에서, 종양 침윤 림프구(TIL) 증가, 아폽토시스로부터 T 림프구 보호, T 기억 반응 유도/향상, T-reg 억제 및/또는 Treg 억제 활성 제거, 완전히 고갈된 T 세포, 특히 고갈된 종양 침윤 림프구의 증식 회복 및/또는 유지를 위해 사용될 수 있다.

[0358] 이러한 이작용성 분자 및 이를 포함하는 약학 조성물은 환자, 특히 암이 있는 환자에서 종양 침윤 림프구(TIL) 증가, 아폽토시스로부터 T 림프구 보호, T 기억 반응 유도/향상, T-reg 억제 및/또는 Treg 억제 활성 제거, 완

전히 고갈된 T 세포, 특히 고갈된 종양 침윤 림프구의 증식 회복 및/또는 유지를 위한 약제의 제조에서 사용될 수 있다.

[0359] 본 발명은 또한 환자, 특히 암이 있는 환자에서, 종양 침윤 림프구(TIL) 증가, 세포 사멸로부터 T 림프구 보호, T 기억 반응 유도/향상, T-reg 억제 및/또는 Treg 억제 활성 제거, 완전히 고갈된 T 세포, 특히 고갈된 종양 침윤 림프구의 증식 회복 및/또는 유지 방법에 관한 것으로서, 이는 IL-7, 및 PD-1에 결합하여 이를 길항하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이작용성 분자, 특히 본 명세서에 개시된 이러한 임의의 이러한 특정한 분자의 치료 유효량을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0360] **암**

[0361] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 대상체내 종양 세포의 성장을 억제하기 위한 암 치료용 의약의 제조에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 이작용성 분자 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0362] 본 명세서에 사용된 용어 "암"은 비정상적인 세포의 빠르고 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환으로 정의된다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류와 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다.

[0363] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명에 따른 이작용성 분자 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 예를 들어 종양 세포의 성장을 억제하기 위한, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 암 세포의 성장이 억제되도록 이작용성 분자를 사용하는, 대상체의 치료에 관한 것이다.

[0364] 본 개시의 이러한 양태에서, 치료될 암은 고갈된 T 세포와 연관된다.

[0365] 본 명세서에 제공된 임의의 적합한 암은 조혈암 또는 고형암일 수 있다. 이러한 암에는 암종, 자궁경부암, 결장직장암, 식도암, 위장암, 위장관암, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 림프종, 신경교종, 중피종, 흑색종, 위암, 요도암 환경 유발 암 및 상기 암의 임의의 조합이 포함된다. 추가로, 본 발명은 난치성 또는 재발성 악성종양을 포함한다. 바람직하게는, 치료 또는 예방될 암은 전이성 또는 비전이성, 흑색종, 악성 중피종, 비-소세포 폐암, 신장 세포 암종, 호지킨 림프종, 두경부암, 요로상피암종, 결장직장암, 간세포 암종, 소세포 폐암 전이성 메르켈 세포 암종, 위장암 또는 위식도암 및 자궁경부암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0366] 특정의 양태에서, 암은 혈액 악성종양 또는 고형 종양이다. 이러한 암은 혈림프성 신생물, 혈관면역모세포성 T 세포 림프종, 골수이형성 증후군, 급성 골수성 백혈병으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0367] 특정의 양태에서, 암은 바이러스에 의해 유도되거나 면역결핍과 관련된 암이다. 이러한 암은 카포시 육종(예를 들어, 카포시 육종 헤르페스 바이러스와 관련됨); 자궁경부암, 항문암, 음경암 및 외음부 편평세포암 및 구강인두암(예를 들어, 인유두종 바이러스와 관련됨); 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 형질모세포 림프종, 원발성 중추신경계 림프종, HHV-8 원발성 삼출 림프종, 고전적 호지킨(Hodgkin) 림프종 및 림프증식성 장애를 포함한 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)(예를 들어, 엡스타인-바 바이러스(EBV) 및/또는 카포시 육종 헤르페스 바이러스와 관련됨); 간세포 암종(예를 들어, B형 및/또는 C형 간염 바이러스와 관련됨); 메르켈 세포 암종(예를 들어, 메르켈 세포 폴리오마 바이러스(MPV)와 관련됨); 및 인간 면역결핍 바이러스 감염(HIV) 감염과 관련된 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0368] 치료를 위한 바람직한 암은 면역요법에 전형적으로 반응성인 암을 포함한다. 대안적으로, 치료를 위한 바람직한 암은 면역요법에 비반응성인 암이다.

[0369] **감염성 질환**

[0370] 본 발명의 이작용성 분자, 핵산, 핵산 군, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물은 특정 독소 또는 병원체에 노출된 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 본 발명에 따른 이작용성 분자, 또는 이를 포함하는 약학 조성물을, 바람직하게는 대상체가 감염성 질환에 대해 치료되도록 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0371] 임의의 적합한 감염은 본 명세서에 제공된 바와 같은 이작용성 분자, 핵산, 핵산 군, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물로 치료될 수 있다.

[0372] 본 발명의 방법으로 치료할 수 있는 감염을 유발하는 병원성 바이러스의 일부 예는 HIV, 간염(A, B, 또는 C), 헤르페스 바이러스(예를 들어, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코로나바이러스, 호흡기

융합 바이러스, 멈프스 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기열 바이러스, 유두종바이러스, 몰루스컴 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스를 포함한다.

[0373] 본 발명의 방법으로 치료할 수 있는 감염을 유발하는 병원성 박테리아의 일부 예에는 클라미디아, 리케차 박테리아, 마이코박테리아, 스타필로코커스, 스트렙토코커스, 폐렴구균, 수막구균 및 구균, 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실러스, 콜레라, 테타누스, 보툴리누스 중독, 탄저병, 전염병, 렙토스피라증 및 라임스병 박테리아가 포함된다.

[0374] 본 발명의 방법으로 치료할 수 있는 감염을 유발하는 병원성 진균의 일부 예는 칸디다(알비칸스, 크루세이, 글라브라타, 트로피컬리스 등), 크립토코커스 네오포르만스, 아스페르길루스(후미가투스, 니제르 등), 무코랄레스 속(무코르, 압시디아, 리조푸스), 스포로트릭스 쉔키아이(Sporothrix schenkii), 블라스토마이세스 더마티티디스(Blastomyces dermatitidis), 파라코키디오이데스 브라실리엔시스(Paracoccidioides brasiliensis), 코키디오이데스 이미티스(Coccidioides immitis) 및 히스토플라스마 캅슐라툼(Histoplasma capsulatum)을 포함한다.

[0375] 본 발명의 방법으로 치료할 수 있는 감염을 유발하는 병원성 기생충의 일부 예에는 엔타메바 히스톨리티카(Entamoeba histolytica), 발란티디움 콜라이(Balantidium coli), 네글레리아파울러리(Naegleriafowleri), 아칸타메바 종(Acanthamoeba sp.), 지아르디아 람비아(Giardia lambia), 크립토스포리디움 종(Cryptosporidium sp.), 뉴모시스티스 카리니(Pneumocystis carinii), 플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax), 바베시아 마이크로티(Babesia microti), 트리파노소마 브루시(Trypanosoma brucei), 트리파노소마 크루시(Trypanosoma cruzi), 레이쉬마니아 도노바니(Leishmania donovani), 톡소플라스마 곤디(Toxoplasma gondi), 및 니포스트롱길루스 브라실리엔시스(Nippostrongylus brasiliensis)가 포함된다.

[0376] **병용 요법**

[0377] 본 발명에 따른 이작용성 분자는 임상 개발 중이거나 이미 시판 중인 제제를 사용하여 면역 회피 기전을 극복하기 위한 일부 다른 잠재적인 전략과 병용될 수 있다(문헌[Antonia et al Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience 및 Future prospects Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 20, 6258-6268, 2014]의 표 1 참조) 본 발명에 따른 이작용성 분자와의 이러한 병용은 특히 다음과 같은 경우에 유용할 수 있다:

[0378] 1- 적응 면역 억제 역전(T-세포 체크포인트 경로 차단);

[0379] 2- 적응 면역 가동(작용제 분자, 특히 항체를 사용하여 T-세포 공동자극 수용체 신호전달 촉진),

[0380] 3- 선천성 면역 세포의 기능 개선;

[0381] 4- 예를 들어, 백신-기반 전략을 통한 면역 체계 활성화(면역-세포 이펙터 기능 강화)

[0382] 따라서, 질환 또는 장애의 치료를 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 이작용성 분자 또는 이를 포함하는 약학 조성물과 적합한 제2 작용제와의 병용 요법이 또한 본 명세서에 제공된다. 이러한 양태에서, 이작용성 분자 및 제2 작용제는 상기 기재된 바와 같은 고유한 약학 조성물에 존재할 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 사용된 용어 "병용 요법" 또는 "병용된 요법"은 이들 2가지 작용제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이작용성 분자 및 추가 또는 제2의 적합한 치료제)를 순차적 방식으로 투여하는 것을 포괄하며, 즉, 여기서 각각의 치료제는 상이한 시간에 투여될 뿐만 아니라 이들 치료제 또는 적어도 2개의 작용제를 실질적으로 동시적인 방식으로 투여한다. 각 작용제의 순차적 또는 실질적 동시 투여는 적절한 경로에 의해 영향을 받을 수 있다. 작용제는 동일한 경로 또는 다른 경로로 투여될 수 있다. 예를 들어, 제1 작용제(예를 들어, 이작용성 분자)는 경구로 투여될 수 있고, 추가 치료제(예를 들어, 항암제, 항감염제, 또는 면역 조절제)는 정맥내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 선택된 병용의 작용제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면, 병용의 다른 작용제는 경구 투여될 수 있다.

[0383] 일 양태에서, 추가의 치료제는 알킬화제, 혈관신생 억제제, 항체, 항대사물질, 항유사분열제, 항증식제, 항바이러스제, 오로라 키나제 억제제, 세포자멸 촉진제(예를 들어, Bcl-2 계열 억제제), 사멸 수용체 경로 활성화제, Bcr-Abl 키나제 억제제, BiTE(Bi-특이적 T 세포 연결체) 항체, 항체 약물 접합체, 생물학적 반응 조절제, 브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제, 사이클린-의존성 키나제 억제제, 세포 주기 억제제, 사이클로옥시게나제-2 억제제, DVD, 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체(ErbB2) 수용체 억제제, 성장 인자 억제제, 열 충격 단백질(HSP)-90 억제제, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 호르몬 요법, 면역제, 세포자멸사 단백질 억제제(IAP) 억제제,

삽입 항생제, 키나제 억제제, 키네신 억제제, Jak2 억제제, 라파마이신 억제제의 포유동물 표적, 마이크로RNA, 미토겐-활성화 세포외 신호-조절 키나제 억제제, 다가 결합 단백질, 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 폴리ADP(아데노신 이인산)-리보스 폴리머라제(PARP) 억제제, 백금 화학요법, 폴로-유사 키나제(Plk) 억제제, 포스포이노시티드-3 키나제(PI3K) 억제제, 프로테아좀 억제제, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 수용체 티로신 키나제 억제제, 레티노이드/델토이드 식물 알칼로이드, 작은 억제 리보핵산(siRNA), 토포이소머라제 억제제, 유비퀴틴 리가제 억제제, 저메틸화제, 체크포인트 억제제, 펩티드 백신 등, 종양 항원으로부터의 에피토프 또는 네오에피토프, 뿐만 아니라 이들 작용제 중 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 목록에서 선택될 수 있다.

[0384] 예를 들어, 추가 치료제는 화학요법, 방사선 요법, 표적화요법, 항혈관형성제, 저메틸화제, 암 백신, 종양 항원의 에피토프 또는 네오에피토프, 골수 체크포인트 억제제, 기타 면역요법제, 및 HDAC 억제제로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다.

[0385] 일 실시형태에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 병용 요법에 관한 것으로서, 여기서 제2 치료제는 특히 치료 백신, 면역 체크포인트 차단제 또는 활성화제로 이루어진 그룹, 특히 적응 면역 세포(T 및 B 림프구) 및 항체-약물 접합체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, 임의의 항-hPD-1 항체 또는 이의 단편 또는 본 발명에 따른 약학 조성물과 함께 공동 사용하기에 적합한 작용제는 공동-자극 수용체(예를 들어, OX40, CD40, ICOS, CD27, HVEM 또는 GITR)에 결합하는 항체, 면역 세포 사멸을 유도하는 작용제(예를 들어, 화학치료제, 방사선치료제, 항신생혈관제, 또는 표적화된 요법의 작용제), 체크포인트 분자(예를 들어, CTLA4, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, BTLA, 또는 TIGIT)를 억제하는 작용제, 암 백신, 면역억제 효소(예를 들어, IDO1 또는 iNOS)를 변형하는 작용제, Treg 세포를 표적화하는 작용제, 적응 세포 요법용 작용제, 또는 골수 세포를 조절하는 작용제를 포함한다.

[0386] 일 실시형태에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 병용 요법에 관한 것으로서, 여기서 제2 치료제는 항-CTLA4, 항-CD2, 항-CD28, 항-CD40, 항-HVEM, 항-BTLA, 항-CD160, 항-TIGIT, 항-TIM-1/3, 항-LAG-3, 항-2B4, 및 항-OX40, 항-CD40 작용제, CD40-L, TLR 작용제, 항-ICOS, ICOS-L 및 B-세포 수용체 작용제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 면역 체크포인트 차단제 또는 적응 면역 세포(T 및 B 림프구)의 활성화제이다.

[0387] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 명세서에 기술된 이작용성 분자 또는 약학 조성물 및 치료 유효량의 추가의 또는 제2 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0388] 추가 또는 제2 치료제의 구체적인 예가 국제특허공개 WO 2018/053106호의 36 내지 43페이지에 제공되어 있다.

[0389] 바람직한 실시형태에서, 제2 치료제는 화학요법제, 방사선 요법제, 면역요법제, 세포요법제(예를 들어 CAR-T 세포), 항생제 및 프로바이오틱스로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0390] 병용 요법은 또한 이작용성 분자의 투여와 수술의 병용에 의존할 수 있다.

[0391] **실시예**

[0392] **실시예 1: 1개의 IL-7 W142H 사이토카인과 1개의 항 PD-1 아암(arm)이 있는 항 PD-1 IL-7 분자는 PD-1+ IL-7R+ 세포로 시스(cis) 활성을 촉진하는 높은 효능을 입증했다**

[0393] 본 발명자들은 도 1에 기재된 바와 같이 1개 또는 2개의 항 PD-1 결합 도메인 및 1개 또는 2개의 IL7 W142H 돌연변이를 포함하는 이작용성 분자의 다중 구조의 생물학적 활성을 설계하고 비교하였다. W142H 치환은 서열번호 1에 제시된 서열의 위치 142에 있는 아미노산의 치환에 해당한다.

[0394] 작제물 1은 2개의 항 PD-1 항원 결합 도메인 및 2개의 IL-7 W142H 변이체를 포함한다(작제물 1은 또한 항 PD-1*2 IL-7 W142H*2로도 지칭됨) 이러한 분자는 또한 BICKI-IL-7 W142H로도 지칭된다. 이러한 예에서, BICKIIL-7 WT로 지칭되는 대조군 분자는 작제물 1에 해당하지만 야생형 IL-7을 포함한다.

[0395] 작제물 2는 2개의 항 PD-1 항원 결합 도메인 및 단일 IL-7 W142H 변이체를 포함한다([0481] 작제물 2는 항 PD-1*2 IL-7 W142H*1로도 지칭됨)

[0396] 작제물 3은 단일 항 PD-1 항원 결합 도메인 및 단일 IL-7 W142H 변이체를 포함한다(작제물 3은 또한 항 PD-1*1 IL-7 W142H*1로도 지칭됨) 항-PD-1*1로 지칭되는 대조군 작제물은 IL-7 변이체가 없는 것을 제외하고 작제물 3과 유사하다.

[0397] 작제물 4는 단일 항 PD-1 항원 결합 도메인 및 2개의 IL-7 W142H 변이체를 포함한다(작제물 4는 항 PD-1*1 ILW142H*2로도 지칭됨)

[0398] 작제물 2, 3 및 4를 IgG1 N298A 이소형로 조작하고 Fc 부분에서 아미노산 서열을 돌연변이시켜 중쇄 A의 CH2 및 CH3 상에 노브를 생성하고 중쇄 B의 CH2 및 CH3 상에 홀을 생성하였다.

[0399] 모든 항 PD-1 IL7 작제물은 ELISA 분석에 의해 입증되는 바와 같이 PD-1 수용체에 대한 높은 친화도를 갖는다(도 2A 및 표 1) 2개의 항 PD-1 아암(항-PD-1*2)을 가진 항 PD-1 IL-7 분자는 IL-7이 없는 항 PD-1*2에 비해 동일한 결합 효능(동일한 EC50)을 갖는다. 유사하게, 1개의 항 PD-1 아암(항 PD-1*1 IL7 W142H*1 및 항 PD-1*1 IL7 W142H*2)을 가진 항 PD-1 IL-7 분자는 IL-7이 없는 항 PD-1*1에 비해 동일한 결합 효능을 입증하였으며, 항 PD-1 IL7의 경우 0.086 및 0.111 nM과 동일한 EC50 대 항 PD-1의 경우 0.238 nM을 가졌다. 이러한 데이터는 IL-7의 융합이 시험된 작제물과 관계 없이 PD-1 결합을 방해하지 않음을 보여준다.

표 1

[0400] 도 2A의 ED50 측정은 각 항 PD-1 IL-7 분자에 대해 ELISA로 측정한 PD1 결합 신호의 50%에 도달하는 데 필요한 농도를 나타낸다.

샘플	EC50 (nM)
항 PD-1*2	0.021
항-PD-1*2 IL7 W142H*1	0.026
항-PD-1*2 IL7 W142H*2	0.034
항-PD-1*1	0.238
항-PD-1*1 IL7 W142H*1	0.111
항-PD-1*1 IL7 W142H*2	0.086

[0401] 더욱이, PD-L1/PD-1 길항제 생물검정(도 2B)은 1개 또는 2개의 항 PD-1 아암을 갖는 항 PD-1 IL7 분자가 PD-1 수용체에 대한 PD-L1의 결합을 차단하는 고효율을 나타낸다는 것을 입증한다. 작제물 3 및 4에서 항 PD-1의 한 아암이 제거되었지만, 모든 항 PD-1*1 IL7 작제물은 높은 길항제 특성을 나타낸다. 항 PD-1*2 IL7 작제물과 비교하여 단지 2.5배 감소된 활성을 작제물 3 및 4에 대한 EC50(표 2)으로 계산하였다.

표 2

[0402] 도 2B의 ED50 결정은 각 항 PD-1 IL-7 분자에 대해 ELISA로 측정한 PD1/PDL1 길항제 활성의 50%에 도달하는 데 필요한 농도를 나타낸다.

샘플	EC50 (nM)
항 PD-1*2 IL7 W142H*1	2.168
항 PD-1*2 IL7 W142H*2	2.792
항 PD-1*1	5.014
항 PD-1*1 IL7 W142H *1	5.839
항 PD-1*1 IL7 W142H *2	7.235

[0403] 다음으로 본 발명자들은 Biacore 분석 및 ELSA 분석을 사용하여 CD127 수용체에 대한 상이한 작제물의 친화도를 평가하였다. 하나의 IL-7 분자가 작제물 2 및 3에서 제거되었기 때문에, CD127 수용체에 대한 더 낮은 결합 능력 및 더 낮은 pSTAT5 활성화가 IL-7 이종이량체 작제물와 비교하여 이들 분자에 대해 예상되었다. 그러나, 본 발명자들은 항 PD-1*2 IL-7 W142H*1 분자가 항 PD-1*2 IL-7 W142H*2(BICKI-IL-7 W142H)에 비해 CD127 수용체에 유사한 친화도를 갖고 예상한 바와 같이 IL-7 야생형 형태를 포함하는 항 PD-1 IL7 이작용성 분자와 비교하여 더 낮은 친화도를 가짐을 관찰하였다(표 3) 놀랍게도, 항 PD-1*2 IL7 W142H *1 및 항 PD-1*1 IL7 W142H *1 분자는 IL-7 야생형 형태를 포함하는 PD-1 IL7 이작용성 분자와 유사한 높은 pSTAT5 활성을 나타냈다(도 3). 이러한 관찰에 기초하여, W142H IL-7 돌연변이와 결합된 IL-7의 단량체 형태는 IL-7 분자의 최적 형태가 인간 T 세포로의 IL-7 신호전달을 촉진하도록 허용하는 것으로 보인다. IL7이 하나만 있더라도, W142H IL-7 돌연변이가 있는 분자는 2개의 사이토카인이 있는 IL7 wt가 있는 분자만큼 우수한 활성화 효과(pSTAT5)를 나타낸다. 이 결과는 야생형 IL-7보다 수용체에 대한 친화도가 더 낮은 IL-7 변이체와 관련하여 놀라운 것이다.

표 3

[0404] 1개 또는 2개의 IL7로 구성된 항 PD1 IL7 야생형 또는 항 PD1 IL7 W142H 돌연변이체의 결합.

	KD CD127 (M)
항 PD-1*2 IL7 야생형*2	8.7 E-10
항 PD-1*2 IL7 W142H*2	3.73 E-8
항 PD-1*2 IL7 W142H*1	4.52 E-8

[0405] CD127을 센서 칩에 고정화하고 항 PD-1 IL-7 이작용성 분자를 점증하는 투여량으로 첨가하여 친화도를 측정하였다.

[0406] 마지막으로, 상이한 항 PD-1 IL-7 작제물의 특이적 시스-표적화 및 시스-활성을 공동-배양 검정에서 분석하였다. U937 PD-1+ CD127+ 세포를 PD-1-CD127+ 세포와 혼합(비율 1:1)한 다음, 증량하는 용량에서 상이한 작제물과 함께 인큐베이션하였다. 결합 및 IL-7R 신호전달(pSTAT5)을 유동 세포측정법으로 정량화했다. 결합 및 pSTAT5 활성화의 EC50(nM)을 각각의 작제물 및 각각의 PD-1 + 및 PD-1- 세포 집단에 대해 결정하였다(도 4a 및 b) 본 발명자들은 다양한 항 PD-1 IL-7 돌연변이된 분자(항 PD-1*2 IL7 W142H*1, 항 PD-1*1 IL7 W142H*1 항 PD-1*1 IL7 W142H*2)가, PD-1+ 세포 내로 IL7R 신호전달 pSTAT5의 큰 활성화로 실질적으로 바람직하게는 PD-1+ 세포 내로 IL-7R에 결합함을 검증하였다. 중요한 것은, 작제물 PD-1*1 IL7 W142H*1이 다른 작제물(항 PD-1*2 IL7 W142H*1, 및 항 PD-1*1 IL7 W142H*2)과 비교하여 PD-1+ 세포 내로 pSTAT5 신호전달을 촉진하는 가장 높은 활성을 입증하였다. 이러한 데이터는 하나의 항 PD-1 아암과 하나의 IL-7로 작제된 이작용성 분자가 암과 관련하여 PD-1+ 활성화된 T 세포로 IL-7R의 우선적 활성화를 허용하는 최적의 형태와 활성을 가짐을 시사한다.

[0407] **실시예 2: 1개 또는 2개의 항 PD-1 아암 및 1개 또는 2개의 IL7 W142H 사이토카인으로 작제된 항 PD-1 IL-7 분자는 생체 내에서 우수한 약동학적 프로파일을 갖는다**

[0408] 도 1에 기술된 바와 같은 항 PD-1 IL-7 이작용성 분자 작제물 2, 3 및 4의 약동학 연구를 평가하였다. 인간화 PD1 KI 마우스에 1회 용량의 항 PD-1 IL-7 분자(344 nM/kg)를 복강내 주사하였다. 혈장 약물 농도는 인간 IgG에 특이적인 ELISA로 분석하였다(도 5). 곡선 아래 면적도 계산하였으며(표 4 참조) 각 작제물에 대한 시간 경과에 따른 총 약물 노출을 나타낸다. 항 PD-1*2IL-7 W142H*1, 항 PD-1* 1 IL-7 W142H*1 및 항 PD-1*1 IL-7 W142H*2 작제물은 항 PD-1*2 IL7WT*1에 비해 매우 유리하게 향상된 PK 프로파일을 입증하였다. Cmax는 항 PD-1*1 IL7WT*2에 비해 2,8 내지 19배 더 높은 것으로 관찰되었다. 중요한 것은, 생체 내 만족스러운 PK 값에 해당하는 높은 약물 농도(11 내지 15 nM)가 항 PD-1*1 IL7 W142H*1 항 PD-1*1 IL7 W142H*2 분자를 사용하여 적어도 96시간 동안 유지되는 반면, 항 PD-1*2 IL7WT*2 분자로는 단지 2 nM이 혈장에서 검출되었다는 것이다. 항 PD-1*2 IL-7 W142H*1의 잔류 약물 농도는 항 PD-1*2 IL7WT*2 농도보다 2,5배 더 높다. 혈장 약물 노출은 종종 생체 내 효능과 관련이 있다. 여기서, 본 발명자들은 항 PD-1의 한 아암으로 작제된 모든 항 PD-1 IL-7 W142H 분자가 단일 주사 후 장기간 약물 노출을 허용함을 입증한다. 항 PD-1*2IL-7 W142H*1, 항 PD-1*1 IL-7 W142H*1 및 항 PD-1*1 IL-7 W142H*2가 생체 내에서 유사한 유리한 PK 프로파일을 나타내었지만, 도 4B는 작제물 항 PD-1*1 IL-7 W142H*1이 PD-1+ 세포를 활성화하는 더 높은 능력을 가지고 있음을 입증한다.

표 4

[0409] 도 7로부터 결정된 곡선 아래 면적. AUC는 1회 용량의 항 PD-1 IL-7(34nM/kg)을 복강내 주사한 후 0시간부터 96시간까지 계산되었다.

	AUC	Cmax (nM)
항 PD1*1 IL7W142H*1	1597	42.4
항 PD-1*1 IL7W142H*2	2024	248.6

[0410] **실시예 3: 실시예 4 내지 9에 사용된 작제물에 대한 설명**

[0411] 이작용성 항체의 다양한 작제물을 테스트하고 비교했다. 도 6은 다양한 포맷을 보여준다: (1) 포맷 A(항 PD-1*2/prot X*2), (2) 포맷 B(항 PD-1*2/Prot X*1) (3) 포맷 C (중쇄에 융합된 항 PD-1*1/protX*1).

[0412] 포맷 C의 경우, Fc 도메인은 CH1 CH2 및 힌지 부분을 포함한다. 모든 작제물은 IgG1 N298A 이소형으로 조작되었으며 Fc 부분에서 아미노산 서열이 돌연변이되어 중쇄 A의 CH2 및 CH3에 노브와 중쇄 B의 CH2 및 CH3에 홀이 생

성되었다. 모든 작제물은 융합된 Fc 도메인과 X 단백질 사이에 GGGGSGGGGSGGGGS 링커(서열번호 70)를 포함한다.

[0413] **실시예 4. 1개의 항 PD-1 원자가 및 1개의 융합된 단백질 X로 작제된 이작용성 항체는 2개의 항 PD-1 원자가 및 1개의 융합 사용된 단백질 X로 작제된 이작용성 항체와 비교하여 포유류 세포에 의해 더 높은 생산성을 입증하였다.**

[0414] 포유류 세포에 의한 이작용성 항체의 포맷 B 및 포맷 C의 생산성을 평가하고 비교하였다. 사이토카인(IL,7, IL-2, IL-15 또는 IL-21)에 융합된 Fc가 있는 전체 중쇄를 경쇄와 함께 CHO 현탁 세포에 일시적으로 동시 형질감염시켰다. 생산 및 정제 후 얻은 항체의 양은 샌드위치 ELISA(마우스 항 인간 카파 + 퍼옥시다아제 접합 염소 항 마우스 항체로 탐지 및 계시를 위한 고정화된 당나귀 항 인간 Fc 항체)를 사용하여 정량화하였다. 농도를 인간 IvIgG 표준으로 결정하였다. 생산성은 수집된 배양 상등액 1리터 당 정제된 항체의 양으로 계산하였다.

[0415] **결과**: 이작용성 항체, 항 PD-1*2/protX*1(포맷 B) 및 항체 PD-1*1 ProtX *1(포맷 C)을 CHO 포유류에서 생성하였고 그 결과를 도 7에 나타내었다. 놀라운 방식으로, 항 PD-1*1/protX *1 작제물(포맷 C)은 항 PD-1*2/protX*1(포맷 B)보다 생산 수율(mg/L)이 훨씬 더 우수하다(도 7a). 테스트한 모든 융합 단백질 X, 즉 사이토카인(IL7, IL2, IL21, 및 IL-15)에 대해 유의한 1.7배(+/-0.7; n=5) 더 높은 생산성이 얻어졌다(도 7b). 이러한 결과는 항 PD-1*1/protX*1(포맷 C)이 임상 개발 및 치료 적용의 다음 단계에 매우 중요한 매우 우수한 제조 가능성을 나타냄을 나타낸다.

[0416] 특히 두 개의 서로 다른 아암을 포함하는 이작용성 항체의 경우, 가장 큰 문제 중 하나는 사슬의 미스페어링과 사슬 A(노브 체인)와 사슬 B(홀 체인)의 잘못된 결합이다. 실제로, 바람직하지 않은 동종이량체 형성(사슬 A + 사슬 A 또는 사슬 B + 사슬 B)이 일반적으로 발생한다. 이것은 일반적으로 동종이량체 이작용성 항체(포맷 A)의 생산과 비교하여 이종이량체성 이작용성 항체(포맷 B 및 C)의 낮은 수율 및 순도를 초래할 것이며, 이는 상당한 단점이다. 핵심 과제는 고품질의 균일한 이기능 항체를 생산하고 제한적이거나 무시할 수 있는 부산물과 불순물을 생산하는 방법이 남아있다.

[0417] 그러나, 본 발명자들은, 포맷 C의 최적화된 전략 설계를 사용함으로써 동종이량체 포맷 B에 비해 놀랍게도 이작용성 항체의 더 높은 생산이 유도됨을 입증하였다(도 9a). 또한, 항 PD-1*1 ProtX*1의 생산성 수율은 항 PD-1 단독(항 PD-1*1 또는 항 PD-1*2)과 유사한 범위이며, 이의 생산성은 유사한 생산 조건에서 45 mg/L(n=5)이다.

[0418] 이종이량체 항체 생산의 다른 주요 문제는 순도이다. 노브-인투-홀(Knob-into hole) 전략은 이종이량체 생산(사슬 A+ 사슬 B)을 선호하고 동종이량체 사슬 A 또는 동종이량체 사슬 B 생산을 감소시키지만, 이 전략은 100% 효과적이지 않으며 이종이량체 작제물을 분리하기 위해 추가 정제가 필요하다(문헌[Wang et al, 2019, Antibodies, 8, 43].

[0419] 그러나, 본 발명자들은 항 PD-1*1/Prot X*1 포맷 C의 생산 후에 이종이량체의 높은 수율이 얻어진다는 것을 관찰하였다. 도 8은 단백질 A 정제 후 항 PD-1*1/IL-7wt*1(도 8A) 및 항 PD-1*1/IL-7v*1(도 8B)의 크기 배제 크로마토그래피를 보여준다. 하나의 주요 피크는 이종이량체 형태 사슬 A와 사슬 B에 해당하는 반면, 동종이량체 형태 Fc/Fc(사슬 A+ 사슬 A)는 검출되지 않았고 동종이량체 형태(사슬 A+ 사슬 A)는 매우 미미했다(2% 미만) 이들 데이터는 본 발명의 항 PD-1*1/protX*1이 생산성에 최적화되어 있고 미스페어링을 방지함을 시사한다. 선행 기술과 비교하여, 동일한 KIH-s 전략을 사용하여 다른 이중특이적 항체 백본으로 약 70 내지 75%의 이종이량체 수율이 얻어진다.

[0420] 이러한 순도를 얻기 위해 본 발명자들은 분자의 설계를 최적화하였다. 사실, 사슬 A가 Fc 도메인이고 사슬 B가 항 PD-1*1 IL-7*1인 경우에만 이러한 고순도가 얻어진다는 것을 관찰했다. 홀 돌연변이를 함유하는 VL + 단독 사슬 B(항 PD-1*1/IL-7v*1)를 CHO 포유류 세포로 동시 형질감염하는 것은 사슬 B의 동종이량체의 생성을 유도하지 않는다(0 mg/L). 반대로, PD-1*1/IL-7v*1이 노브 돌연변이를 포함하는 사슬 A인 경우, VL + 단독 사슬 A(항 PD-1*1/IL-7v*1)의 동시 형질감염 후 동종이량체 사슬 A의 높은 생산이 관찰되었다(88 mg/L). 이들 데이터에 따르면, 본 발명자들은 사슬 A의 동종이량체의 생성을 피하기 위해 사슬 A로서 Fc 및 사슬 B로서 항 PD-1*1/protX*1을 갖는 분자를 설계하기로 선택하였다.

[0421] 종합하면, 이들 데이터는 사슬 A(노브 돌연변이가 있는 Fc 도메인) 및 사슬 B(홀 돌연변이가 있는 항 PD-1*1/IL-7*)가 있는 본 발명의 항 PD-1*1/ProtX*1에 따른 포맷 C가 생성물의 높은 생산성과 순도를 위한 최고의 작제물임을 보여준다. 이는 대규모 생산성을 위한 치료제로서의 개발을 용이하게 한다.

[0422] **실시예 5: 항-PD1 이작용성 항체의 활성 및 PD-1/PD-L1 상호작용을 길항하는 이들의 능력을 측정하기 위한 경쟁**

적 분석.

[0423] 인간 PD-1 수용체에 결합하고 PD-L1/PD-1 상호작용을 길항하는 이작용성 항체의 결합을 ELISA 검정으로 측정하였다. 재조합 hPD1(Sino Biologicals, Beijing, China, 참조 번호 10377-H08H)을 탄산염 완충액(pH9.2)에 0.5 μg/ml로 플라스틱에 고정화하고 정제된 항체를 첨가하여 결합을 측정하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 퍼옥시다제-표지된 당나귀 항-인간 IgG(Jackson Immunoresearch, USA; 참조번호 709-035-149)를 첨가하고 통상적인 방법으로 규명하였다. 이작용성 항체의 길항제 활성을 측정하기 위해, PD-1:PD-L1 억제제 스크리닝 ELISA 분석 쌍(AcroBiosystems; USA; 참조 EP-101)에 의해 경쟁적 ELISA 분석을 수행하였다. 이 분석에서, 재조합 hPDL1을 PBS pH 7.4 완충액 중 2μg/ml로 플라스틱에 고정시켰다. 정제된 항체(다른 농도)를 0.66μg/ml 최종(고정 농도)의 비오틴화된 인간 PD1(AcroBiosystems, USA, 참조 EP-101)과 혼합하여 37℃에서 2시간 동안 경쟁적 결합을 측정하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 퍼옥시다제 표지된 스트렙타비딘(벡터 실험실, 미국, 참조 SA-5004)을 첨가하여 c 결합을 검출하고 기존 방법으로 규명하였다.

[0424] **결과:** 도 9 및 표 5는 모든 이중기능성 항 PD-1*1/protX*1 분자가 효율적인 PD-1 결합을 입증함을 보여준다. 이러한 데이터는 모든 유형의 융합 단백질을 가진 모든 분자가 심지어 하나의 항 PD-1 원자가를 가지고 있더라도 PD-1 항원에 대한 우수한 결합을 보존한다는 것을 보여준다. 더욱이, 표 6에 나타낸 바와 같이 길항제 활성도 보존되었다.

표 5

[0425] 도 11의 PD-1 결합의 EC50(nM).

PD-1 결합	EC50 (nM)
항 PD-1*1/IL2*1	0.20
항 PD-1*1/IL21*1	0.58
항 PD-1*1/IL15*1	0.51

표 6

[0426] EC50(nM) 경쟁 PD-1/PD-L1 ELISA 분석.

PD-1/PD-L1 길항제	IC50 (nM)
항 PD-1*1/IL2*1	2.5
항 PD-1*1/IL21*1	20.3
항 PD-1*1/IL15*1	7.1

[0427] **실시예 6: 항 PD-1/사이토카인 이작용성 항체는 일차 인간 T 세포로의 pSTAT5 신호전달을 활성화한다.**

[0428] 본 발명자들은 다음으로 항 PD-1 항체에 융합된 단백질의 생물학적 활성을 평가하고 활성화된 1차 T 세포에 대한 모든 항 PD-1/사이토카인 이작용성 분자의 능력을 시험하였다. 이를 위해 인간 말초 혈액 T 세포를 다양한 농도의 항 PD-1*1/IL-7wt*1, 항 PD-1*1/IL-7v*1, 항 PD-1*1/IL-15*1, 항 PD-1*1/IL-21*1 작제물로 37℃에서 15분 동안 처치하였다. 인큐베이션 후, 세포를 고정, 투과화하고 항 pSTAT5 항체로 염색하였다.

[0429] **결과**: 도 10A는 항 PD-1*1/IL-7wt*1, 항 PD-1*1/IL-7v*1, 항 PD-1*1/IL-15*1 및 항 PD-1*1/IL-21*1이 1차 T 세포(CD3+ T 세포) 내로 pSTAT5 신호전달을 효율적으로 유도함을 보여주며, 이는 포맷 C의 항-PD-1 분자의 Fc 도메인에 융합된 사이토카인이 인간 T 세포를 자극하는 이의 능력을 보유함을 시사한다. 본 발명자들은 다음으로 pSTAT5 신호전달을 활성화하는 항 PD-1/IL-7 포맷 A(항 PD-1*2/IL7v*2) 대 항 PD-1*1/IL-7v*1 포맷 C의 효율을 비교하였다. 작제물 항 PD-1*1/IL-7v*1이 오직 하나의 IL-7v 사이토카인을 포함하므로, 포맷 A에 비해 이러한 분자에 대한 더 낮은 pSTAT5 활성화가 예상되었다. 그러나, 도 10b에 도시된 바와 같이, 항 PD-1*2/IL-7v*2 작제물(포맷 A)에 비해 항 PD-1*1/IL-7v*1(포맷 C)로 더 높은 pSTAT5 활성화가 놀랍게도 관찰되었으며, 이는 본 발명의 항 PD-1/IL-7*1 작제물(포맷 C)이 1차 T 세포 내로 IL-7 신호전달의 활성화를 촉진하기 위한 IL-7 분자의 최적의 구성을 허용함을 시사한다.

[0430] **실시예 7: 항 PD-1 이작용성 분자는 PD-1- 세포보다 PD-1+ 세포에 대한 우선적인 결합을 허용하고 항 PD-1/IL7**

분자는 PD-1+ T 세포 내로 TCR 신호전달의 상승적인 활성화를 허용한다.

[0431] 본 발명자들은 PD-1+ T 세포를 표적화하고 사이토카인 또는 PD-1 + 세포에 융합된 단백질의 우선적인 전달 및 시스-결합을 허용하는 항 PD-1 이작용성 분자의 능력을 평가하였다. U937 PD-1- 세포 및 U937 PD1+ CD127+ 세포를 동시 배양하고(1:1 비율) 상승적인 용량으로 항 PD1/ IL-7 분자와 함께 인큐베이션하였다. 결합 및 IL-7R 신호전달(pSTAT5)을 유세포 분석법으로 정량화했다. 결합 및 pSTAT5 활성화의 EC50(nM)을 각각의 작제물 및 각각의 PD-1 + 및 PD-1- 세포 집단에 대해 결정하였다. 병행하여 항 IgG-PE(Biolegend, 클론 HP6017)로 이작용성 항체의 결합을 검출하고 유세포 분석기로 분석하였다.

[0432] **결과:** 도 11a는 모든 항 PD-1/protX 분자, 즉 항 PD-1*1/IL-2*1, 항 PD-1*1/IL-21*1, 항 PD-1* 1/IL15*1 분자는, 항 PD-1*1 및 항 PD-1*2 항체와 비교하여 유사한 효능으로 PD-1- 세포에 비해 PD-1+ 세포에 높은 효능으로 결합하며, 1개의 항 PD-1 원자가 대 2개의 항 PD-1 원자가로 구성된 분자의 높은 결합 효능을 확인한다. 도 11b 및 11c는 CD127+만을 발현하거나 CD127 및 PD-1 수용체를 동시 발현하는 세포에서 항 PD-1*1/IL-7wt*1 및 항 PD-1*1/IL7v*1 분자의 결합을 보여준다. 데이터는 두 분자가 바람직하게는 PD-1-CD127+ 세포보다 PD-1+CD127 + 세포에, 항 PD-1 단독(항 PD-1*2)에 필적할 만한 효능으로 결합함을 보여준다. 병행하여, PD-1+ 세포 대 PD-1- 세포 내로의 PSTAT5 신호전달의 활성화를 또한 도 11c에 상술된 바와 같이 평가하였다. 항 PD-1*1/IL-7wt 또는 IL7v*1 항체로 처치한 후 PD-1-CD127+ 세포에 비해 PD-1+CD127+ 세포 내로의 IL7R 신호전달 pSTAT5의 강력한 활성화(58 내지 315배 더 높은 활성화) 반면 이소형/IL7 항체는 PD-1+ 및 PD-1- 세포에서 유사한 효능을 가졌으며, 이를 통해 항 PD-1*1/IL-7*1 분자의 항 PD-1 도메인이 PD-1+ 세포에 대한 IL-7의 우선적인 결합, 즉, 약물 표적화 및 동일한 세포 상에서 활성화를 확인하였다. 이러한 양태는 생체 내에서 약물의 생물학적 활성화에 대한 관심을 갖는데, 그 이유는 PD-1 음성 나이브 T 세포에 비해 PD-1+ 종양 특이적 T 세포 상의 IL-7 또는 이작용성 분자에 융합된 다른 분자를 종양 미세환경 내로 집중시킬 것이기 때문이다. 종합하면, 이 데이터는 PD-1+ 세포에서 융합된 사이토카인의 선택적인 전달을 허용하기에 항 PD-1의 단지 하나의 아암이 충분하다는 것을 보여준다.

[0433] 다음으로, 본 발명자들은 PD-1+ T 세포에 대한 항 PD-1 이작용성 분자의 시스- 표적화의 생물학적 영향을 평가하였다. Promega PD-1/PD-L1 키트(참조 J1250) 분석을 사용하였다. 간략하게, 2개의 세포주가 사용된다 (1) 이펙터 T 세포(PD-1, NFAT-유도된 루시퍼라제를 안정적으로 발현하는 Jurkat) 및 (2) 활성화 표적 세포(PD-L1 및 동족 TCR을 자극하도록 설계된 표면 단백질을 항원 독립적인 방식으로 안정적으로 발현하는 CHO K1 세포) 세포가 공동 배양될 때, PD-L1/PD-1 상호작용은 TCR 매개된 활성화를 억제하여 NFAT 활성화 및 루시퍼라제 활성을 차단한다. 항-PD-1 항체의 추가는 PD-1 매개된 억제 신호를 차단하고 TCR 매개된 신호를 복원하여 NFAT 활성화 및 루시퍼라제 합성 및 생물발광 신호 방출을 유도한다.

[0434] 생물분석 결과를 도 12a에 나타냈으며 이는 이작용성 항 PD-1*1/IL7wt*1 분자가 항-PD1*1 또는 항-PD1*1+ 비 표적화된 이소형-IL7(별개의 화합물로서)에 비해 TCR 매개된 신호전달(NFAT)을 활성화하는데 더 우수하다는 것을 나타내며, 이는 PD1+ 세포 상에서 이작용성 분자의 상승적 효과를 입증한다. IL-7 돌연변이체를 포함하는 항 PD-1*1/IL-7v*1 분자는 또한 T 세포 상의 NFAT 신호전달을 재활성화하기 위한 유의한 상승적 효과를 보여주었다(도 12b). 이러한 데이터는 하나의 항 PD-1*1에 융합된 하나의 IL-7 사이토카인이 TCR 신호전달의 더 높은 활성화를 유리하게 유도하는 반면 두 개의 개별 화합물과 같은 조합 전략은 그러한 효능을 유도하지 않음을 입증한다.

[0435] **실시예 8 하나의 항 PD-1 원자가를 갖는 이작용성 분자는 생체 내에서 더 우수한 약동학을 입증하였다.**

[0436] 생성물의 약동학 및 약력학은 단일 주사 후 마우스에서 평가하였다. C57bl6JRj 마우스(암컷 6 내지 9주)에 단일 용량(34 nmol/kg)의 항 PD-1 또는 이작용성 항체를 정맥내 또는 복강내 주사하였다. 혈장 약물 농도는 고정화된 항-인간 경쇄 항체(클론 NaM76-5F3)를 사용하여 ELISA에 의해 결정하였고, 이어서 혈청-함유 항체를 첨가하였다. 검출은 퍼옥시다제-표지된 당나귀 항-인간 IgG(Jackson Immunoresearch; 미국 소재; 참조 709-035-149)를 첨가하여 수행하였으며, 기존의 방법으로 밝혀냈다. 각 작제물에 대해 약물 노출에 해당하는 곡선 아래 면적을 계산하였다.

[0437] **결과**: 본 발명자들은 먼저 도 6에 기재된 모든 상이한 이작용성 포맷(포맷 A, B 및 C)의 약동학을 비교하였다. 도 13은 단일 정맥내(도 13A) 또는 복강내(도 13B) 주사 후 1개 또는 2개의 IL-7v 사이토카인 및 1개 또는 2개의 항 PD-1 원자가로 작제된 항 PD-1/IL-7v의 약동학 프로파일을 보여준다. 항 PD-1*1/IL-7v*1(포맷 C)은 항 PD-1*2/IL-7v*2(포맷 A) 및 항 PD-1*2/IL-7v*1(포맷 B)과 비교하여 최고의 약동학 프로파일을 입증하였다. 정맥내 및 복강내 주사 모두 항 PD-1*1/IL-7*1(포맷 C)이 이작용성 분자의 약동학을 향상시키기 위한 최적의 작제

물임을 입증하였다.

[0438] 다음으로, 본 발명자들은 1개의 항 PD-1 아암(항 PD-1*1) 및 IL-7을 갖는 이작용성 분자가 2개의 항 PD-1 아암 및 다른 사이토카인(IL-7wt, IL-21, IL-2, IL-15)으로 작제된 동일한 이작용성 분자와 비교하여 더 우수한 생체 내 약동학적 프로파일을 나타내는지 여부를 시험하였다. 도 14는 테스트된 모든 단백질의 풀(AUC 및 배수 변화 AUC)을 보여주고 도 15는 개별 작제물에 대한 결과를 보여준다. 데이터는 모든 이작용성 분자 항 PD-1*1/protX(포맷 C)이 상응하는 이작용성 분자 항 PD-1*2/ProtX*1(포맷 B)에 비해 상당히 우수한 약동학 프로파일을 입증했음을 보여준다.

[0439] 또 다른 실험에서, 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 항체 단독의 약동학을 또한 평가하여 항 PD-1 작제물 단독이 더 나은 약동학 프로파일을 허용하는지 또는 이러한 관찰이 이작용성 분자에만 적용가능한지 여부를 이해했다. 도 16은 항 PD-1*2 및 항 PD-1*1 모두가 정맥내(도 16A) 또는 복강내(도 16B) 주사 후 유사한 프로파일을 가짐을 보여주며, 이는 놀랍게도 항 PD-1*1 작제물이 이작용성 분자에 대해서만 더 나은 약동학 프로파일을 유도함을 시사한다.

[0440] 불량한 약동학 프로파일은 이작용성 항체에 대한 잘 알려진 문제이다. 이작용성 항체는 빠르게 제거되며 임상에서의 사용을 제한하는 생체 내 짧은 반감기를 나타낸다. 생체 내 만족스러운 PK 값에 해당하는 우수한 약물 농도(20 및 100 nM)는 항 PD-1*1/ProtX*1 작제물로 적어도 48 내지 72시간 동안 유지되는 반면 단지 2 nM의 항 PD-1*2 IL7*2 분자만이 혈장에서 검출된다. 본 발명의 포맷 C 항 PD-1*1/ protX*1은 이작용성 항체의 다른 포맷(포맷 B 및 C)과 비교하여 더 긴 기간의 노출로, 생체 내에서 개선된 약동학적 프로파일을 허용한다.

[0441] **실시예 9 항 PD-*1/IL-7*1 이작용성 분자는 T 세포의 생체 내 증식을 촉진하고 항 PD-1*2/ IL*7*2 또는 항 PD-1*2/ IL*7*1 작제물에 비해 유의한 항-종양 효능을 유도한다.**

[0442] T 세포의 생체 내 증식은 이작용성 분자(34 nM/kg)의 단일 투여량을 피하 MC38 종양에 복강내 주사한 후에 평가하였다. 처리 후 4일째에, 혈액 및 종양을 수집하고, T 세포를 항 Ki67 항체로 염색하여 유세포 분석법에 의해 증식을 정량화하였다.

[0443] 생체 내 효능은 2개의 상이한 동소위 동계 모델, 즉 간암종 모델 및 중피종 동소위 모델에서 평가하였다. 인간 PD-1(엑손 2)을 발현하도록 유전적으로 변형된 면역적격 마우스를 이들 실험에 사용하였다. 중피종 모델의 경우, AK7 중피 세포를 복강내 주사하였다($3*10^6$ 세포/마우스). Hepa 1.6 모델의 경우, 문맥에 $25*10^6$ 세포를 주입하였다. 실험 1에서, 유사한 약물 노출 농도의 PBS, 항 PD-1 대조군(항 PD-1*2), 항 PD-1*1/IL*7v*1로 마우스를 처치하였다. 실험 1에서, 유사한 약물 노출 농도의 PBS, 항 PD-1 대조군(항 PD-1*2), 항 PD-1*1/IL*7wt*1로 마우스를 처치하였다. AK7 세포는 안정적으로 루시퍼라제를 발현하여 D-루시페린 주입 후 생체 내 종양 부담의 정량화를 가능하게 한다. 데이터는 스테라디안 당 cm^2 당 초 당 광자 단위로 분석되었으며 등쪽 및 복부 신호의 평균을 나타낸다.

[0444] **결과**: 도 17a는 항 PD-1*1/IL7wt*1 또는 IL7v*1 이작용성 분자(포맷 C)가 항-PD-1 항체(항 PD-1*1 또는 항 PD-1*2)보다 더 높은 정도로 CD4 및 CD8 T 세포의 유의한 증식을 촉진함을 보여준다. 항 PD-1*2/IL7*2(포맷 A) 및 항 PD-1*2/IL7*1(포맷 B) 작제물에 비해, 이들 2개 작제물의 유의하게 더 많은 CD4 T 세포가 또한 관찰되었다. 유사하게, 항 PD-1*2/IL7*2(포맷 A) 및 항 PD-1*2/IL7*1(포맷 B) 작제물에 비해 항 PD-1*1/IL7wt*1 또는 항 PD-1*1/IL-7v*1로 처치한 후 더 높은 증식이 관찰되었다. 이러한 데이터는 pSTAT5 신호를 T 세포로 활성화하는 다양한 작제물의 효율성을 뒷받침하며(도 10A), 여기서 항 PD-1*1/IL7*1 작제물은 항 PD-1*2/IL7*2 작제물에 비해 더 높은 pSTAT5 신호전달을 유도하였다.

[0445] 흥미롭게도, 본 발명자들은 항 PD-1*1/IL7wt*1 또는 IL7v*1이, 항 PD-1*2 IL-7*2 및 항 PD-1*2 분자에 대해 유의하게 더 높은 정도로, 줄기-유사 이펙터 기억 CD8 T 세포의 증식을 종양 내로 유의하게 유도함을 관찰하였다(도 17b) TCF1+ 줄기 유사 CD8 T 세포 집단을 부스팅하기 위한 항 PD-1*1 IL-7*1의 능력은 암의 면역조절에 대해 중요하기 때문에 특히 흥미롭다. 이 세포는 높은 이펙터 기능을 가진 종양 특이적 T 세포 풀을 생성하기 위해 자체 재생이 가능하다.

[0446] 도 18A 및 18B는 동소위 간암종 모델에서 항 PD-1*1 IL-7wt*1 및 항 PD-1*1 IL-7v*1의 생체 내 효능을 보여준다. 두 개의 개별 실험에서 항 PD-1*1/IL*7*1(wt 및 변이체 둘 모두)(포맷 C)은 항 PD-1*2 항체에 비해 유의하게 우수한 효능을 보여주었다. 항 PD-1*1/IL7v*로 처치한 후 완전한 종양 박멸(완전 반응)의 85%를 얻은 반면, 항 PD-1*2로 처치한 마우스의 16%만이 완전한 종양 반응을 보였다.

[0447] 비교하여, 본 발명자들은 또한 작제물 항 PD-1*2/IL7v*2를 시험하였고, 동일한 간암종 모델에서 항 PD-1*2/IL-7*2 작제물로 낮은 항-종양 효능이 관찰되었으며, 이는 항 PD-1*2/IL-7*2에 비해 항 PD-1*1/IL7*1 작제물의 생체 내 더 우수한 활성을 강조한다.

[0448] 중피종 동소위 모델(도 19 A 및 B)에서, 항 PD-1*1/IL7v*1은 항 PD-1*2 항체 처리와 유사한, 완전한 반응의 85% 초과의 높은 항-종양 효능을 입증하였다. 이러한 데이터는 항 PD-1 민감성 모델에서 항 PD-1*1/IL7v*1이 매우 효과적임을 보여주며, 포맷 C가 오직 하나의 항 PD-1 아암(항 PD-1*1)을 포함한다 할지라도, 약물은 2개의 원자가를 갖는 항 PD-1과 유사한 효능을 나타냄을 시사한다.

[0449] 종합하면, 이러한 데이터는 이작용성 항체의 설계가 생체 내에서 항종양 효능을 얻는 데 중요하다는 것을 강조한다. 하나의 사이토카인 또는 단백질을 항 PD-1*1(포맷 C)에 융합하면 최고의 항종양 효능과 T 세포 생체 내 증식을 나타내는 반면, 2개의 항 PD-1 아암과 하나 또는 두 개의 사이토카인 또는 단백질로 작제된 이작용성 분자는 생체 내에서 T 세포의 효율적인 증식을 유도하지 못하거나 항종양 효능을 나타내지 않는다.

[0450] **실시예 10: 항 PD-1*1 IL-7v*1 작제물은 IL-7 사이토카인 및 항 PD-1*1 IL7WT*1 이작용성 항체보다 더 높은 정도로 시험관 내에서 Treg의 억제 기능을 제거한다.**

[0451] 항-PD1 요법이 T 세포 이펙터 기능을 자극하지만, 면역억제 분자(TGFB, IDO, IL-10...) 및 조절 세포(Treg, MDSC, M2 대식세포)는 치료의 전체 잠재력을 제한하는 적대적인 미세 환경을 생성한다. Treg 세포는 낮은 수준의 IL-7R(CD127)을 발현하지만, IL-7 처리 후 pSTAT5를 여전히 자극할 수 있으며 IL7은 Treg 억제 기능을 해제하는 것으로 알려져 있다(문헌[Allgauer A, et al. J Immunol 2015, 195, 31393148]; 문헌[Liu W, et al. J Exp Med 2006, 203, 1701-1711]; 문헌[Seddiki N, et al J exp Med 2006, 203, 1693-1700]; 문헌[Codarri L, et al. J exp Med 2007, 204, 1533-1541]; 문헌[Heninger AK, et al J immunol 2012, 189, 5649-5658]) IL-7과 비교하여 Treg 기능을 해제하는 항 PD-1/IL7 작제물의 효능을 평가하기 위해, Treg 및 T 이펙터 세포를 공동 배양하여 억제 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 도 20에서 IL-7 또는 항-PD1-IL7 처리가 Treg 세포의 존재하에서도 Teff 세포의 증식을 허용하는 Treg 매개 억제 효과를 차단한다는 것을 관찰하였다. 항-PD1 항체는 T 이펙터 세포에 대한 Treg 억제 활성을 억제할 수 없다.

[0452] 놀랍게도, 항 PD-1*1 IL7 W142H*1은 IL-7 사이토카인(**p<0.05)뿐만 아니라 항 PD-[0534] 1*1 IL7WT*1 작제물과 비교하여 Treg 기능을 억제하는 가장 높은 효능을 입증하였다. 이들 데이터는 네이키드 IL-7 사이토카인 또는 항 PD-1*1 IL7*1 이작용성 항체의 돌연변이되지 않은 버전에 비해 항 PD-1*IL7W142H*1 작제물을 사용하는 것의 이점을 강조한다. 1가 변이체가 Treg 제거 및 동시에 강력한 T 세포 증식에 영향을 미치고, 이는 선택된 IL7 변이체 W142H가 IL-7 사이토카인 야생형 형태에 비해 IL7R에 대해 더 낮은 친화도를 나타내기 때문에 이중 효과인 것은 예상치 못한 일이었다.

[0453] 방법: CD8 이펙터 T 세포 증식에 대한 시험관 내 Treg의 억제 활성 평가. CD8+ 이펙터 T 세포 및 자가 CD4+ CD25high CD127low Treg를 세포 증식 염료(CD8+ T 세포에 대한 CPDe450)로 염색된 건강한 공여자의 말초 혈액에서 분류하였다. 그런 다음 Treg/CD8+Teff를 5일 동안 OKT3 코팅된 플레이트(2 μg/mL)에서 1:1 비율로 공동배양하고 Teff 세포의 증식을 CPD 마커의 손실과 함께 유세포 분석법으로 정량화하였다.

[0454] **실시예 11: 항 PD-1*1 IL-7v*1은 2개의 상이한 종양 모델에서 항 PD-1*1 IL7WT*1 작제물에 비해 생체 내에서 우수한 효능을 입증하였다.**

[0455] 생체 내 효능은 2개의 상이한 동소위 동계 모델, 간암종 모델 및 중피종 동소위 모델에서 평가하였다. 인간 PD-1(엑손 2)을 발현하도록 유전적으로 변형된 면역적격 마우스를 이들 실험에 사용하였다. 중피종 모델의 경우, AK7 중피 세포를 복강내 주사하였다($3*10^6$개 세포/마우스). Hepa 1.6 모델의 경우, 문맥에 $2.5*10^6$ 세포를 주입하였다. 실험 1에서는 유사한 약물 노출 농도의 PBS, 항 PD-1 대조군(항 PD-1*2), 항 PD-1*1/IL7v*1(항 PD-1*1 IL7W142H*1) 또는 항 PD-1*1 IL7wt*1로 마우스를 처치하였다. AK7 세포 및 Hepa1.6은 안정적으로 루시퍼라제를 발현하여 D-루시페린 주입 후 생체 내 종양 부담의 정량화를 가능하게 한다. 데이터는 스테라디안 당 ㎠ 당 초당 광자 단위로 분석되었으며 등쪽 및 복부 신호의 평균을 나타낸다.

[0456] AK7 복강내 모델은 PD-1을 발현하는 높은 CD4+ 및 CD8+ T 세포 침윤과 관련된 PD-1 항체 치료에 매우 민감하며, 도 19에서 입증된 바와 같이 항 PD-1 항체의 양호한 반응을 허용하는 종양 미세환경으로 관찰되었다. 본 실험에서, 항 PD-1*1 IL7v*1의 효능을 이의 야생형 IL7 상동체 작제물(항 PD-1*1 IL7wt*1)과 비교하였다. 항 PD-1*1 IL7v*1 작제물은 완전한 반응의 92%를 유도하였고(n=1 사망/14 마우스) 중간 정도의 항-종양 효능(완전한 반응의 62%)을 유도하는 항 PD-1*1 IL7wt*1 작제물에 비해 효능이 우수하였다(도 21A) 종양 생물발광 분석을 통해

항 PD-1*1 IL7v*1이 처리 후 11 내지 18일차 이내에 종양 제거를 유도한 반면, 항 PD-1*1 IL7wt*1 군에서는, 처리 후 종양의 축소가 결국에 재발하는 것(데이터는 도시되지 않음)을 확인하였으며, 이는 낮은 친화도 IL-7(IL7W142H)로 구축된 이작용성 항체와 비교하여 IL-7 야생형 작제물의 효능이 일시적일 수 있음을 나타낸다.

[0457] 항 PD-1*1 IL7v*1 처리에 의해 유도된 기억 반응을 평가하기 위해, 항 PD-1*1 IL7v*1로 처리된 모든 치유된 마우스에 AK7 중피종 세포의 두 번째 주입을 다시 시도하였다. 도 20B에 도시된 바와 같이, 종양 재주입 후 종양 생물발광이 검출되지 않은 반면, 나이브 주입된 마우스에서는 여러 시점에서 높은 생물발광 신호가 검출되었다. 이러한 데이터는 항 PD-1*1 IL7v*1이 임의의 새로운 처리가 없을 때 강력하고 장기적인 특이적인 기억 항-종양 반응을 유도한다는 것을 입증하였다.

[0458] 항 PD-1*1 IL7v*1은 IL-7R에 대한 더 낮은 친화도를 갖지만, 이러한 작제물은 항 PD-1*IL-7wt*1 작제물에 비해 예기치 않은 더 높은 효능을 입증하였고 PD-1 민감성 종양 모델에서 항 PD-1*2 항체와 같이 이의 길항제 항 PD-1 활성을 보유한다. 이러한 데이터는 항 PD-1*1 IL7v*1이 생체 내에서 PD-1 억제 수용체의 차단 활성을 유지하기 위한 바람직한 작제물임을 강조한다. 본 발명자들은 IL-7의 돌연변이가 PD-1- CD127+ 비 종양 특이적 T 세포에 비해(도 11d에 도시된 바와 같음) PD-1+ 종양 특이적 T 세포에 대한 이작용성 항체의 친화도의 균형을 맞춰서 생체 내에서 더 우수한 효능을 초래할 것이라고 가정한다.

[0459] 항 PD(L)1 불응성 모델에서 암 환자의 1차 내성을 모방하는 효능을 평가하기 위해, 간세포 암종 Hepa16의 뮤린 모델을 선택하였다. 이는 면역적격 마우스(인간 PD-1 발현)에서 구현된 동소위 동계 모델이다. 이 모델은 설명된 종양으로부터 종양 T 세포 배제로 인해 특히 관심이 있다(문헌[Gauttier V et al. 2020, Clin Invest, 130, 6109-6123]) IL7R에 대해 낮은 친화도를 갖는 항 PD-1*1 IL7v*1와 IL7R에 대해 높은 친화도를 갖는 항 PD-1*1 IL7wt*1의 효능을 본 실험에서 나란히 비교하였다. 별개의 군에서, 동일한 약물 농도의 PBS(대조군), 항 PD-1*2 또는 이소형*1 IL7*v*1(항-바이러스 단백질 엔벨로프를 표적화하고 본 실험에서 이소형 대조군으로서 사용한 이특이적 항체의 상동체 작제물)로 마우스를 처치하였다. 도 21에 도시된 바와 같이 항 PD-1*1 IL7v*1은 높은 친화도 야생형 IL7로 작제된 항 PD-1*1 IL7wt*1(단지 완전한 반응의 47%)보다 60%의 명확하게 더 우수한 완전한 종양 반응을 달성하였다. 이러한 모델에서, 예상한 바와 같이, 항 PD1 항체는 효능이 없었다. 또한, 이소형*1 IL7v*1은 이러한 모델에서 효능이 없었으며 이는 항 PD-1/IL7 작제물을 사용하여 항 PD-1 및 IL-7 처리를 결합하는 것이 PD-1 불응성 모델에서 T 세포 활성화 및 항종양 반응을 향상시키는 좋은 치료 전략임을 입증한다.

[0460] 항 PD-1*1 IL7v*1 처리에 의해 유도된 기억 반응도 이 모델에서 시험하였으며 동일한 종양 부재가 관찰되었다.

[0461] 전체적으로 이들 데이터는 하나의 항 PD-1 원자가 및 CD127 수용체에 대해 더 낮은 친화도를 갖는 돌연변이된(W142H) 하나의 IL-7 사이토카인을 갖는 항 PD-1/IL-7 작제물의 우수한 효능을 확인시켜준다.

[0462] **실시예 12: 항 PD-1 불응성 모델에서 입증된 항 PD-1*1 IL-7v*1은 항 PD-1 수용체의 강력한 전사 활성 및 줄기 유사 기억 CD8 T 세포 하위집단(TCF1+독소 세포)의 종양내 증식과 상관관계가 있다.**

[0463] 항 PD-1*1 IL7v*1이 종양 미세환경에 미치는 영향을 더 잘 이해하기 위해 전체 종양의 전사체 분석도 또한 수행하였다. Nanostring 기술(nCounter® PanCancer Immune 프로파일링 패널)을 사용하여 유전자 발현을 검출하고 정량화하였다. 데이터는 음성 대조군의 기하 평균에 대한 배경 임계값을 사용하여 패널에 포함된 여러 참조 유전자로 정규화된다. 유전자의 차등 발현(DEG)은 R 패키지를 사용하여 분석되었다. 도 23의 DESeq2 분석으로부터의 DEG의 감독되지 않은 계층적 클러스터링 히트맵은 전사 발현 패턴이 항 PD-1과 항 PD-1*1 IL7W14H*1 그룹 간에 매우 유사하고 PBS군과는 유의하게 다르다는 것을 보여주며, 이는 항 PD-1*1 IL7v*1 작제물의 항 PD-1 도메인이 하나의 항 PD-1 원자가에도 불구하고 생체 내 길항제 생체 활성을 보존했음을 시사한다. PBS 조건과 비교하여 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 IL7W142H*1로 처치한 후 상향조절된 유전자의 STRING을 사용한 단백질-단백질 상호작용 네트워크 기능 강화 분석을 통해, 화학주성 면역 수용체 활성, Jak-STAT 사이토카인 신호전달 및 항원 제시(MHC 단백질 복합체 결합 및 TCR 신호전달)에 관여하는 여러 유전자 클러스터를 확인하였다. 항 PD-1*2와 항 PD-1*1 IL7W142H*1 사이에서 차등적으로 발현되는 유전자 중에서, 본 발명자들은 R 패키지 GSVA로부터의 단일 샘플 GSEA(ssGSEA) 시그니처 알고리즘을 사용하여 항-PD-1군 및 PBS군(도 23b)에 비해 항 PD-1*1 IL7W142H*1 군에서 TCF7, CCR7, SELL, IL7R 유전자의 발현과 관련된 CD8 또는 CD4 T 조기 활성화/기억 줄기 유사 T 세포의 유의한 상향조절을 관찰하였다. 반대로, 고갈된 CD8 T 세포 유전자(LAG3, PRF1, CD8A, HAVRC2, GZMB, CD8B1, KLRD1, TNFRSF9, TIGIT, CTSW, CCL4, CD63, IFNG, CXCR6, FASL, CSF1)의 상향조절이 예상한 바와 같이 항 PD-1 처리된 군에서 관찰되었다. 고갈된 T 세포의 유전자 특징 및 나이브 유사/줄기 유사 기억 T 세포 특징을 문헌[(Andreatta et al., Nature comm 2021)]에서 채택하였으며, 이는 단일 세포 전사체 분석을 사용하

여 암에서 상이한 T 세포 하위 집합을 정의한다.

[0464] 항 PD-1*1 IL7v*1 처리에 의해 유도된 집단을 추가로 특성화하기 위해 CD8 T 세포 침윤 림프구의 유세포분석에 의한 표현형 분석을 또한 생체 외에서 수행하였다. 이 내성 모델에서 초기에 기술된 종양으로부터의 T 세포 배제에도 불구하고, 종양 침윤 림프구(TIL) 조성은 항 PD-1*1 IL7W142H*1 처리 후 크게 증가하고 생성물은 T 세포 하위집합을 극적으로 변형시켰다(도 23b 및 23c, 24c) 유세포 분석은 항 PD-1*1 IL7 W142H*1이 종양 미세환경의 조성을 변형시키고, CD4에 비해 CD8 T 세포의 우호적인 축적과 동시에 Treg을 아낀다는 것을 입증하였다(도 24a) 줄기-유사 기억 T 세포(CD3+CD8+CD44+TCF1+TOX-)의 표현형을 갖는 CD8+ CD44+ 활성화된 T 세포의 백분율의 높은 증가가 처리 후 관찰되며(도 24b), 이는 또한 ki67 증식 마커를 발현한다(도 24c). 항 PD-1 처리는 TOX-TCF1- 또는 TOX+ TCF1-관련 고갈 표현형의 종양으로의 축적을 유도한다(문헌[Utzschneider et al, Immunity 2016, 45, 415-427]; 문헌[Mann et al, 2019 Nature immunology, 20, 1092-1094]) 이러한 데이터는 전사체 분석으로 뒷받침되고 항 PD-1*1 IL7W142H*1 분자에 의해 활성화된 T 세포가 CD44 활성화 마커를 발현한다는 것을 추가로 결정하여, 이러한 T 세포 하위 집합이 나이브 T 세포 하위 집합이 아니라 조기 활성화된 줄기 유사 기억 T 세포 하위 집합(TCF1+TOX-)임을 시사한다. 이러한 데이터는 또한 또 다른 종양 모델에서 생체 내 줄기 유사 기억 T 세포의 축적 및 증식을 촉진하는 항 PD-1*1 IL7W142H*1의 효능을 설명하는 실시예 9를 확인시켜준다.

[0465] **실시예 13: 항 PD-1*1 IL7v*1은 만성적으로 자극된 인간 T 세포의 생존을 유지하고 TCF1+ T 세포의 증식을 유도한다.**

[0466] 인간 T 세포에 대한 항 PD-1*1IL7v*1의 효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 시험관 내 만성 항원 자극 모델에서 항 PD-1/IL7 작제물의 효과를 시험하였다. 인간 PBMC는 3일 마다 CD3 CD28 코팅된 플레이트(3 μg/mL의 OKT3 및 3 μg/mL, CD282 항체)에서 반복적으로 자극하였다. 각각의 자극에서, 항 PD-1*1 IL7v*1(항 PD-1*1 IL7W142H*1) 작제물, 이소형 대조군 또는 항 PD-1*1 항체를 배양에 첨가하였다. 5차 자극 후 24시간 후에, T 세포 생존력 및 표현형을 유세포 분석으로 평가하였다.

[0467] 도 25A는 항 PD-1*1 IL7W142H*1이 항 PD-1 처리에 비해 만성적으로 고갈된 T 세포의 생존을 유지함을 나타낸다. T 세포의 표현형 분석(도 25B)은 항 PD-1*1 IL7v*1이 특이적 증식을 촉진하고 TCF1+ CD8 T 세포 하위 집합을 유지함을 입증하였다. TCF1+ T 세포 집단은 자가 재생 및 장기 효과적인 반응이 가능한 줄기-유사 T 세포 집단으로서 설명된다. 이러한 결과는 암의 초기 단계(보강 또는 신보강 상황)에서 TIL을 항 PD-1*1 IL7v*1로 재활성화하여 면역 종양 치료 또는 기타 암 치료에 대한 1차 또는 2차 저항성 및 다양한 면역 종양 탈출 상황에서 고갈된 T 세포 증식을 방지하는 고형 종양에서 장기적인 효과를 예상할 수 있게 한다.

[0468] **실시예 14: 항 PD-1*1 IL-7v*1은 PD-1 요법에 대해 내성인 상이한 인간화 모델에서 생체 내 단독요법 효능을 입증하였다.**

[0469] 삼중음성유방암(TNBC) 모델(유방암 세포 MDA-MB231을 피하 이식한 면역결핍 마우스)에서, 마우스를 4명의 다른 공여자로부터 인간 말초혈액 단핵세포(PBMC)로 인간화한 다음 PBS, 항 PD-1*2 또는 항 PD-1*1 IL7W142H*1 이작용성 항체로 처치하였다. 시험된 모든 PBMC 공여자에서, 항 PD-1*1 IL7v*1은 종양 성장을 감소시킨 반면 항 PD-1*2는 단독으로는 효과가 없었다(도 26).

[0470] 또 다른 인간화 마우스 모델인 폐암 모델(A549)에서, 항 PD-1*1 IL7v*1의 효능은 항 PD-1*1 처리된 마우스(34일)의 혈청에서 IFNg 분비 증가와 관련된 항 PD-1*1에 대해 확인하였다(도 27). 이 두 모델은 모두 항 PD-1*1IL7v가 또한 항 PD-1*2보다 높은 정도로 생체 내 인간 면역-매개 항종양 반응을 조절할 수 있음을 입증한다.

[0471] **실시예 15: 항 PD-1*1 IL7v *1은 시노몰구스 원숭이에서 항 PD-1*1 IL7wt*1 분자에 비해 우수한 약동학적 프로파일을 입증하였다.**

[0472] 시노몰구스 원숭이에게 1회 용량의 항 PD-1*1 IL7wt*1(08 mg/kg, 401 mg/kg) 또는 1회용량의 항 PD-1*1 IL7v*1(항 PD-1*1 IL7 W142H*1) 08 mg/kg, 401 mg/kg 또는 25 mg/kg)을 정맥 내로 주입하였다. 주입 후, 여러 시점에서 혈청을 수집하여 MSD 기술을 사용하여 ELISA 면역분석에 의해 항 PD-1 IL7 작제물을 정량화하였다. 간략하게, 인간 PD1 단백질을 고정화하고 혈청 항 PD-1*1 IL7*1 항체를 첨가하였다. ELISA를 통해 설포-태그된 항-인간 카파 경쇄 모노클로날 항체로 밝혔다.

[0473] 약동학적 데이터는 선형이었고, 두 작제물 모두에 대해 용량 관련이 있었다. 그러나, 항 PD-1*1 IL7v*1 작제물에서는, 항 PD-1*1 IL7wt*1 작제물에 비해 더 나은 약동학적 프로파일이 관찰된다(도 28)(곡선 아래 면적 29.6

대 108, 투여량 4.01 mg/kg에서 IL7wt 대 IL7v) 흥미롭게도, IL7 수용체에 대한 친화도가 낮은 항 PD-1*1 IL7v*1은 10 내지 14일까지 생체 내에서 CD8 T 세포의 증식을 유도하여, 약물의 생물학적 효과가 약동학 노출 이상으로 확장됨을 보여주었다. 이러한 데이터는 비인간 영장류의 T 세포 하위 집합에 대한 장기 효과를 측정하고 인간 상황에 적용가능한 새로운 약력학 모델을 허용한다: 즉, 항 PD-1*1 IL7v*1 이작용성 항체를 단 한 번 주사한 후 CD8+ T 세포 증식.

[0474] **실시예 16: IgG1 N297A 이소형 또는 LALA PG IgG1 이소형으로 작제된 항 PD-1*1 IL7v *1은 인간 T 세포로 pSTAT5 신호전달을 활성화하는 동일한 효능을 갖는다.**

[0475] 실시예 1 내지 15에서, 항 PD-1*1/사이토카인 작제물을 위해 포맷 IgG1 N297A를 사용하였다. 본 발명자들은 LALA PG 추가 돌연변이를 갖는 또 다른 Fc 사일런트 형식을 시험하였으며, 이러한 돌연변이는 LALA PG 돌연변이가 FcR 수용체에 대한 결합을 손상시키기 때문에 ADCC, ADCP 및 CDC 활성을 완전히 제거하는 것으로 설명되었다.

[0476] 항 PD-1*1 IL7W142H*1의 IL-7R 활성을 pSTAT5 활성에 의해 평가하였다(도 29). CD4 및 CD8 인간 T 세포에 대한 활성 기간의 차이는 2개의 작제물 사이에서 발견되지 않았으며 이는 본 발명이 상이한 Fc 사일런트 이소형으로 작제될 수 있음을 나타낸다.

[0477] **실시예 17. 항 PD-1*1/protX*1은 생체 내 독성이 없음을 입증하였다.**

[0478] C57BL/6 마우스에 이작용성 분자를 5 또는 20mg/kg의 3회 용량으로 복강내 주사하거나 50mg/kg 또는 100mg/kg의 단일 고용량을 복강내 주사한 후 생체 내 독성을 평가하였다. 체중은 치료 전(1일 및 4일 전), 치료 당일, 치료 후 매일 2회 조절되었습니다. PBS를 대조군으로 사용하였다.

[0479] **결과**: 도 30은 항 PD-1*1/protX*1로 처치한 마우스가 PBS 대조 주사 마우스와 유사한 체중을 나타냄을 보여주며, 이는 만성 또는 급성으로, 항 PD-1*1/protX*1(IL7 또는 IL2)을 주사하는 것이 심지어 고용량을 투여해도 독성을 유발하지 않음을 시사한다. 또한, 마우스는 고통의 외부 징후를 나타내지 않았다.

[0480] **재료 및 방법**

[0481] **ELISA 결합 PD1**

[0482] 활성 ELISA 분석을 위해, 재조합 hPD1(Sino Biologicals, 중국 베이징 소재; 참조 10377-H08H)을 탄산염 완충액(pH 9.2)에서 0.5 μg/ml로 플라스틱에 고정화하고, 정제된 항체를 첨가하여 결합을 측정했다. 인큐베이션 및 세척 후, 퍼옥시다제-표지된 당나귀 항-인간 IgG(Jackson Immunoresearch; 미국 소재; 참조 709-035-149)를 첨가하고 통상적인 방법에 의해 밝혀내었다.

[0483] **ELISA 길항제: PDL1과 인간화 항-PD1 간의 경쟁**

[0484] PD-1:PD-L1 억제제 스크리닝 ELISA 분석 쌍(AcroBiosystems; 미국 소재; 참조 EP-101)에 의해 경쟁적 ELISA 분석을 수행하였다. 이 분석에서, 재조합 hPDL1은 PBS pH7.4 완충액에서 2 μg/ml로 플라스틱에 고정하였다. 정제된 항체(상이한 농도)를 0.66 μg/ml 최종(고정 농도) 비오티닐화 인간 PD1(AcroBiosystems; 미국 소재; 참조 EP-101)과 혼합하여 37℃에서 2시간 동안 경쟁적 결합을 측정하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 비오틴-PD-1Fc 결합을 검출하기 위해 퍼옥시다아제-표지된 스트렙타비딘(Vector laboratoring; 미국 소재; 참조 SA-5004)을 첨가하고 통상적인 방법으로 밝혀냈다.

[0485] **pSTAT5 분석**

[0486] 건강한 인간 지원자의 말초 혈액에서 단리된 PBMC를 항 PD-1/IL-7 분자와 함께 37℃에서 15분 동안 인큐베이션했다. 건강한 인간 지원자의 말초 혈액에서 단리된 PBMC를 항 PD-1/IL-7 분자와 함께 37℃에서 15분 동안 인큐베이션했다.

[0487] 시스 활성을 측정하기 위해, CD127 및 PD-1로 형질도입된 U937 세포를 CD127+로만 형질도입된 U937 세포와 혼합하였다. 세포를 1:1 비율로 혼합된 세포 증식 염료(CPDe450 또는 CPDe670, thermofisher)로 염색하고 37℃에서 15분 동안 시험된 분자로 처치하였다. 각각의 세포의 하위 집합을 세포 증식 염료(CPDe450 또는 CPDe670)로 표지하고 배양하였다. 이어서 세포를 고정하고, 투과화하고 AF647 표지된 항-pSTAT5(클론 47/Stat5(pY694), BD Bioscience)로 염색하였다. 인간 PBMC의 경우, CD3+ T 세포 집단 내로의 pSTAT5 활성화를 평가하였다. U937 분석을 위해, U937 PD1+ CD127+ 세포 및 U937 CD127+ 세포 내로의 pSTAT5 활성화를 평가하였다.

[0488] **세포 결합 분석**

[0489] CD127 및 PD-1으로 형질도입된 U937를 CD127+만으로 형질도입된 U937과 혼합했다. 세포를 1:1의 비율로 혼합된 세포 증식 염료(CPDe450 또는 CPDe670, Thermofisher)로 염색하였다. 세포를 황색/생존 사멸 고정가능한 염색(Thermofisher)으로 염색한 다음, PBS 2% 인간 혈청(BD Bioscience) 중에 희석된 인간 Fc Block으로 염색하였다. 이어서 세포를 연속 농도의 시험된 분자로 염색하고 항-인간 IgG-PE 항체(Biolegend, 클론 HP6017)를 사용하여 항체를 밝혀내고 유세포 분석으로 분석하였다.

[0490] **생체 내 항 PD-1/protX의 약동학**

[0491] 약동학을 분석하기 위해, 분자의 단일 용량을 C57bl6JrJ 마우스(암컷 6 내지 9주)에 안와 내 또는 복강 내로 또는 정맥 내(안와 후) 주사하였다. 혈장 중 약물 농도는 IgG 융합된 I167을 함유하는 고정된 항-인간 경쇄 항체(클론 NaM76-5F3) 희석된 혈청을 사용하여 ELISA에 의해 결정하였다. 검출은 퍼옥시다제-표지된 당나귀 항-인간 IgG(Jackson Immunoresearch; 미국 소재; 참조 709-035-149)를 이용하여 수행하였고 통상적인 방법으로 밝혀내었다.

[0492] **Promega 세포-기반 생물분석을 사용한 T 세포 활성화 분석**

[0493] Promega PD-1/PD-L1 키트(참조 J1250)를 사용하여 항-PD-1 항체 복원 T 세포 활성화의 능력을 시험하였다. (1) 이펙터 T 세포(PD-1, NFAT-유도 루시퍼라제를 안정적으로 발현하는 Jurkat) 및 (2) 활성화 표적 세포(항원-독립적 방식으로 동족 TCR을 자극하도록 설계된 PDL1 및 표면 단백질을 안정적으로 발현하는 CHO K1 세포)의 2개의 세포주를 사용하였다. 세포를 공배양할 때, PD-L1/PD-1 상호작용은 TCR 매개 활성화를 억제하여 NFAT 활성화 및 루시퍼라제 활성을 차단한다. 항 PD-1 항체의 추가는 NFAT 활성화 및 루시퍼라제 합성 및 생물발광 신호 방출로 이어지는 PD-1 매개 억제 신호를 차단한다. 실험은 제조업체의 권장 사항에 따라 수행되었다. 시험 분자의 연속 희석액을 시험하였다. PD-L1+ 표적 세포, PD-1 이펙터 세포 및 시험 분자의 공동 배양 후 4시간 후에, BioGlo™ 루시페린 기질을 웰에 첨가하고 플레이트를 Tecan™ 발광계를 사용하여 판독했다.

[0494] **생체 내 증식**

[0495] 이작용성 분자(34 nM/kg)의 단일 용량을 피하 MC38 종양이 있는 C57bl6JrJ 마우스(암컷 6 내지 9주)에 복강내 주사했다. 마우스를 복강 내 주사를 통해 1회 용량(34 nM/kg)으로 처치하였다. 치료 후 4일째에, 혈액을 수집하고, T 세포를 항 CD45, CD3, 항 CD8, 항 CD4 항체 및 항 ki67 항체로 염색하여 유세포 분석으로 증식을 정량화하였다.

[0496] **생체 내 인간화 PD1 녹 인 마우스 모델**

[0497] 항 PD-1/IL-7 분자의 효능을 인간 PD-1(엑손 2)을 발현하도록 유전적으로 변형된 동계 면역적격 마우스 모델에서 생체 내에서 평가하였다. 동소위 중피종 모델의 경우, AK7 중피 세포를 복강 내로 주입하고(3e6 세포/마우스) 4/6/8일차에 동등한 약물 노출 용량[항 PD-1*2(1mg/kg), 항 PD-1*1/IL-7*1, 4 mg/kg]으로 처치하였다. 주입된 AK7 세포는 루시퍼라제를 안정적으로 발현하여 D-루시페린(3㎍/마우스, GoldBio, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재, 참조 115144-35-9)의 복강 내 주입 후 생물발광 신호를 생체 내에서 생성할 수 있다. 루시페린 주입 10분 후, 생물발광 신호를 마우스의 등쪽 및 복부 상에서 Biospace Imager에 의해 1분 동안 측정하였다. 데이터는 스테라디안 당 ㎠ 당 초 당 광자 단위로 분석되었으며 등쪽 및 복부 신호의 평균을 나타낸다. 각각의 군은 그룹 당 5 내지 7마리 마우스의 평균 +/- SEM을 나타낸다. 간암종 모델의 경우, Hepa1.6 간암종 세포를 문맥에 25e6 세포로 피하로 주입하였다. 이어서 마우스를 4/6/8일차에 동등한 약물 노출 용량[항 PD-1*2(1 mg/kg), 항 PD-1*1/IL-7*1, 4 mg/kg]으로 처치하였다.

[0498] **항체 및 이작용성 분자**

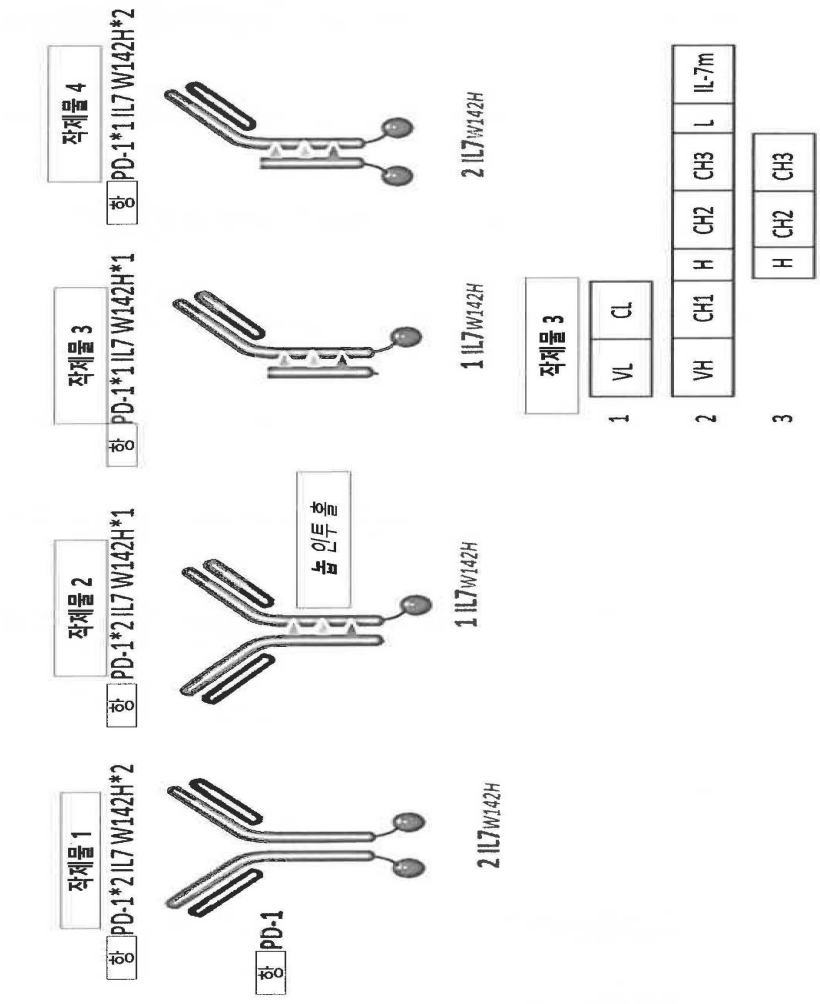
[0499] 하기 항체 및 이작용성 분자가 본 명세서에 개시된 상이한 실험에서 사용되었다:

[0500]

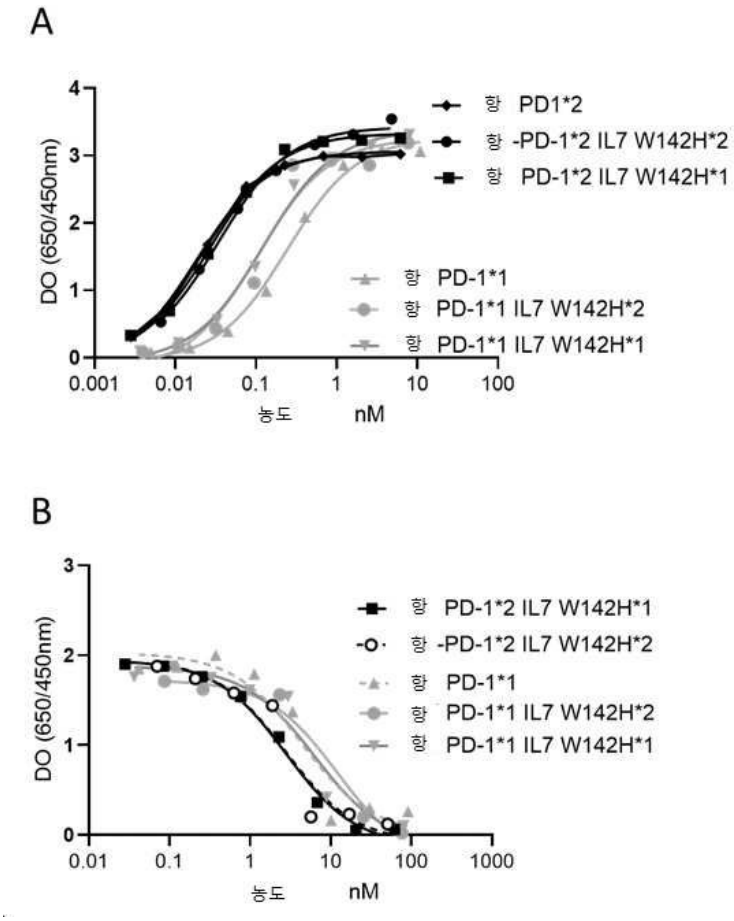
분자	서열번호 (해당시, 사슬 A)	서열번호 (해당시, 사슬 B)	서열번호 경쇄
항 PD1*2	35	--	80
항 PD1*1	75	90	80
항 PD-1*2 IL-7 W142H*2 또는 항 PD-1*2/IL-7v*2	92	--	80
항 PD-1*2 IL-7 W142H*1 또는 항 PD-1*2/IL-7v*1	81	83	80
항 PD-1*1 IL-7 W142H*1 또는 항 PD-1*1/IL-7v*1	75	83	80
항 PD-1*1 IL-7 W142H*2 또는 항 PD-1*1/IL-7v*2	76	83	80
항 PD-1*2 IL-7 WT*2	91	--	80
항 PD-1*2 IL-7 WT*1	81	93	80
항 PD-1*1 IL-7 WT*1	75	93	80
항 PD-1*2 IL-2*1	81	84	80
항 PD-1*1 IL-2*1	75	84	80
항 PD-1*2 IL-15*1	81	85	80
항 PD-1*1 IL-15*1	75	85	80
항 PD-1*2 IL-21*1	81	86	80
항 PD-1*1 IL-21*1	75	86	80

도면

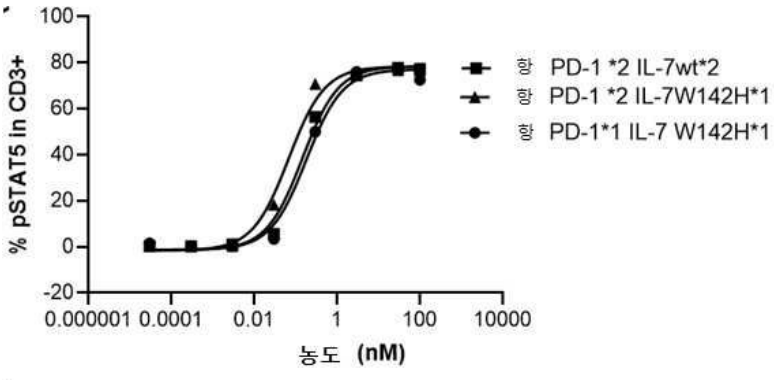
도면1


작제물 1
항 PD-1*2 IL7 W142H*2
항 PD-1
2 IL7W142H
작제물 2
항 PD-1*2 IL7 W142H*1
녹 인두 홀
1 IL7W142H
작제물 3
항 PD-1*1 IL7 W142H*1
1 IL7W142H
작제물 4
항 PD-1*1 IL7 W142H*2
2 IL7W142H
작제물 3
1
VL
CL
2
VH
CH1
H
CH2
CH3
L
IL-7m
3
H
CH2
CH3

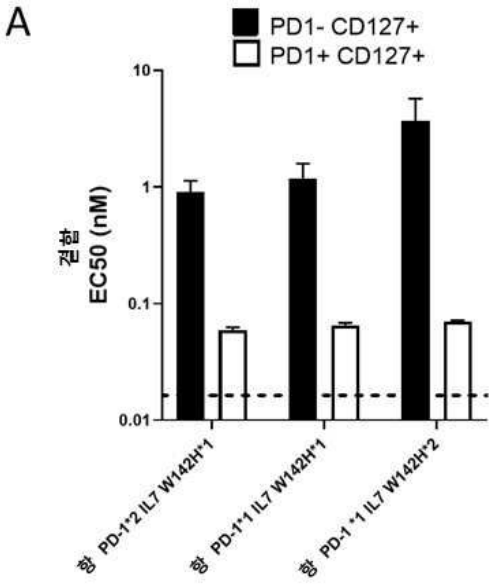
도면2

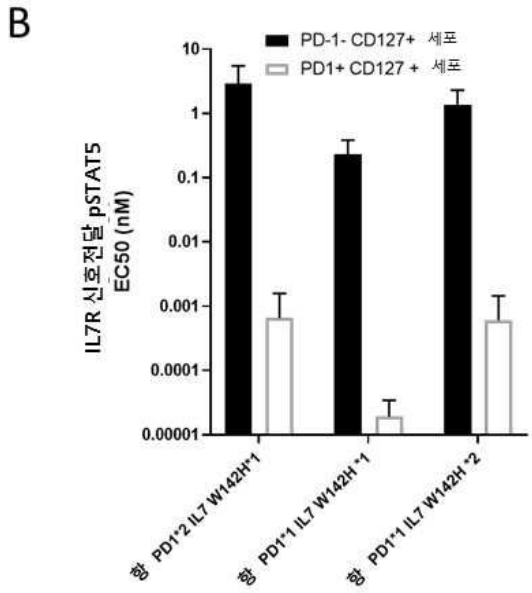

A
DO (650/450nm)
농도
nM
항 PD1*2
항 -PD-1*2 IL7 W142H*2
항 PD-1*2 IL7 W142H*1
항 PD-1*1
항 PD-1*1 IL7 W142H*2
항 PD-1*1 IL7 W142H*1
B
DO (650/450nm)
농도
nM
항 PD-1*2 IL7 W142H*1
항 -PD-1*2 IL7 W142H*2
항 PD-1*1
항 PD-1*1 IL7 W142H*2
항 PD-1*1 IL7 W142H*1

도면3

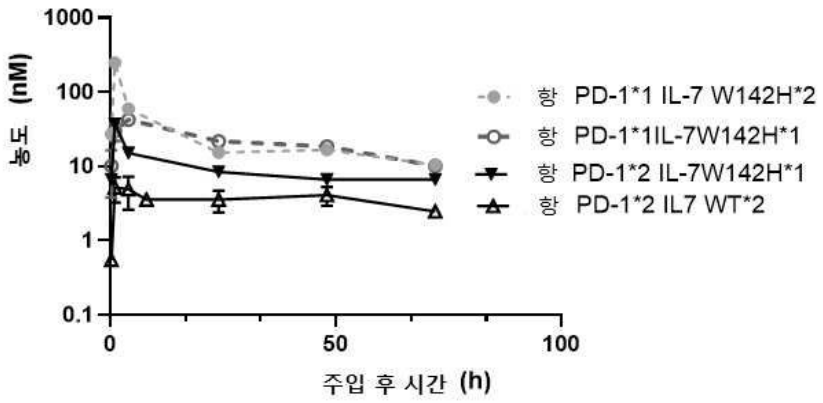

% pSTAT5 In CD3+
농도 (nM)
항 PD-1 *2 IL-7wt*2
항 PD-1 *2 IL-7W142H*1
항 PD-1*1 IL-7 W142H*1

도면4

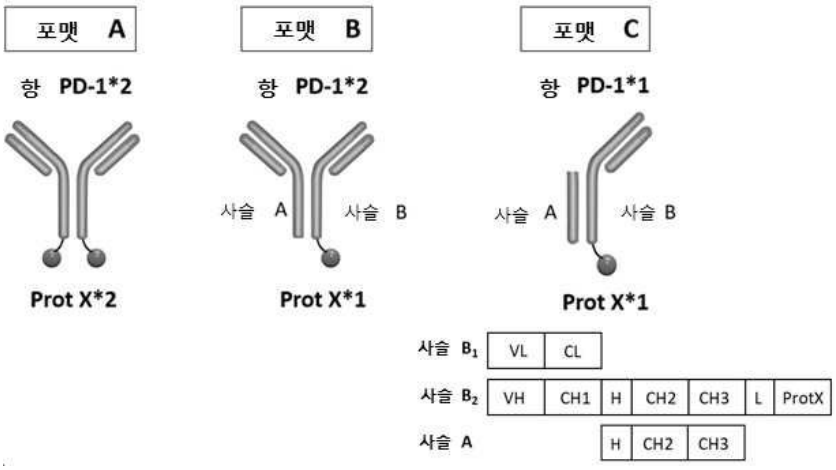

A
PD1- CD127+
PD1+ CD127+
결합
EC50 (nM)
10
1
0.1
0.01
항 PD-1*2 IL7 W142H*1
항 PD-1*1 IL7 W142H*1
항 PD-1 *1 IL7 W142H*2


B
PD-1- CD127+ 세포
PD1+ CD127 + 세포
IL7R 신호전달 pSTAT5
EC50 (nM)
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
항 PD1*2 IL7 W142H*1
항 PD1*1 IL7 W142H *1
항 PD1*1 IL7 W142H *2

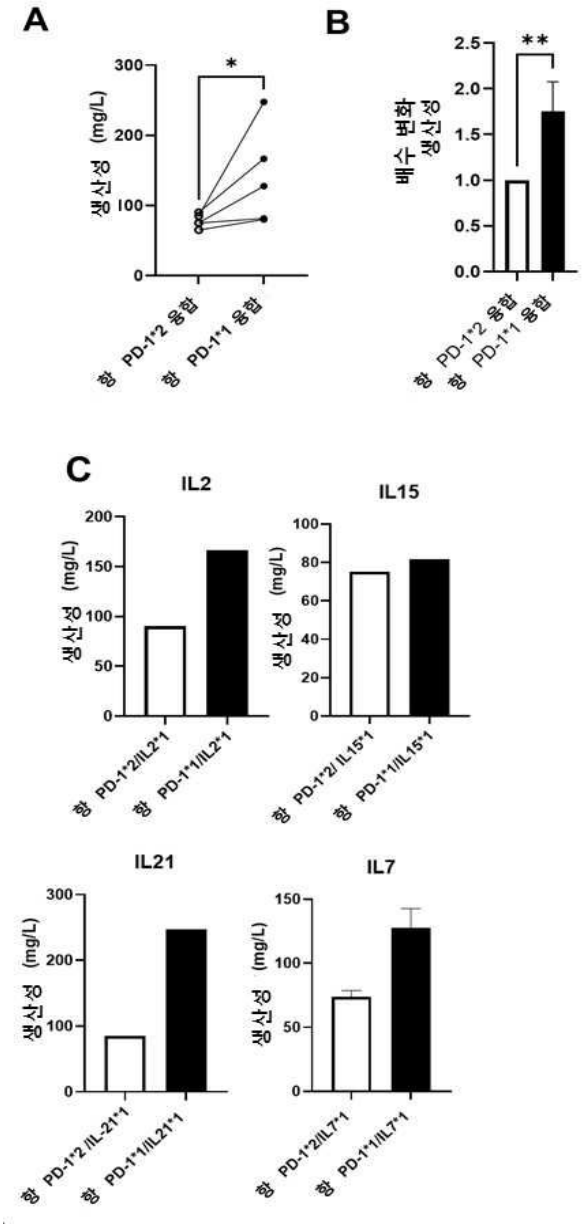
도면5


1000
100
10
1
0.1
(nM)
농
0
50
100
주입 후 시간 (h)
항 PD-1*1 IL-7 W142H*2
항 PD-1*1IL-7W142H*1
항 PD-1*2 IL-7W142H*1
항 PD-1*2 IL7 WT*2

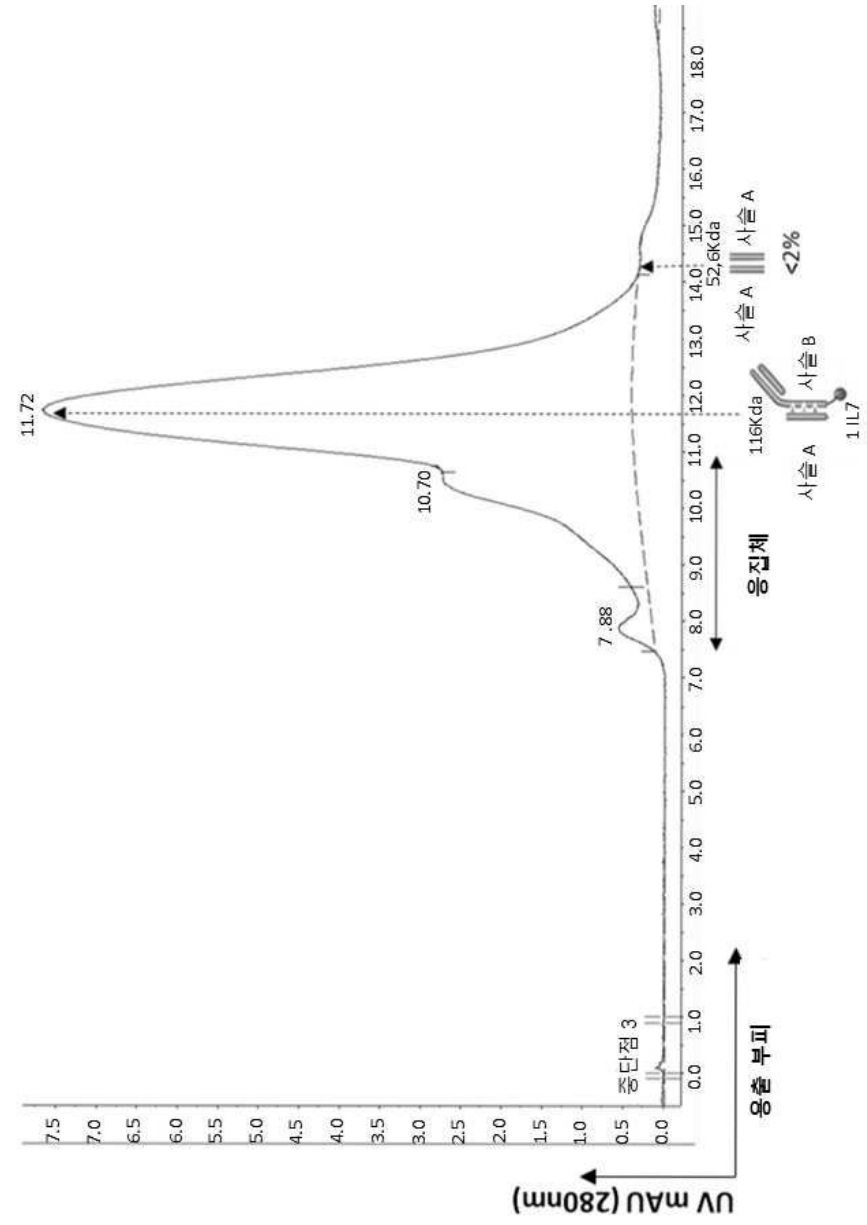
도면6


포맷 A
항 PD-1*2
Prot X*2
포맷 B
항 PD-1*2
사슬 A
사슬 B
Prot X*1
포맷 C
항 PD-1*1
사슬 A
사슬 B
Prot X*1
사슬 B1
VL
CL
사슬 B2
VH
CH1
H
CH2
CH3
L
ProtX
사슬 A
H
CH2
CH3

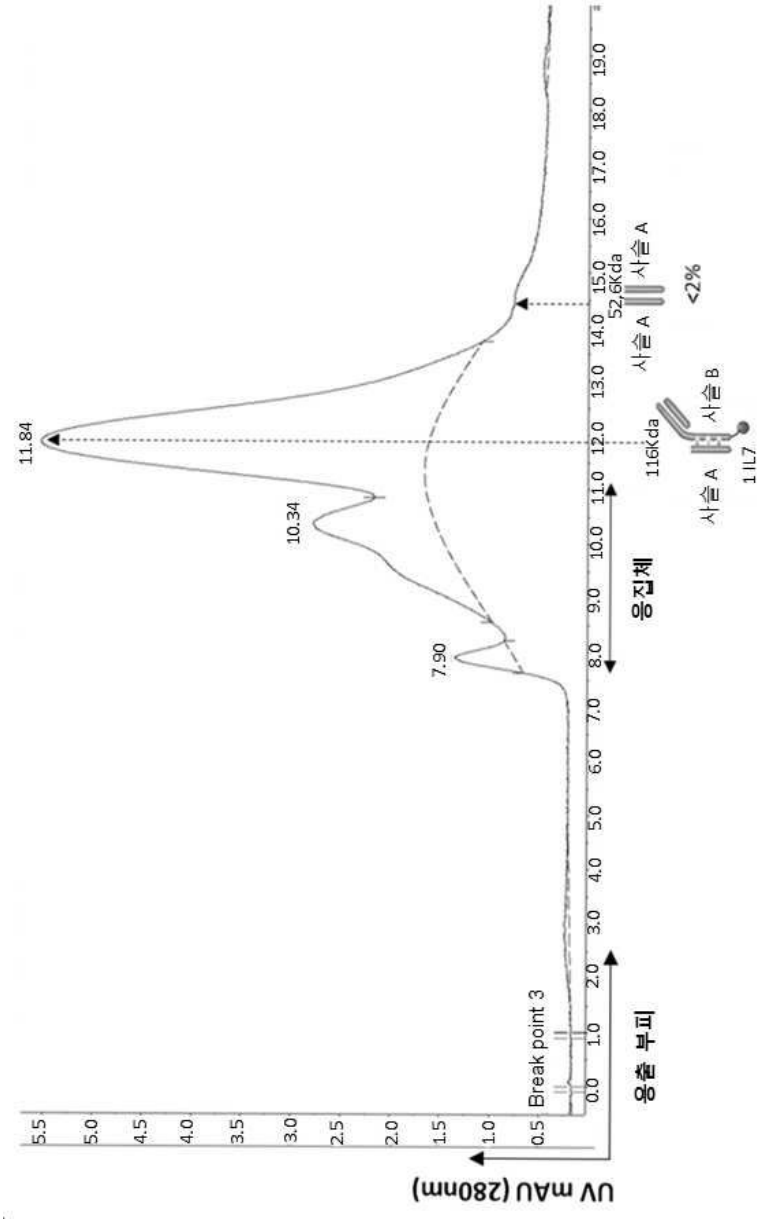
도면7


A
B
C
생산성 (mg/L)
배수 변화 생산성
PD-1*2 융합
PD-1*1 융합
IL2
IL15
IL21
IL7
PD-1*2/IL2*1
PD-1*1/IL2*1
PD-1*2/ IL15*1
PD-1*1/IL15*1
PD-1*2 /IL-21*1
PD-1*1/IL21*1
PD-1*2/IL7*1
PD-1*1/IL7*1

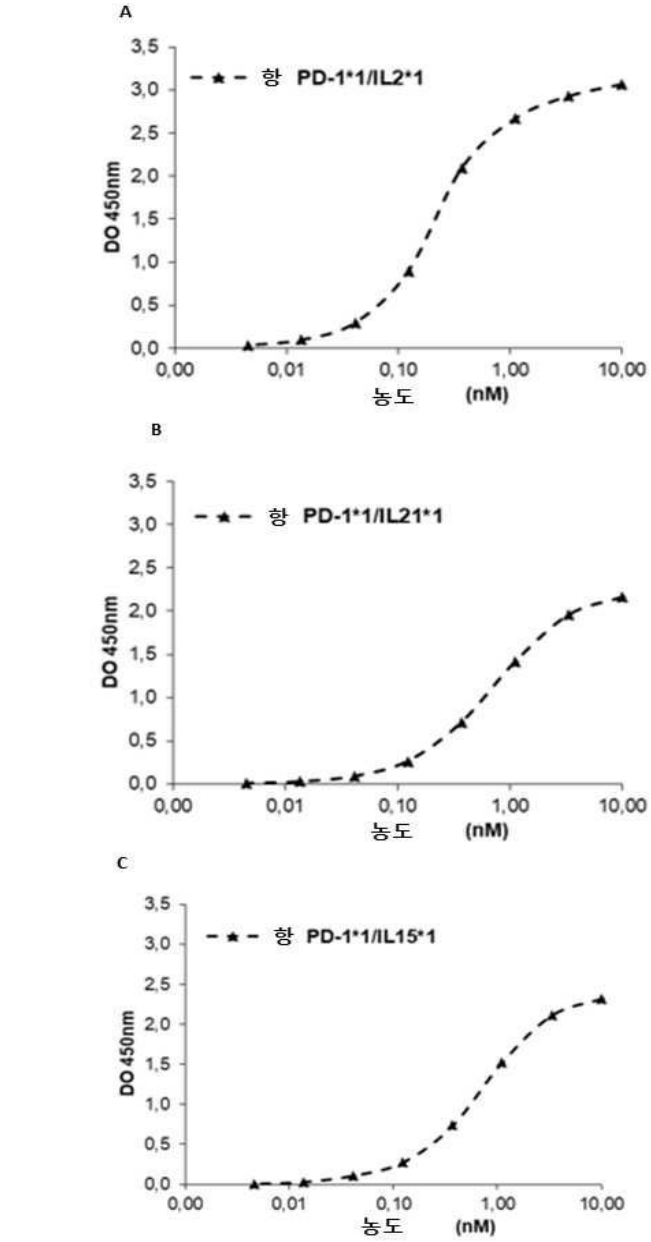
도면8a


UV mAU (280nm)
용출 부피
응집체
중단점 3
11.72
10.70
7.88
52.6Kda
116Kda
사슬 A
사슬 B
<2%
1 IL7

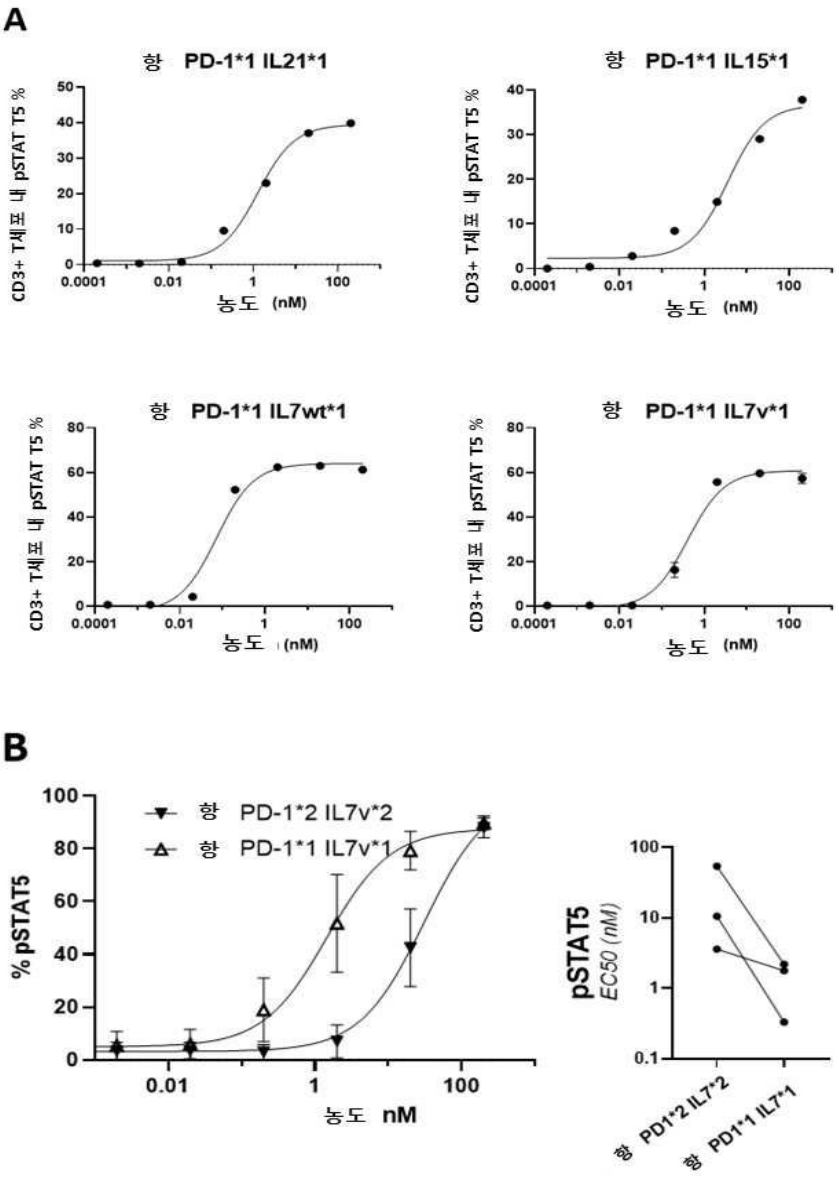
도면8b


UV mAU (280nm)
응출 부피
응집체
Break point 3
11.84
10.34
7.90
116kda
52.6Kda
사슬 A
사슬 B
<2%
1 IL7

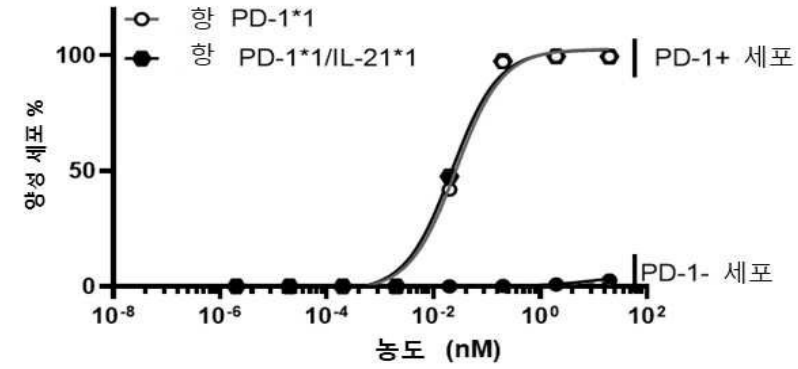
도면9

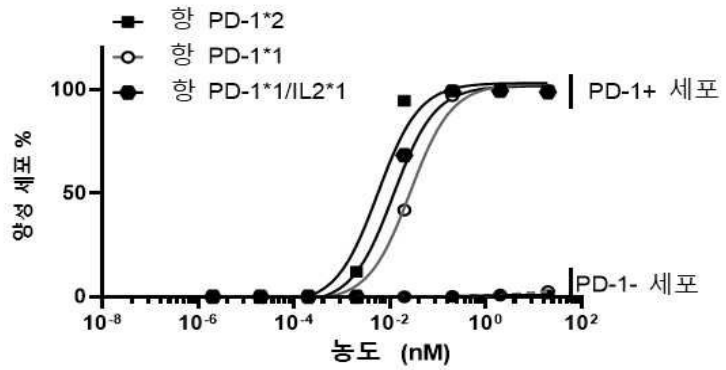

A
항 PD-1*1/IL2*1
DO 450nm
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,00
0,01
0,10
1,00
10,00
농도 (nM)
B
항 PD-1*1/IL21*1
DO 450nm
농도 (nM)
C
항 PD-1*1/IL15*1
DO 450nm
농도 (nM)

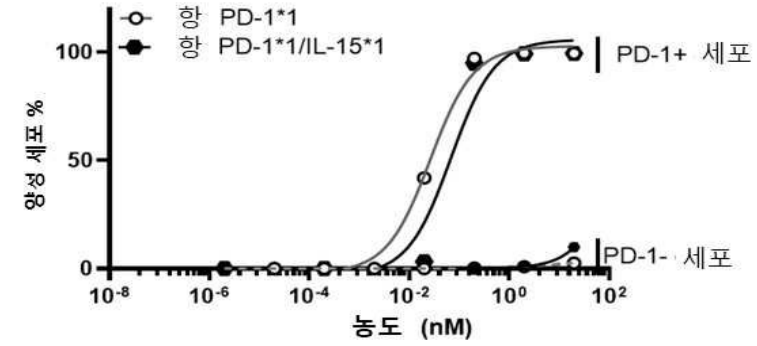
도면10


A
항 PD-1*1 IL21*1
항 PD-1*1 IL15*1
항 PD-1*1 IL7wt*1
항 PD-1*1 IL7v*1
CD3+ T세포 내 pSTAT T5 %
농도 (nM)
B
항 PD-1*2 IL7v*2
항 PD-1*1 IL7v*1
% pSTAT5
농도 nM
pSTAT5
EC50 (nM)
항 PD1*2 IL7*2
항 PD1*1 IL7*1

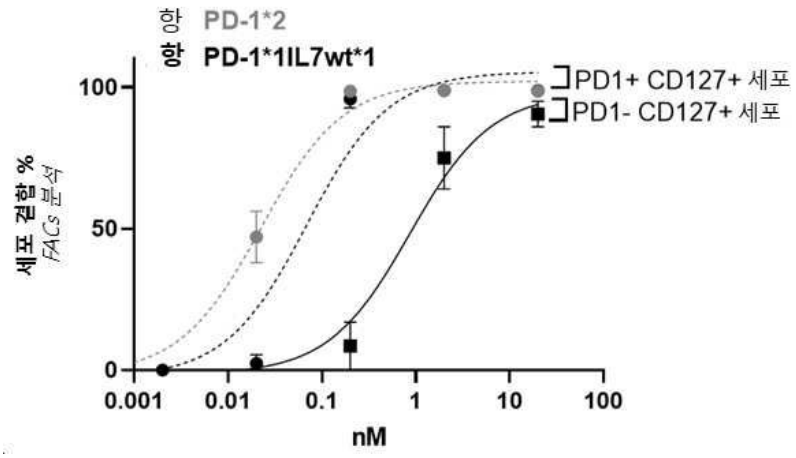
도면11a


항 PD-1*1
항 PD-1*1/IL-21*1
PD-1+ 세포
PD-1- 세포
양성 세포 %
100
50
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
농도 (nM)

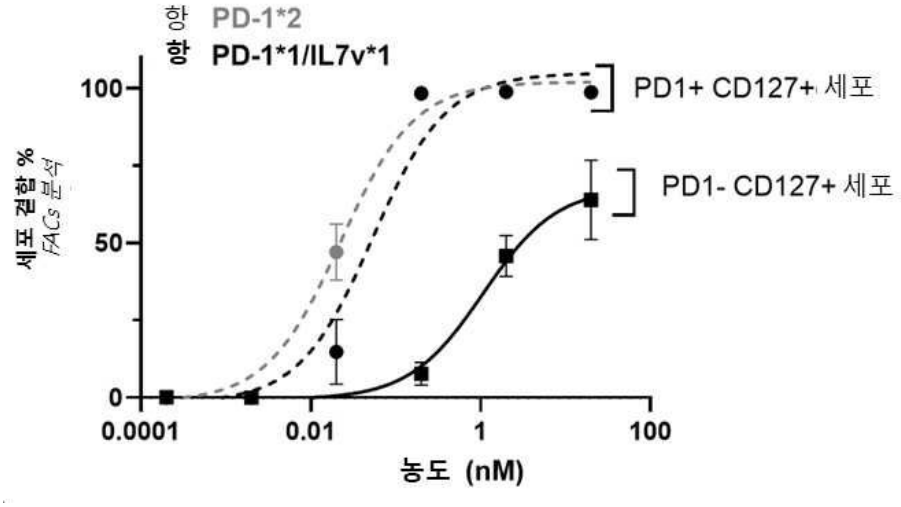

항 PD-1*2
항 PD-1*1
항 PD-1*1/IL2*1
PD-1+ 세포
PD-1- 세포
양성 세포 %
100
50
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
농도 (nM)


항 PD-1*1
항 PD-1*1/IL-15*1
PD-1+ 세포
PD-1- 세포
양성 세포 %
100
50
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
농도 (nM)

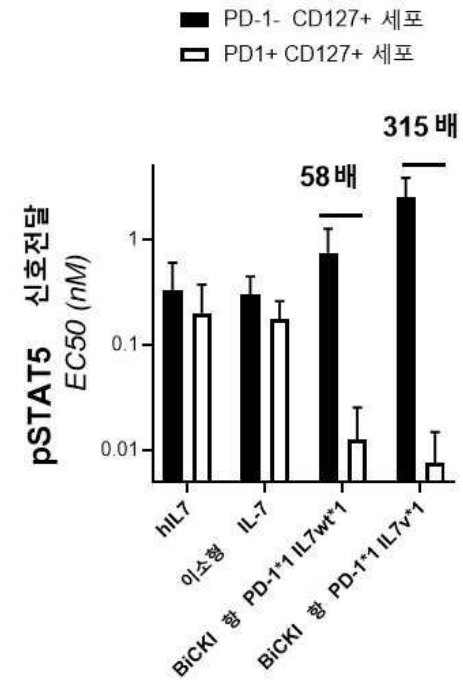
도면11b


항 PD-1*2
항 PD-1*1IL7wt*1
PD1+ CD127+ 세포
PD1- CD127+ 세포
세포 결합 %
FACs 분석
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM

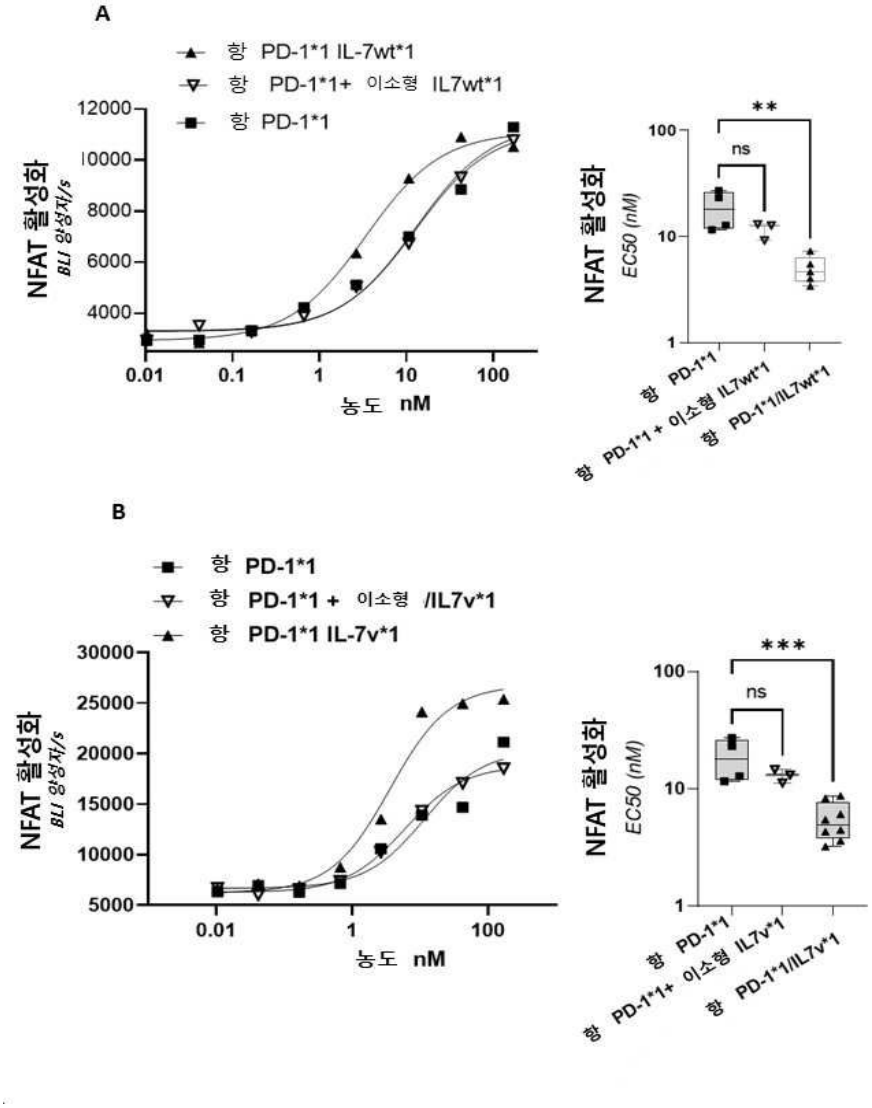
도면11c


항 PD-1*2
항 PD-1*1/IL7v*1
PD1+ CD127+ 세포
PD1- CD127+ 세포
세포 결합 %
FACs 분석
100
50
0
0.0001
0.01
1
100
농도 (nM)

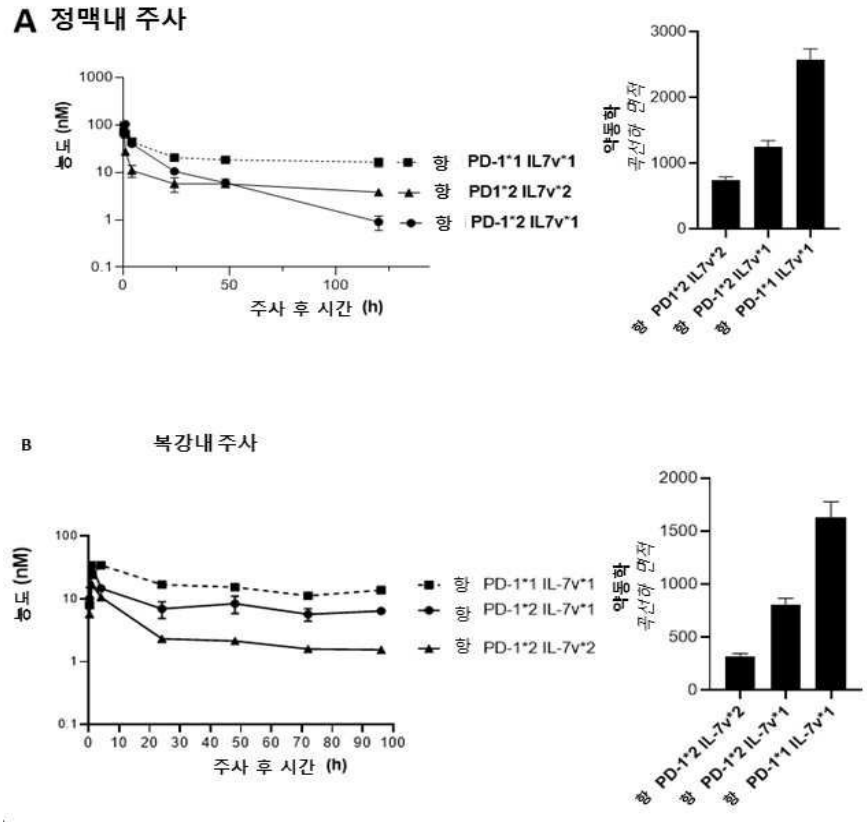
도면11d


PD-1- CD127+ 세포
PD1+ CD127+ 세포
315 배
58 배
pSTAT5 신호전달
EC50 (nM)
1
0.1
0.01
hIL7
이소형
IL-7
BiCKI 항 PD-1*1 IL7wt*1
BiCKI 항 PD-1*1 IL7v*1

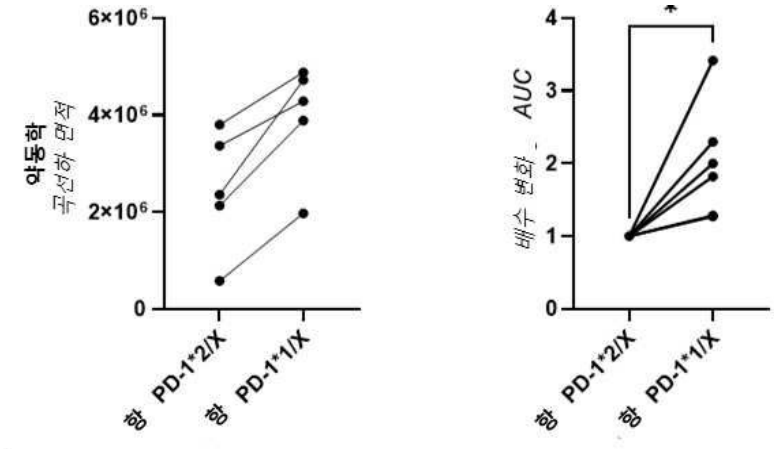
도면12


A
항 PD-1*1 IL-7wt*1
항 PD-1*1+ 이소형 IL7wt*1
항 PD-1*1
NFAT 활성화
BLI 양성자/s
농도 nM
NFAT 활성화
EC50 (nM)
**
ns
항 PD-1*1
항 PD-1*1 + 이소형 IL7wt*1
항 PD-1*1/IL7wt*1
B
항 PD-1*1
항 PD-1*1 + 이소형 /IL7v*1
항 PD-1*1 IL-7v*1
NFAT 활성화
BLI 양성자/s
농도 nM
NFAT 활성화
EC50 (nM)
***
ns
항 PD-1*1
항 PD-1*1+ 이소형 IL7v*1
항 PD-1*1/IL7v*1

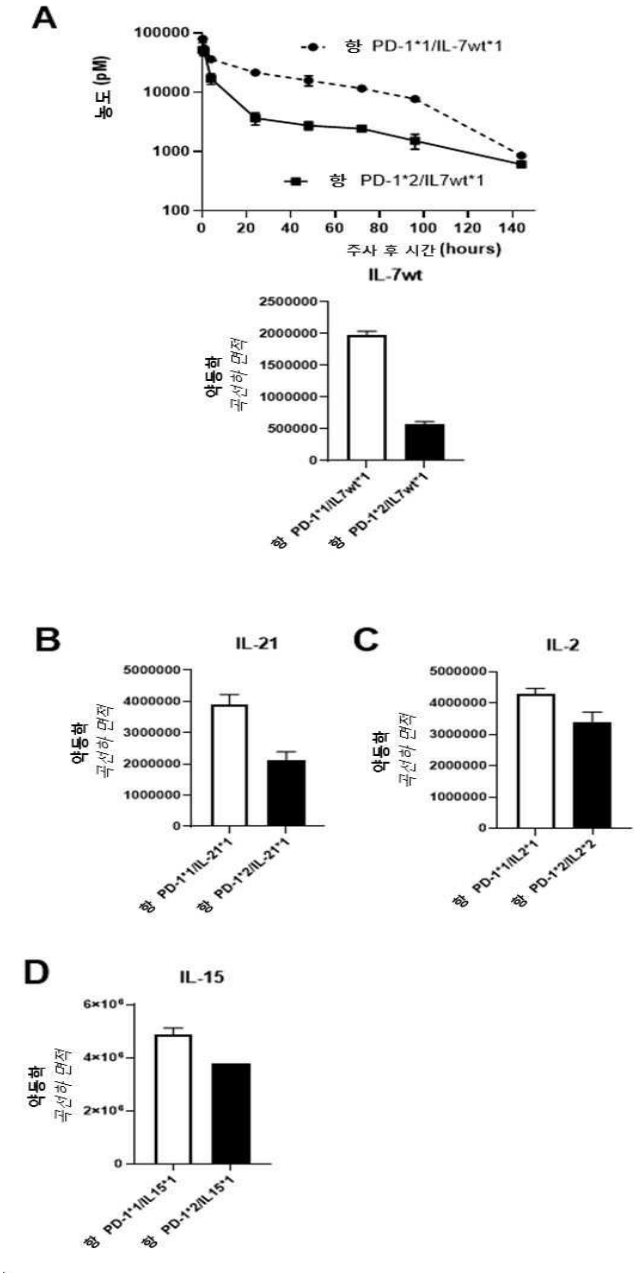
도면13


A 정맥내 주사
농도 (nM)
주사 후 시간 (h)
항 PD-1*1 IL7v*1
항 PD1*2 IL7v*2
항 PD-1*2 IL7v*1
약동학 곡선하 면적
항 PD1*2 IL7v*2
항 PD-1*2 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7v*1
B 복강내주사
농도 (nM)
주사 후 시간 (h)
항 PD-1*1 IL-7v*1
항 PD-1*2 IL-7v*1
항 PD-1*2 IL-7v*2
약동학 곡선하 면적
항 PD-1*2 IL-7v*2
항 PD-1*2 IL-7v*1
항 PD-1*1 IL-7v*1

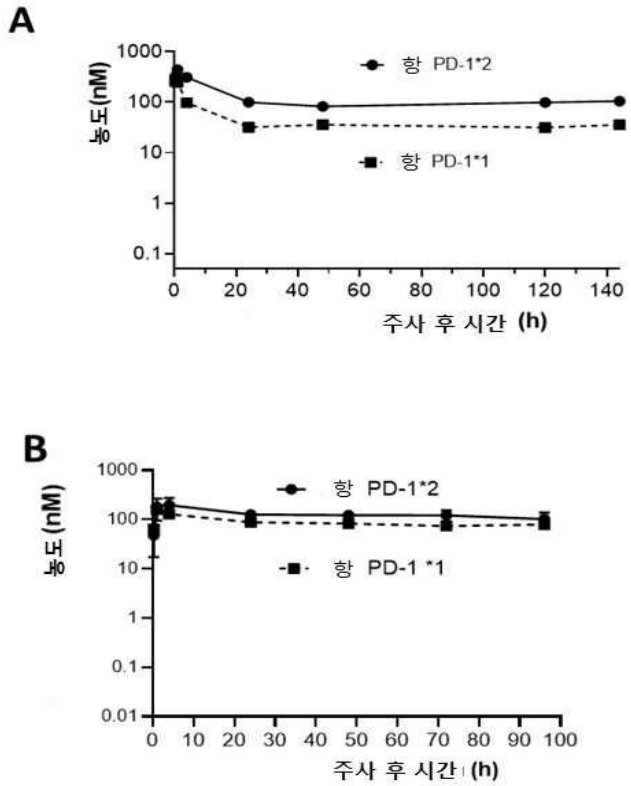
도면14


약동학 곡선하 면적
항 PD-1*2/X
항 PD-1*1/X
배수 변화 - AUC
항 PD-1*2/X
항 PD-1*1/X

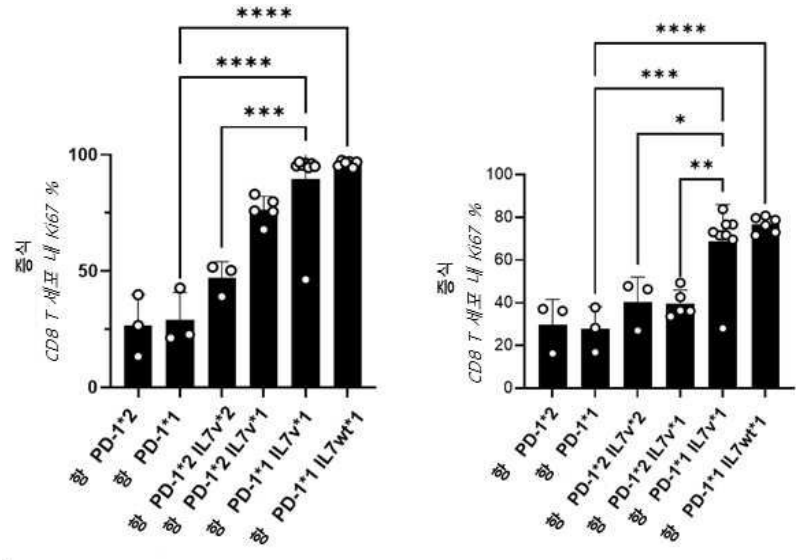
도면15


A
농도 (pM)
100000
10000
1000
100
0
20
40
60
80
100
120
140
주사 후 시간 (hours)
항 PD-1*1/IL-7wt*1
항 PD-1*2/IL7wt*1
IL-7wt
약동학 곡선하 면적
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
항 PD-1*1/IL7wt*1
항 PD-1*2/IL7wt*1
B
IL-21
약동학 곡선하 면적
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
항 PD-1*1/IL-21*1
항 PD-1*2/IL-21*1
C
IL-2
약동학 곡선하 면적
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
항 PD-1*1/IL2*1
항 PD-1*2/IL2*2
D
IL-15
약동학 곡선하 면적
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
항 PD-1*1/IL15*1
항 PD-1*2/IL15*1

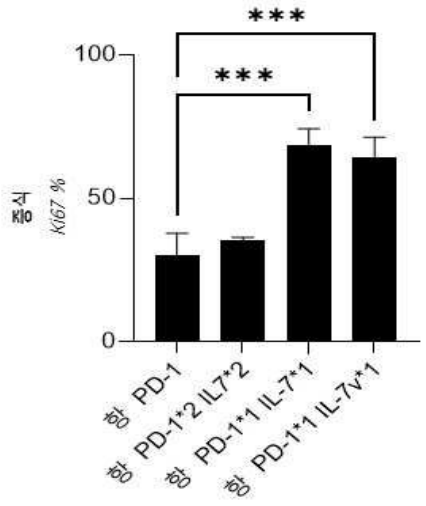
도면16


A
농도(nM)
1000
100
10
1
0.1
항 PD-1*2
항 PD-1*1
0
20
40
60
80
100
120
140
주사 후 시간 (h)
B
농도 (nM)
1000
100
10
1
0.1
0.01
항 PD-1*2
항 PD-1 *1
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
주사 후 시간 (h)

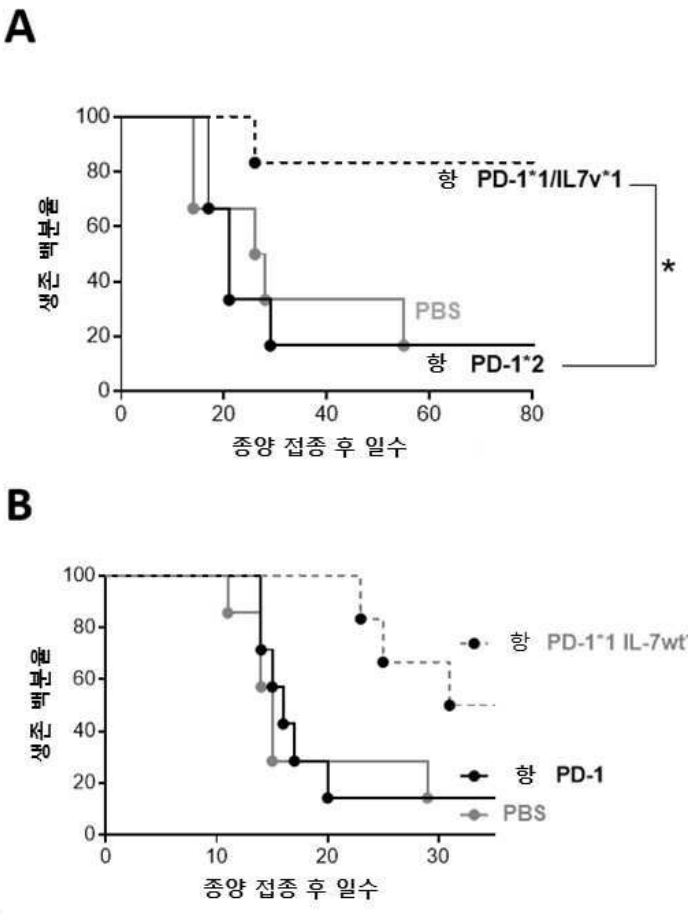
도면17a


CD8 T 세포 내 Ki67 %
****
****
***
100
50
0
항 PD-1*2
항 PD-1*1
항 PD-1*2 IL7v*2
항 PD-1*2 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7wt*1
CD8 T 세포 내 Ki67 %
****
***
*
**
100
80
60
40
20
0
항 PD-1*2
항 PD-1*1
항 PD-1*2 IL7v*2
항 PD-1*2 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7wt*1

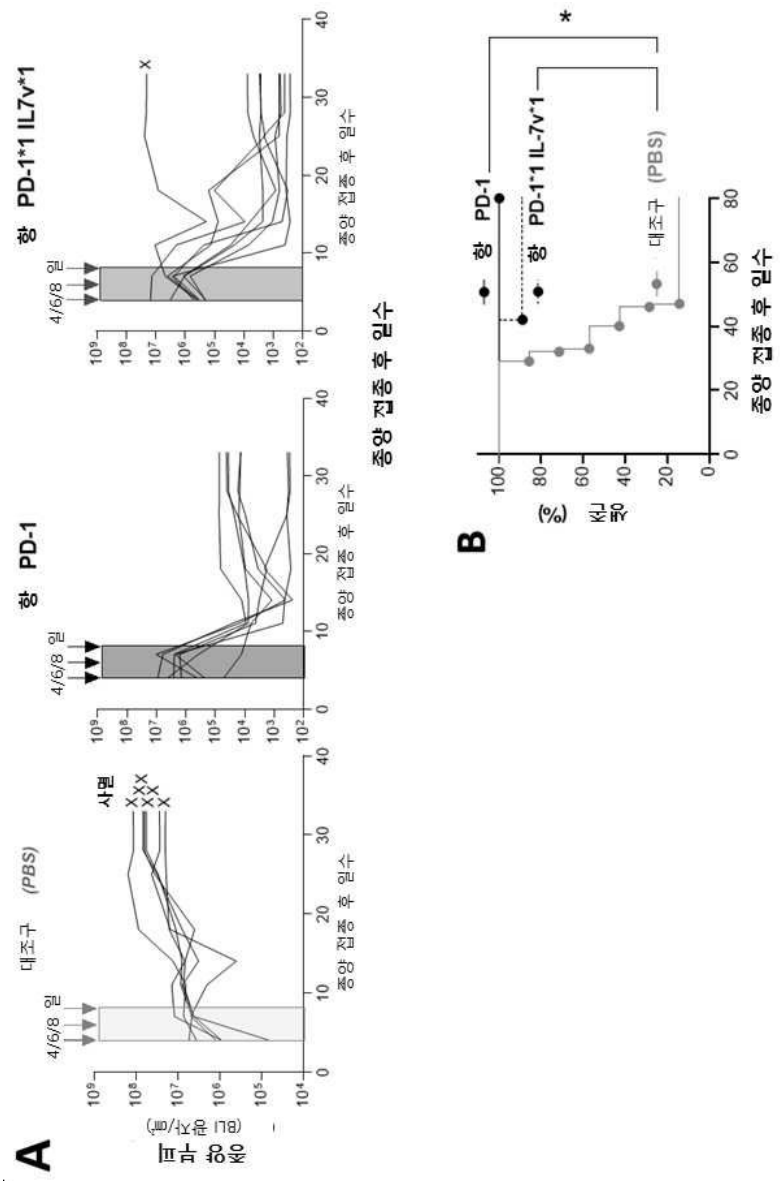
도면17b


***
***
100
50
0
증식
Ki67 %
항 PD-1
항 PD-1*2 IL7*2
항 PD-1*1 IL-7*1
항 PD-1*1 IL-7v*1

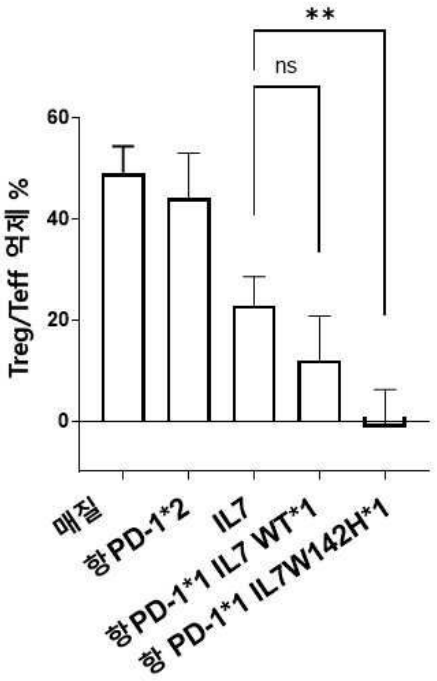
도면18


A
100
80
60
40
20
0
생존 백분율
항 PD-1*1/IL7v*1
PBS
항 PD-1*2
*
0
20
40
60
80
종양 접종 후 일수
B
100
80
60
40
20
0
생존 백분율
항 PD-1*1 IL-7wt*1
항 PD-1
PBS
0
10
20
30
종양 접종 후 일수

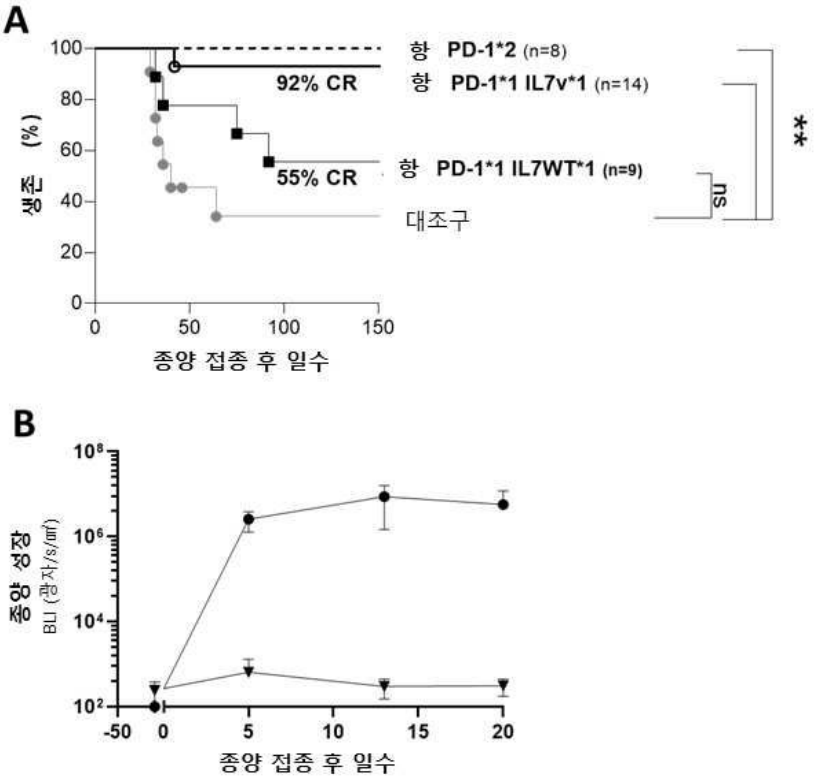
도면19


A
종양 부피
(BLI 광자/㎠)
대조구 (PBS)
4/6/8 일
사멸
항 PD-1
항 PD-1*1 IL7v*1
종양 접종 후 일수
B
항 PD-1
항 PD-1*1 IL-7v*1
대조구 (PBS)
생존 (%)
*
종양 접종 후 일수

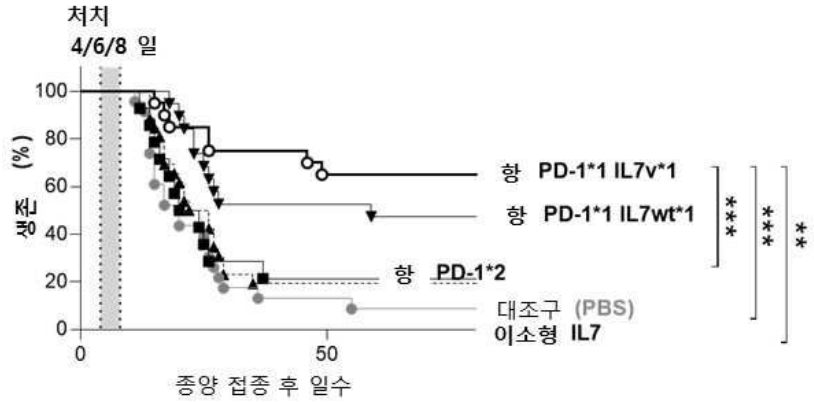
도면20


**
ns
60
40
20
0
Treg/Teff 억제 %
매질
항PD-1*2
IL7
항PD-1*1 IL7 WT*1
항 PD-1*1 IL7W142H*1

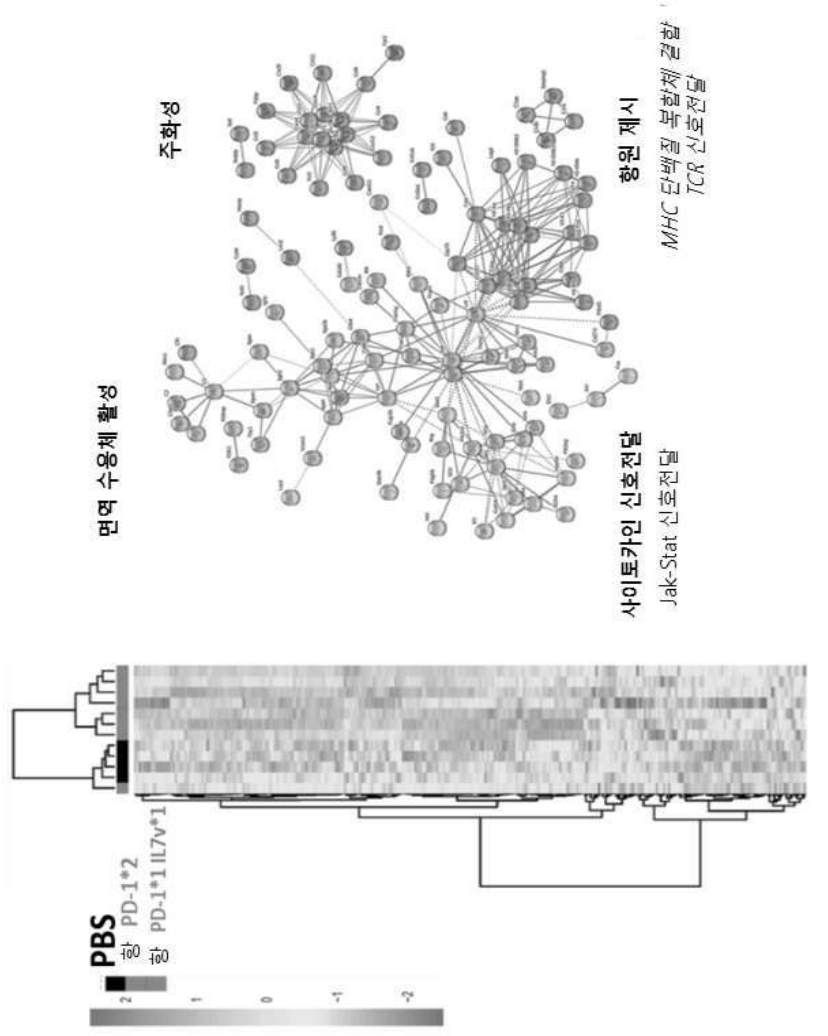
도면21


A
100
80
60
40
20
0
생존 (%)
0
50
100
150
종양 접종 후 일수
92% CR
55% CR
항 PD-1*2 (n=8)
항 PD-1*1 IL7v*1 (n=14)
항 PD-1*1 IL7WT*1 (n=9)
대조구
ns
**
B
종양 성장
BLI (광자/s/㎠)
-50
0
5
10
15
20
종양 접종 후 일수

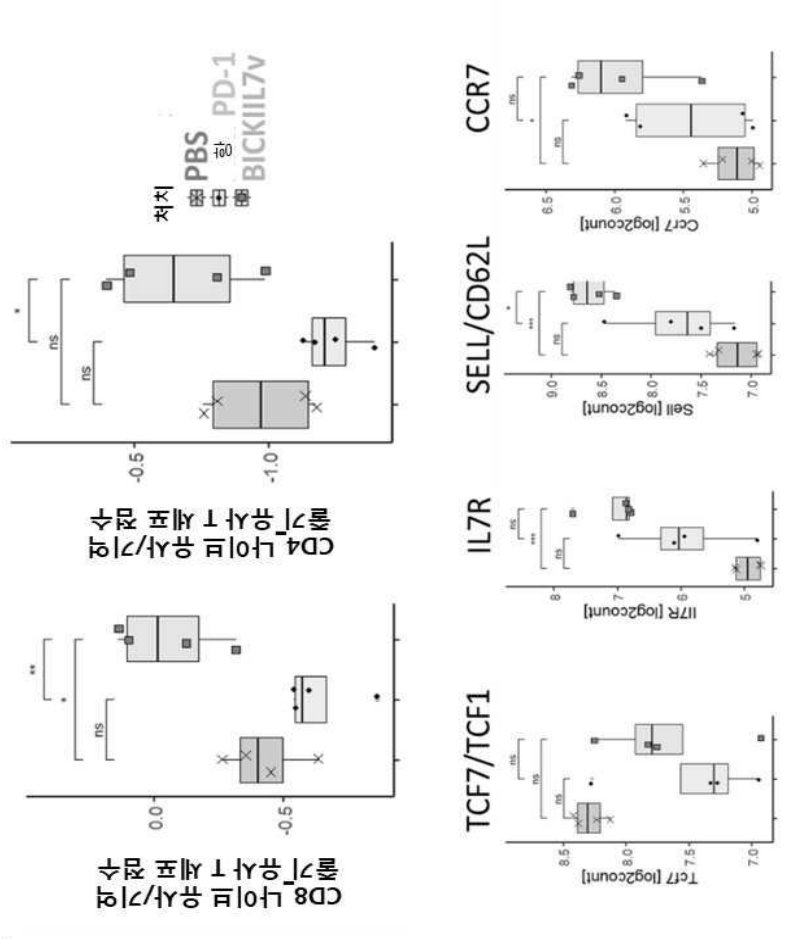
도면22


처치
4/6/8 일
100
80
60
40
20
0
생존 (%)
0
50
종양 접종 후 일수
항 PD-1*1 IL7v*1
항 PD-1*1 IL7wt*1
항 PD-1*2
대조구 (PBS)
이소형 IL7
***
***
**

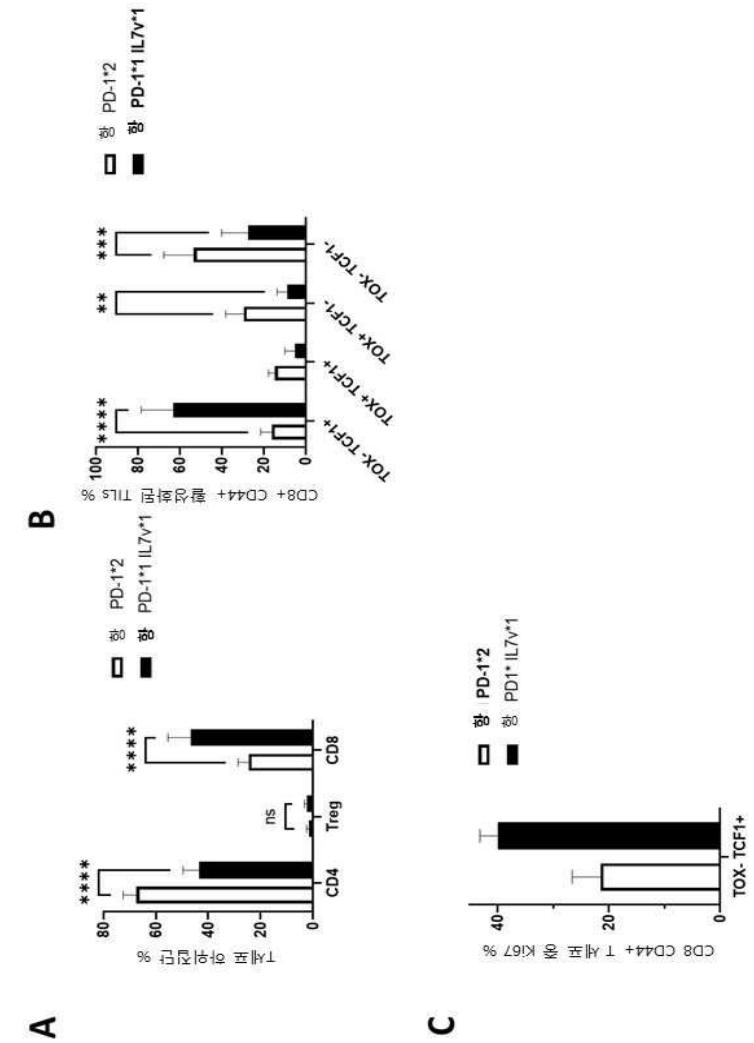
도면23a


주화성
면역 수용체 활성
항원 제시
MHC 단백질 복합체 결합
TCR 신호전달
사이토카인 신호전달
Jak-Stat 신호전달
PBS
PD-1*2
PD-1*1 IL7v*1

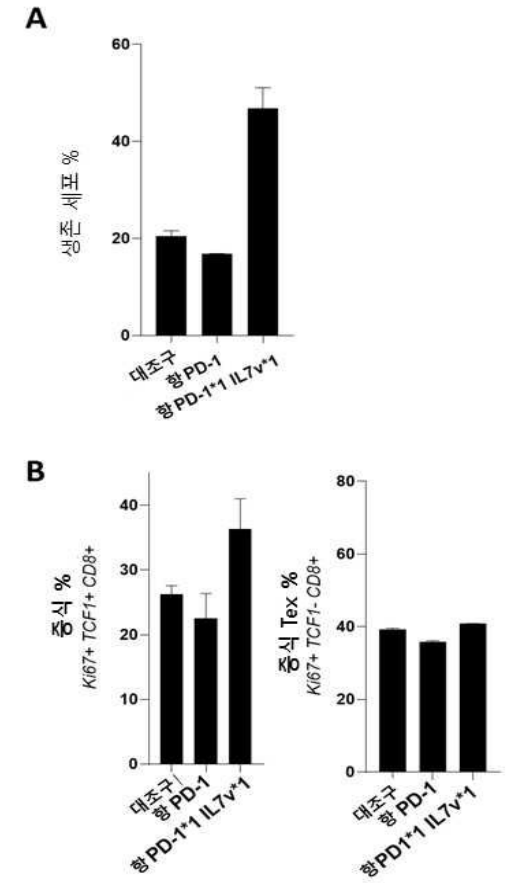
도면23b


처치
PBS
PD-1
BICKIIL7v
CD8 나이브 유사/기억
줄기_유사 T 세포 점수
CD4 나이브 유사/기억
줄기_유사 T 세포 점수
TCF7/TCF1
IL7R
SELL/CD62L
CCR7
Tcf7 [log2count]
Il7R [log2count]
Sell [log2count]
Ccr7 [log2count]

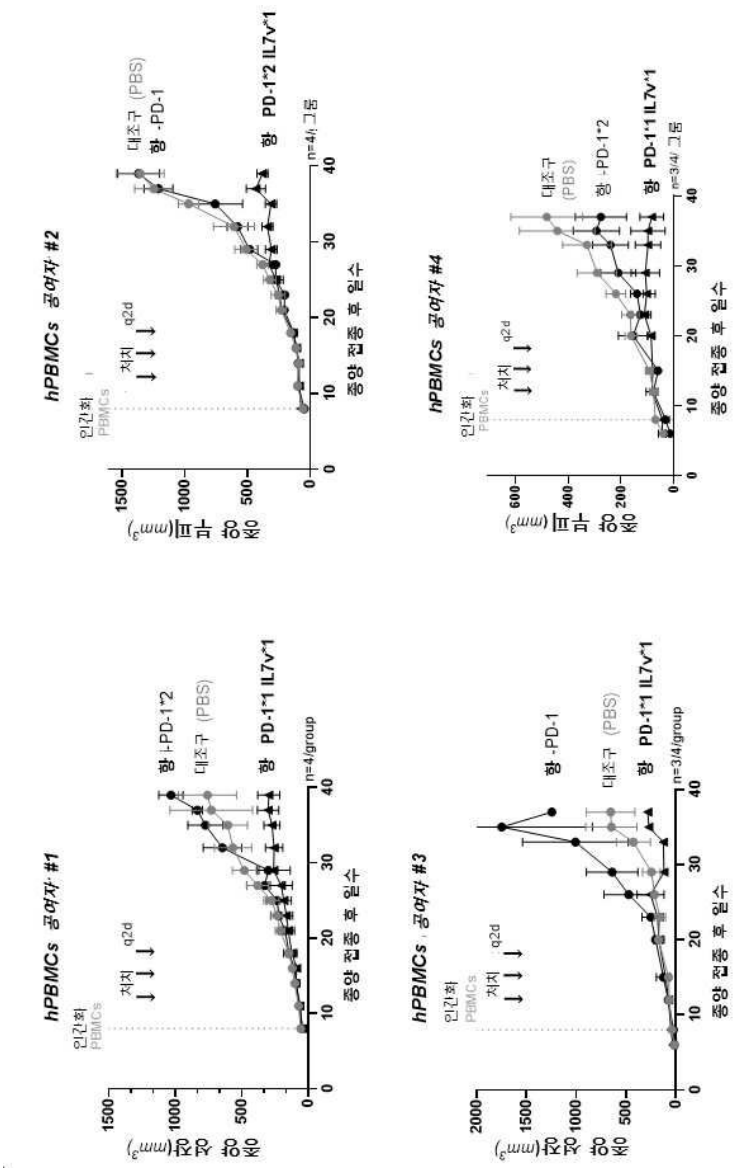
도면24


A
B
C
항 PD-1*2
항 PD-1*1 IL7v*1
T세포 하위집단 %
CD4
Treg
CD8
ns
****
CD8+ CD44+ 활성화된 TILs %
TOX- TCF1+
TOX+ TCF1+
TOX+ TCF1-
TOX- TCF1-
***
**
PD1+ IL7v*1
CD8 CD44+ T 세포 중 Ki67 %

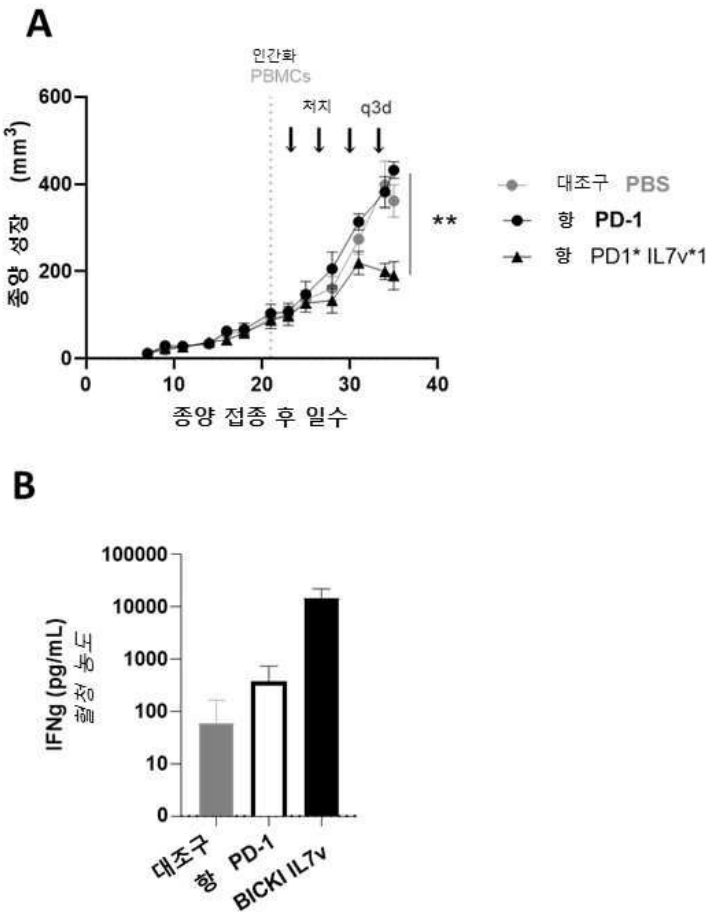
도면25


A
생존 세포 %
60
40
20
0
대조구
항 PD-1
항 PD-1*1 IL7v*1
B
증식 %
Ki67+ TCF1+ CD8+
40
30
20
10
0
대조구
항 PD-1
항 PD-1*1 IL7v*1
증식 Tex %
Ki67+ TCF1- CD8+
80
60
40
20
0
대조구
항 PD-1
항PD1*1 IL7v*1

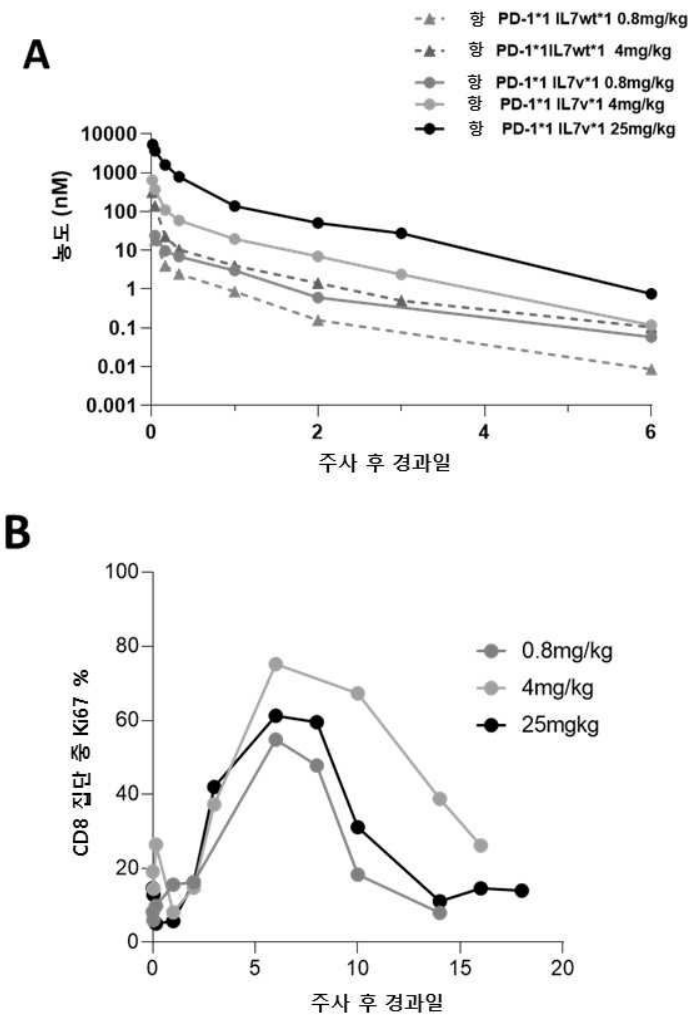
도면26


hPBMCs 공여자 #1
hPBMCs 공여자 #2
hPBMCs 공여자 #3
hPBMCs 공여자 #4
인간화 PBMCs
처치 q2d
대조구 (PBS)
항 -PD-1
항 -PD-1*2
항 PD-1*1 IL7v*1
항 PD-1*2 IL7v*1
n=4/group
n=3/4/ 그룹
종양 부피(mm³)
종양 전종 후 일수

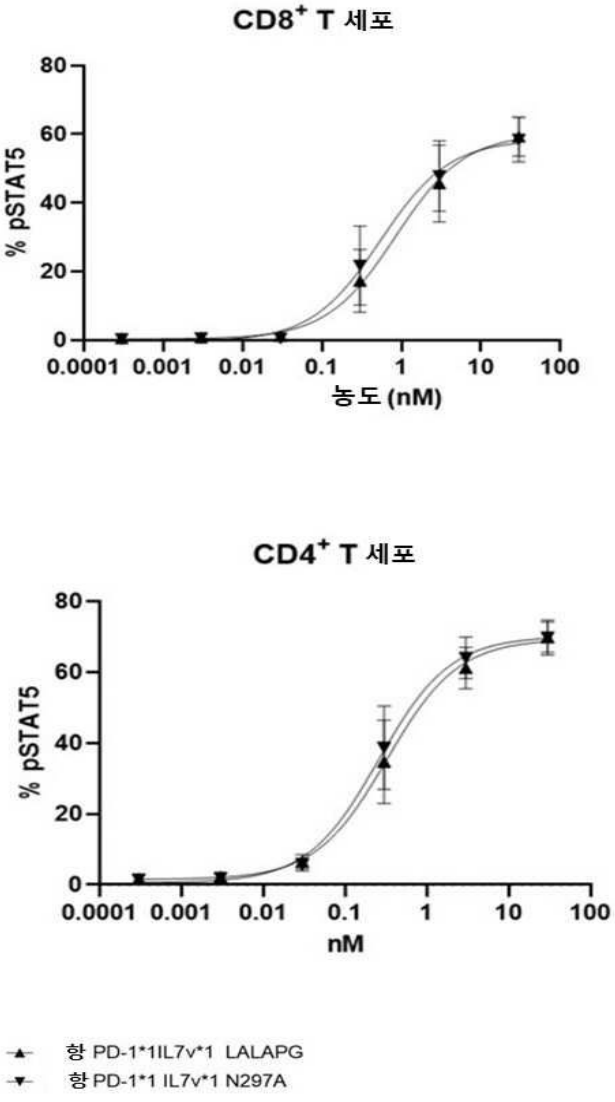
도면27


A
인간화
PBMCs
저지
q3d
600
400
200
0
종양 성장 (mm3)
0
10
20
30
40
종양 접종 후 일수
**
대조구 PBS
항 PD-1
항 PD1* IL7v*1
B
100000
10000
1000
100
10
0
IFNg (pg/mL)
혈청 농도
대조구
항 PD-1
BICKI IL7v

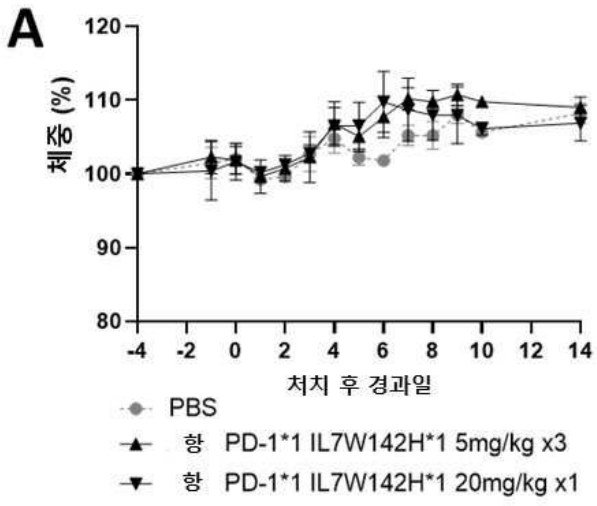
도면28


A
항 PD-1*1 IL7wt*1 0.8mg/kg
항 PD-1*1IL7wt*1 4mg/kg
항 PD-1*1 IL7v*1 0.8mg/kg
항 PD-1*1 IL7v*1 4mg/kg
항 PD-1*1 IL7v*1 25mg/kg
농도 (nM)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
2
4
6
주사 후 경과일
B
CD8 집단 중 Ki67 %
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
주사 후 경과일
0.8mg/kg
4mg/kg
25mgkg

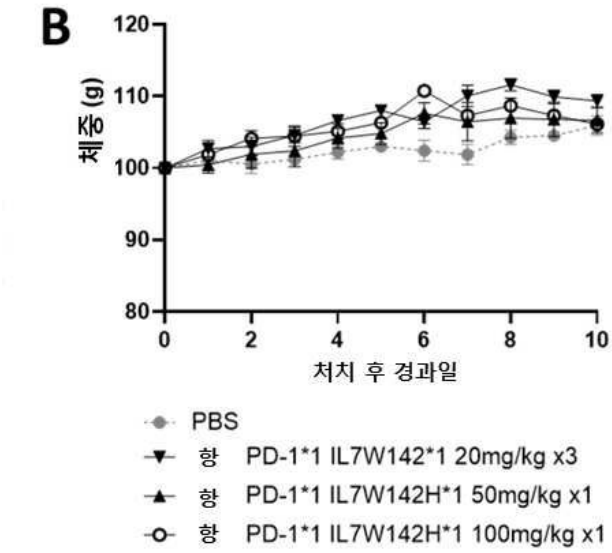
도면29


CD8+ T 세포
% pSTAT5
농도 (nM)
CD4+ T 세포
% pSTAT5
nM
항 PD-1*1IL7v*1 LALAPG
항 PD-1*1 IL7v*1 N297A

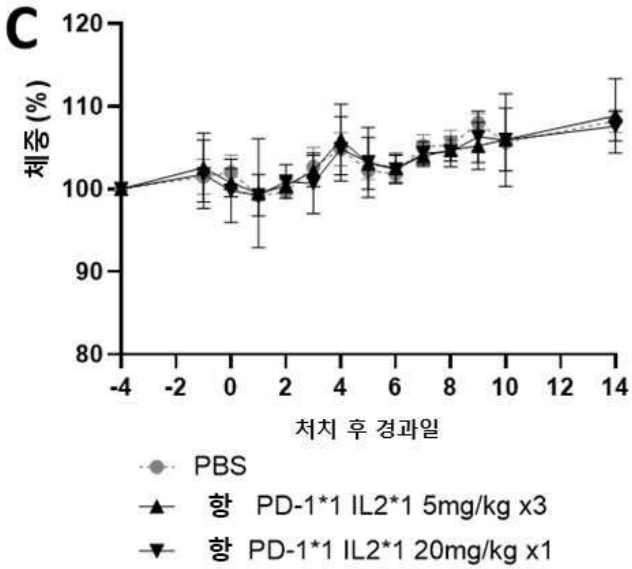
도면30a


A
체중 (%)
처치 후 경과일
PBS
항 PD-1*1 IL7W142H*1 5mg/kg x3
항 PD-1*1 IL7W142H*1 20mg/kg x1

도면30b



도면30c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> NEW SCAFFOLD FOR BIFUNCTIONAL MOLECULES WITH IMPROVED PROPERTIES

<130> B3520PC

<160> 93

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7

<400> 1

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-SS1

<400> 2

Asp Ser Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30
Asn Ser Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95
Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Ser Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Ser Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 3
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> IL7-SS2
<400> 3
Asp Ser Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Ser Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60
Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Ser Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Ser Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 4
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial

<220><223> IL7-SS3
<400> 4
Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30
Asn Ser Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Ser Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Ser Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Ser Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 5
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> IL7-W142H
<400> 5

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60
Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 6

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-W142Y

<400> 6

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Tyr Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-W142F

<400> 7

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Phe Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 8

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-Q11E

<400> 8

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Glu Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95
Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 9
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> IL7-Y12F
<400> 9

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Phe Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60
Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 10
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial

<220><223> IL7-M17L
<400> 10
Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Leu Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30
Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95
Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu

115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 11
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> IL7-Q22E
<400> 11

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Glu Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60
Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 12

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-D74E

<400> 12

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Glu Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 13

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7-D74Q

<400> 13

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu

1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg

50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Gln Phe Asp Leu His Leu Leu

65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val

85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser

100 105 110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu

115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys

130 135 140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

145 150

<210> 14

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IL7-D74N

<400> 14

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu

1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg

50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asn Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95
Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 15
<211> 152
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> IL7-K81R
<400> 15

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45
Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60
Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80
Arg Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220><223> LC CDR3
<400> 16
Phe Gln Gly Thr His Val Pro Asn Thr
1 5

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC variable domain
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> X is X1, D or E
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> X is X2, and is T, H, A, Y, N, E or S
<400> 17
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 18

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 19

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 20

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 21

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 22

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC variable domain

<400> 23

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC variable domain
<400> 24
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 117
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC variable domain
<400> 25

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> LC variable domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> X is G or T

<400> 26

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30

Asn Xaa Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC variable domain

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> LC variable domain
<400> 28
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30
Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95
Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 444
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC
<400> 29

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 30

<211> 444

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 31
<211> 444
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC
<400> 31
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 32

<211> 444

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC

<400> 32

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC

<400>

33

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 34
<211
> 444
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC
<400> 34
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 35

<211> 444

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC

<400> 35

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

```
            20                  25                  30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
    50                  55                  60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
    210                 215                 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225                 230                 235                 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                245                 250                 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
            260                 265                 270
```

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 36
<211> 444
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC
<400> 36
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 37

<211> 219

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC

<400> 37

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 38
<211> 219

<212> PRT
<213> artificial
<220><223> LC
<400> 38
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30

Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 39

<211> 327

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC constant domain

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC contant domain

<400> 40

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 41

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HFR1

<400> 41

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HFR2

<400> 42

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HFR3

<400> 43

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HFR4

<400> 44

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LFR1

<400> 45

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LFR2

<400> 46

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LFR3

<400> 47

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LFR4

<400> 48

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> signal peptide

<400> 49

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1 5 10 15

Ile Gln Ala

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> signal peptide

<400> 50

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR1

<400> 51

His Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 52

<211> 330

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Heavy chain constant domain (IgG1m-N298A)

<400> 52

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC CDR2
<400> 53
Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15
Gly

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> HC CDR3
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)

<223> X is X1 (D or E)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X is X2 and is T, H, A, Y, N, E or S

<400> 54

Glu Arg Glu Pro Gly Met Xaa Xaa

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 55

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 56

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 57

Glu Arg Glu Pro Gly Met Glu Ser

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 58

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp His

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 59

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ala

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 60

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Tyr

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 61

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3

<400> 62

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC CDR1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X is G or T

<400> 63

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala Asn Xaa Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC CDR1

<400> 64

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC CDR1

<400> 65

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC CDR2

<400> 66

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker C

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker G4S

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker (G4S)2

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> linker (G4S)3

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 444

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC anti-PD1 chimeric

<400> 71

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ala Ala Phe

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 72

<211> 219

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> LC anti-PD1 chimeric

<400> 72

Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ala

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 73

<211> 2670

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> VH-VK

<400> 73

cagatccagc tggtgcagag cggctctgag ctgaagaagc caggcgcttc tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaca cactatgcta tgaattgggt gagacaggct 120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctgg atcaacacca atacaggcga gcctacctac 180

gctcagggct ttacaggccg cttcgtgttt tctctggata cctccgtgag cacagcctat 240

ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac accgccgtgt actattgtgc tagggagagg 300

gagccaggaa tggataactg gggacagggc accctggtga cagtgtcttc cgctagcacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 660

cccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc 720

cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 900

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1320

tctccgggta aatgacagat ccagctggtg cagagcggct ctgagctgaa gaagccaggc 1380

gcttctgtga aggtgtcctg caaggccagc ggctacacct tcacacacta tgctatgaat 1440

tgggtgagac aggctccagg acagggactg gagtggatgg gctggatcaa caccaataca 1500

ggcgagccta cctacgctca gggctttaca ggccgcttcg tgttttctct ggatacctcc 1560

gtgagcacag cctatctgca gatctccagc ctgaaggctg aggacaccgc cgtgtactat 1620

tgtgctaggg agagggagcc aggaatggat aactggggac agggcaccct ggtgacagtg 1680

tcttccgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg cgccctgctc caggagcacc 1740

tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 1800

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 1860

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 1920

aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 1980

gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca 2040

tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 2100

gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 2160

gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 2220

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 2280

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 2340

gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 2400

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 2460

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 2520

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 2580

gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 2640

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2670

<210> 74

<211> 660

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> VL-VD

<400> 74

gacgtggtca tgacacagag cccactgtct ctgcctgtga ccctgggaca gccagcctct 60

atctcctgca gatccagcca gtctctggtg cacgctaaca ccaatacata cctggagtgg 120

tatcagcaga ggccaggaca gtccccaagg ctgctgatct acaaggtgtc caacagattc 180

agcggagtgc cagaccgctt tagcggatct ggatccggaa ccgacttcac cctgaagatc 240

tccagggtgg aggctgagga tgtgggcgtg tactattgtt tccagggcac ccatgtgcct 300

aatacatttg gccagggcac caagctggag atcaagcgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 75

<211> 227

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> KIH-FcG1m (Knob)

<400> 75

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 76

<211> 394

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> KIH-FcG1m-(G4S)3-W142H (Knob)

<400> 76

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225 230 235 240

Gly Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser

245 250 255

Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile

260 265 270

Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile

275 280 285

Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys

290 295 300

Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His

305 310 315 320

Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly

325 330 335

Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr

340 345 350

Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn

355 360 365

Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His

370 375 380

Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

385 390

<210> 77

<211> 227

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> KIH-FcG1m (Hole)

<400> 77

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 78

<211> 394

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> KIH-FcGlm-(G4S)3-W142H (Hole)

<400> 78

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125
Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240
Gly Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser
245 250 255
Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile
260 265 270

Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile
275 280 285
Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys
290 295 300
Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His
305 310 315 320
Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly
325 330 335

Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr

340 345 350

Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn

355 360 365

Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His

370 375 380

Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

385 390

<210> 79

<211> 220

<212

> PRT

<213> artificial

<220><223> Anti-PD-1-CH1

<400> 79

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

<210> 80

<211> 219

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Anti-PD-1-CL

<400> 80

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala

20 25 30

Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 81
<211> 447
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Anti-PD-1-CH1-KIH-FcG1m (Knob)
<400> 81
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 82

<211> 614

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Anti-PD-1-CH1-KIH-FcG1m-(G4S)3-W142H (Knob)

<400> 82

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Cys
450 455 460
Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val

465 470 475 480
Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys
485 490 495
Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn
500 505 510
Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe
515 520 525
Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val

530 535 540
Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly
545 550 555 560
Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu
565 570 575
Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe
580 585 590
Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His Asn Lys Ile Leu

595 600 605
Met Gly Thr Lys Glu His

610

<210> 83

<211> 614

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Anti-PD-1-CH1-KIH-FcGlm-(G4S)3-W142H (Hole)

<400> 83

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Cys
450 455 460
Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val
465 470 475 480

Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys
485 490 495
Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn
500 505 510
Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe
515 520 525
Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val
530 535 540

Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly
545 550 555 560
Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu
565 570 575
Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe
580 585 590
Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His Asn Lys Ile Leu
595 600 605

Met Gly Thr Lys Glu His
610

<210> 84
<211> 595
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Anti-PD-1-CH1-KIH-FcGlm-(G4S)3-IL2 (Hole)
<400> 84
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro

450 455 460

Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu

465 470 475 480

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro

485 490 495

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala

500 505 510

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu

515 520 525

Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
530 535 540
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
545 550 555 560

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
565 570 575
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
580 585 590
Thr Leu Thr
595

<210> 85
<211> 576
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> anti-PD-1-CH1-KIH-FcGlm-(G4S)3-IL15 (Hole)
<400> 85
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp
450 455 460

Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser
465 470 475 480

Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser
485 490 495

Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile
500 505 510

Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu
515 520 525

Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu
530 535 540

Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu
545 550 555 560

Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
565 570 575

<210> 86

<211> 600

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> anti-PD-1-CH1-KIH-FcGlm-(G4S)3-IL21 (Hole)

<400> 86

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Lys
450 455 460

Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu
465 470 475 480

Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro
485 490 495

Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser
500 505 510

Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly
515 520 525

Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys
530 535 540

Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys
545 550 555 560

Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu
565 570 575

Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser
580 585 590

Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
595 600

<210> 87

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 88
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 88
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110
Thr Ser

<210> 89
<211> 138
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89
His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg

1 5 10 15

Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu

20 25 30

Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu

35 40 45

Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn

50 55 60

Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys

65 70 75 80

Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu

85 90 95

Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe

100 105 110

Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu

115 120 125

Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser

130 135

<210> 90

<211> 447

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> anti-PD-1-CH1-KIH-FcG1m (Hole)

<400> 90

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 91
<211> 614
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> anti-PD-1+CH1 IL7wt
<400> 91
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Cys

450 455 460

Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val

465 470 475 480

Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys

485 490 495

Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn

500 505 510

Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe

515 520 525

Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val

530 535 540

Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly

545 550 555 560

Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu

565 570 575

Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe

580 585 590

Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu

595 600 605

Met Gly Thr Lys Glu His

610

<210> 92

<211> 614

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> anti-PD-1+CH1 IL7 W142H

<400> 92

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Cys

450 455 460

Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val

465 470 475 480

Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys

485 490 495

Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn

500 505 510

Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe

515 520 525

Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val

530 535 540

Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly

545 550 555 560

Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu

565 570 575

Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe

580 585 590

Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys His Asn Lys Ile Leu

595 600 605

Met Gly Thr Lys Glu His

610

<210> 93

<211> 614

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> anti-PD-1-CH1-KIH-FcG1mIL7WT (Hole)

<400> 93

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Cys

450 455 460

Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val

465 470 475 480

Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys

485 490 495

Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn

500 505 510

Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe

515 520 525

Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val

530 535 540

Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly

545 550 555 560

Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu

565 570 575

Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe

580 585 590

Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu

595 600 605

Met Gly Thr Lys Glu His

610