(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0041379
(43) 공개일자 2024년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/395* (2020.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6813 (2017.08)
A61K 31/5545 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-7004634
(22) 출원일자(국제) 2022년07월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월07일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2022/056361
(87) 국제공개번호 WO 2023/281479
국제공개일자 2023년01월12일
(30) 우선권주장
63/219,981 2021년07월09일 미국(US)
63/219,989 2021년07월09일 미국(US)

(71) 출원인
브라이트 피크 테라퓨틱스 아게
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
(72) 발명자
파타비라만 비자야 라그하반
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
크레프트 베르톨트
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

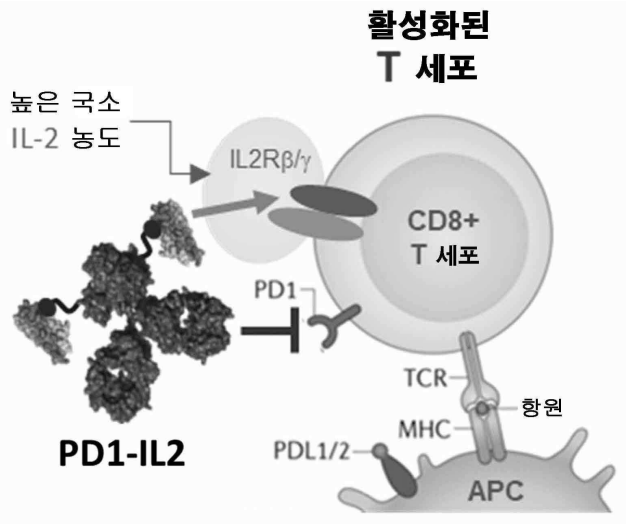
전체 청구항 수 : 총 103 항

(54) 발명의 명칭 **IL-2에 접합된 체크포인트 억제제 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 변형된 항-PD-1 폴리펩티드, 변형된 항-PD-1 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물, 항-PD-1 폴리펩티드를 제조하는 방법, 및 질환의 치료를 위해 상기 변형된 항-PD-1 폴리펩티드를 사용하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 개시내용은 변형된 항-PD-1 폴리펩티드를 사용하여 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
(72) 발명자
캐럴롯 장 필립
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
알바레스 산체스 루벤
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
뮐러 마갈리
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191
아레발로 루이즈 마틸데
스위스 4057 바젤 클라이벡슈트라쎄 191

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드;

변형된 IL-2 폴리펩티드; 및

링커

를 포함하는 조성물로서, 상기 링커가

변형된 IL-2 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제1 부착점; 및

PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점

을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드;

변형된 IL-2 폴리펩티드; 및

링커

를 포함하는 조성물로서, 상기 링커가

변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제1 부착점; 및

PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제2 부착점

을 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드;

변형된 IL-2 폴리펩티드; 및

링커

를 포함하는 조성물로서, 상기 링커가 화학적 링커이고, 상기 링커가

변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제1 부착점; 및

PD-L1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점

을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 부착점이 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 30 내지 110의 영역 내의 잔기에 존재하고, 이때 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 부착점이 아미노산 잔기 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에 존재하고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 부착점이 아미노산 잔기 42 또는 45에 존재하고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 7

제2항 또는 제3항에 있어서, 제1 부착점이 아미노산 잔기 F42Y 또는 Y45에 존재하거나, N-말단 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, IL-2 폴리펩티드가 그에 공유결합된 비-링커 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편인 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 Fc 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제9항 또는 제11항에 있어서, 제2 부착점이 Fc 영역 내의 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 13

제9항, 제11항 및 제12항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역이 서열번호 105의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 부착점이 서열번호 105의 아미노산 잔기 25 내지 105로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 제2 부착점이 (a) 서열번호 105의 위치 25 내지 35의 아미노산 잔기, (b) 서열번호 105의 위치 70 내지 80의 아미노산 잔기, 또는 (c) 서열번호 105의 위치 95 내지 105의 아미노산 잔기인 조성물.

청구항 16

제9항 및 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 부착점 위치가 K248 아미노산 잔기, K288 아미노산 잔기, K317 아미노산 잔기 또는 이들의 조합의 위치(Eu 넘버링)의 Fc 영역에 존재하는 것인 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 제2 부착점이 K248 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 단일클론 항체, 인간화 항체, 이식 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 탈면역화 항체 또는 이중특이적 항체인 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 항원 결합 단편이고, 이때 항원 결합 단편이 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 이중특이적 $F(ab')_2$, 삼중특이적 $F(ab')_2$, 가변 단편(Fv), 단일 쇄 가변 단편(scFv), dsFv, 이중특이적 scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, AVIMER®, 미니바디, 디아바디, 이중특이적 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 맥시바디, 카멜리드(camelid), VHH, 미니바디, 인트라바디, 항체 부분(도메인 항체)을 포함하는 융합 단백질, 단일 쇄 결합 폴리펩티드, scFv-Fc, Fab-Fc, 이중특이적 T 세포 인게이저(engager)(BiTE), 4가 탠덤 디아바디(TandAb), 이중 친화성 재표적화 항체(DART), 이중특이적 항체(bscAb), 단일 도메인 항체(sdAb), 융합 단백질, 또는 이중특이적 디설파이드 안정화 Fv 항체 단편(dsFv-dsFv')을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD를 포함하거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 IgG를 포함하고, 이때 IgG가 IgG1 또는 IgG4이거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 티슬레리주맙(Tislelizumab), 바이지안(Baizean), 0KV0411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2, 신틸리맙(sintilimab), tyvyt, IBI-308, 토리팔리맙(Toripalimab), TeRuiPuLi, 테레프릴(terepril), 투오이(tuoyi), JS-001, TAB-001, 탐렐리주맙(Tamrelizumab), HR-301210, INCSHR-01210, SHR-1210, 테미플리맙(Temiplimab), 세미플리맙(Cemiplimab)-rwlc, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684, 람브롤리주맙(lambrolizumab), 펨브롤리주맙(Pembrolizumab), MK-3475, SCH-900475, h409A11, 니볼루맙(Nivolumab), BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 프롤골리맙(Prolgolimab), 포르테카(Forteca), BCD-100, 펜풀리맙(Penpulimab), AK-105, 짐베렐리맙(Zimberelimab), AB-122, GLS-010, WBP-3055, 발스틸리맙(Balstilimab), 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w, 게놀림주맙(Genolimzumab), 겝타놀리맙(Geptanolimab), APL-501, CBT-501, GB-226, 도스탈리맙(Dostarlimab), ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285, 서플루리맙(Serplulimab), HLX-10, CS-1003, 레티판리맙(Retifanlimab), 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012, 사산리맙(Sasanlimab), LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888, 스파탈리주맙(Spartalizumab), PDR-001, QOG25L6Z8Z, BMS-986213, 세트렐리맙(Cetrelimab), JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F, 테보텔리맙(Tebotelimab), MGD-013, BCD-217, BAT-1306, HX-008, MEDI-5752, JTX-4014, 카도닐리맙(Cadonilimab), AK-104, BI-754091, 피딜리주맙(Pidilizumab), CT-011, MDV-9300, YBL-006, AMG-256, RG-6279, RO-7284755, BH-2950, IBI-315, RG-6139, RO-7247669, ONO-4685, AK-112, 609-A, LY-3434172, T-3011, AMG-404, IBI-318, MGD-019, ONCR-177, LY-3462817, RG-7769, RO-7121661, F-520, XmAb-23104, Pd-1-pik, SG-001, S-95016, Sym-021, LZM-009, 부디갈리맙(Budigalimab), 6VD04TY300, ABBV-181, PR-1648817, CC-90006, XmAb-20717, 2661380, AMP-224, B7-DCIg, EMB-02, ANB-030, PRS-332, STI-1110, STI-A1110, CX-188, mPD-1, MCLA-134, 244C8, ENUM 224C8, ENUM C8, 388D4, ENUM 388D4, ENUM D4, MEDI0680, NVP-LZV-184 또는 AMP-514를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 니볼루맙, 펨브롤리주맙, LZM-009, 도스탈리맙, 딘틸리맙, 스파탈리주맙, 티슬레리주맙 또는 세미플리맙을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 표 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 부착점이 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 라이신 잔기에 대한 것인 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 부착점이 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 비-말단 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 중합체가 수용성 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 30

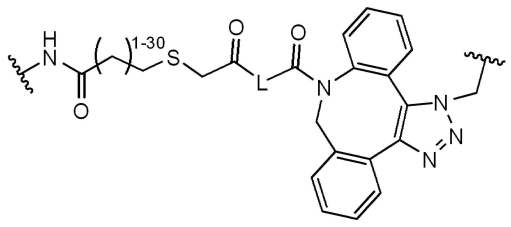
제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 적어도 약 0.1 kDa, 적어도 약 0.5 kDa 또는 적어도 약 1 kDa의 중량 평균 분자량을 가진 것인 조성물.

청구항 31

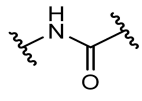
제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 제1 부착점과 제2 부착점 사이에 적어도 50개 원자의 쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 하기 구조를 포함하는 것인 조성물:

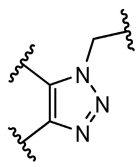


상기 식에서,



는 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 라이신 잔기에 대한 제1 부착점이고;

L은 연결기이고;



는 제1 부착점에 연결되는 연결기에 대한 부착점이다.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 그에 공유결합된 비-링커 중합체를 포함

하는 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 비-링커 중합체가 아미노산 잔기 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 N-말단 아미노산 잔기에 부착되는 것인 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 이종 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 이종 항체 또는 항원 결합 단편이 링커를 추가로 포함하고, 이때 링커가 $(GS)_n$(서열번호 24), $(GGS)_n$(서열번호 25), $(GGGS)_n$(서열번호 26), $(GGSG)_n$(서열번호 27), $(GGSGG)_n$(서열번호 28) 또는 $(GGGGS)_n$(서열번호 29)를 포함하고, 이때 n이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인 조성물.

청구항 37

아미노산 잔기 42에 부착된 제1 중합체를 포함하는 IL-2 폴리펩티드; 및

프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드

를 포함하는 조성물로서,

변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편인 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 단일클론, 인간화, 이식, 키메라, 인간, 탈면역화 또는 이중특이적 폴리펩티드인 조성물.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 이중특이적 $F(ab')_2$, 삼중특이적 $F(ab')_2$, 가변 단편(Fv), 단일 쇄 가변 단편(scFv), dsFv, 이중특이적 scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, AVIMER®, 미니바디, 디아바디, 이중특이적 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 맥시바디, 카멜리드, VHH, 미니바디, 인트라바디, 항체 부분(도메인 항체)을 포함하는 융합 단백질, 단일 쇄 결합 폴리펩티드, scFv-Fc, Fab-Fc, 이중특이적 T 세포 인게이저(BiTE), 4가 탠덤 디아바디(TandAb), 이중 친화성 재표적화 항체(DART), 이중특이적 항체(bscAb), 단일 도메인 항체(sdAb), 융합 단백질, 이중특이적 디설파이드 안정화 Fv 항체 단편(dsFv-dsFv')을 포함하는 것인 조성물.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 항체를 포함하거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 IgG를 포함하고, 이때 IgG가 IgG1, IgG4를 포함하거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 티슬레리주맙, 바이지안, 0KV0411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2, 신틸리맙, tyvyt, IBI-308, 토리팔리맙, TeRuiPuLi, 테레프릴, 투오이, JS-001, TAB-001, 탐렐리주맙, HR-301210, INCSHR-01210, SHR-1210, 테미플리맙, 세미플리맙-rwlc, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684, 람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, MK-3475, SCH-900475, h409A11, 니볼루맙, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 프롤골리맙, 포르테카, BCD-100, 펜풀리맙, AK-105, 짐베렐리맙, AB-122, GLS-010, WBP-3055, 발스틸리맙, 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w, 게놀림주맙, 겝타놀리맙, APL-501, CBT-501, GB-226, 도스탈리맙, ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285, 서플루리맙, HLX-10, CS-1003, 레티판리맙, 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012, 사산리맙, LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888, 스파탈리주맙, PDR-001, QOG25L6Z8Z, BMS-986213, 세트렐리맙, JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F, 테보텔리맙, MGD-013, BCD-217, BAT-1306, HX-008, MEDI-5752, JTX-4014, 카도닐리맙, AK-104, BI-754091, 피딜리주맙, CT-011, MDV-9300, YBL-006, AMG-256, RG-6279, RO-7284755, BH-2950, IBI-315, RG-6139, RO-7247669, ONO-4685, AK-112, 609-A, LY-3434172, T-3011, AMG-404, IBI-318, MGD-019, ONCR-177, LY-3462817, RG-7769, RO-7121661, F-520, XmAb-23104, Pd-1-pik, SG-001, S-95016, Sym-021, LZM-009, 부디갈리맙, 6VDO4TY30O, ABBV-181, PR-1648817, CC-90006, XmAb-20717, 2661380, AMP-224, B7-DCIg, EMB-02, ANB-030, PRS-332, STI-1110, STI-A1110, CX-188, mPD-1, MCLA-134, 244C8, ENUM 224C8, ENUM C8, 388D4, ENUM 388D4, ENUM D4, MEDI0680, NVP-LZV-184 또는 AMP-514를 포함하는 것인 조성물.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 니볼루맙, 펨브롤리주맙, LZM-009, 도스탈리맙, 딘틸리맙, 스파탈리주맙, 티슬레리주맙 또는 세미플리맙을 포함하는 것인 조성물.

청구항 45

제37항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 표 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 46

제37항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중합체가 제2 부착점에서 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 47

제37항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

제46항에 있어서, 제2 부착점이 Fc 영역 내의 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, Fc 영역이 서열번호 105의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 제2 부착점이 서열번호 105의 아미노산 서열 세트의 아미노산 잔기 10 내지 900으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에 존재하는 것인 조성물.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 부착점이 (a) 서열번호 105의 위치 25 내지 35의 아미노산 잔기, (b) 서열번호 105의 위치 70 내지 80의 아미노산 잔기, 또는 (c) 서열번호 105의 아미노산 잔기 95 내지

105인 조성물.

청구항 52

제37항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중합체가 약 200 내지 약 2000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진 것인 조성물.

청구항 53

제37항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중합체가 수용성 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 54

제37항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 중합체가 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 제1 중합체가 폴리(알킬렌 옥사이드)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 56

제37항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제2 중합체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 제2 중합체가 Fc 영역의 아미노산 잔기 35, 37, 38, 41, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 N-말단 아미노산 잔기에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 제2 중합체가 IL-2 폴리펩티드의 잔기 45에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중합체가 IL-2 폴리펩티드의 잔기 Y45에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중합체가 제2 부착점에서 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중합체가 적어도 약 500 달톤, 적어도 약 1000 달톤, 적어도 약 2000 달톤, 적어도 약 3000 달톤, 적어도 약 4000 달톤, 적어도 약 5000 달톤 또는 적어도 약 6000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진 것인 조성물.

청구항 62

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중합체가 적어도 약 120 달톤, 적어도 약 250 달톤, 적어도 약 300 달톤, 적어도 약 400 달톤, 적어도 약 500 달톤, 적어도 약 1000 달톤, 적어도 약 2000 달톤, 적어도 약 3000 달톤, 적어도 약 4000 달톤, 적어도 약 5000 달톤 또는 적어도 6000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진 것인 조성물.

청구항 63

제37항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 이종 항체 또는 항원

결합 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 이종 항체 또는 항원 결합 단편이 링커를 추가로 포함하고, 이때 상기 링커가 $(GS)_n$(서열번호 24), $(GGS)_n$(서열번호 25), $(GGGS)_n$(서열번호 26), $(GGSG)_n$(서열번호 27), $(GGSGG)_n$(서열번호 28) 또는 $(GGGGS)_n$(서열번호 29)를 포함하고, 이때 n이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인 조성물.

청구항 65

(a) 서열번호 105와 80% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편;

(b) (i) 서열번호 105의 위치 25 내지 35;

(ii) 서열번호 105의 위치 70 내지 80; 및

(iii) 서열번호 105의 위치 95 내지 105

로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 공유결합된 하나 이상의 링커; 및

(c) 상기 링커에 공유결합된 하나 이상의 사이토카인

을 포함하는 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 아미노산 잔기가 라이신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인인 조성물.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 아미노산 잔기가 라이신 잔기인 조성물.

청구항 68

제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 단일클론 항체, 인간화 항체, 이식 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 탈면역화 항체 또는 이중특이적 항체인 조성물.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 항체를 포함하거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 70

제69항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 IgG를 포함하고, 이때 IgG가 IgG1, IgG4를 포함하거나, 이들로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 71

제65항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 티슬레리주맙, 바이지안, 0KV0411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2, 신틸리맙, tyvyt, IBI-308, 토리팔리맙, TeRuiPuLi, 테레프릴, 투오이, JS-001, TAB-001, 탐렐리주맙, HR-301210, INCSHR-01210, SHR-1210, 테미플리맙, 세미플리맙-rwlc, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684, 람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, MK-3475, SCH-900475, h409A11, 니볼루맙, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 프롤골리맙, 포르테카, BCD-100, 펜풀리맙, AK-105, 짐베렐리맙, AB-122, GLS-010, WBP-3055, 발스틸리맙, 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w, 게놀림주맙, 젭타놀리맙, APL-501, CBT-501, GB-226, 도스탈리맙, ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285, 서플루리맙, HLX-10, CS-1003, 레티판리맙, 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012, 사산리맙, LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888, 스파탈리주맙, PDR-001, QOG25L6Z8Z, BMS-986213, 세트렐리맙, JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F, 테보텔리맙, MGD-013, BCD-217, BAT-1306, HX-008, MEDI-5752, JTX-4014, 카도닐리맙, AK-104,

BI-754091, 피딜리주맙, CT-011, MDV-9300, YBL-006, AMG-256, RG-6279, RO-7284755, BH-2950, IBI-315, RG-6139, RO-7247669, ONO-4685, AK-112, 609-A, LY-3434172, T-3011, AMG-404, IBI-318, MGD-019, ONCR-177, LY-3462817, RG-7769, RO-7121661, F-520, XmAb-23104, Pd-1-pik, SG-001, S-95016, Sym-021, LZM-009, 부디갈리맙, 6VDO4TY3OO, ABBV-181, PR-1648817, CC-90006, XmAb-20717, 2661380, AMP-224, B7-DCIg, EMB-02, ANB-030, PRS-332, STI-1110, STI-A1110, CX-188, mPD-1, MCLA-134, 244C8, ENUM 224C8, ENUM C8, 388D4, ENUM 388D4, ENUM D4, MEDI0680, NVP-LZV-184 또는 AMP-514를 포함하는 것인 조성물.

청구항 72

제65항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD1 항체가 니볼루맙, 펨브롤리주맙, LZM-009, 도스탈리맙, 딘틸리맙, 스파탈리주맙, 티슬레리주맙 또는 세미플리맙을 포함하는 것인 조성물.

청구항 73

제65항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD1 항체 또는 항원 결합 단편이 표 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 74

제65항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 사이토카인이 IL-2 폴리펩티드, IL-7 폴리펩티드, IL-18 폴리펩티드 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 75

제74항에 있어서, 하나 이상의 사이토카인이 변형된 IL-2 폴리펩티드, 변형된 IL-7 폴리펩티드, 변형된 IL-18 폴리펩티드 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 링커가 IL-2 폴리펩티드, IL-7 폴리펩티드, IL-18 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드, 변형된 IL-7 폴리펩티드, 변형된 IL-18 폴리펩티드 또는 이들의 조합의 비-말단 잔기에 공유결합된 것인 조성물.

청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 35, 37, 38, 41, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에 공유결합되고, 이때 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 78

제77항에 있어서, 링커가 아미노산 잔기 45에 공유결합되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 링커가 IL-2 폴리펩티드의 티로신 잔기에 공유결합되는 것인 조성물.

청구항 80

제75항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 IL-2 폴리펩티드, 변형된 IL-7 폴리펩티드, 변형된 IL-18 폴리펩티드 또는 이들의 조합이 그에 공유결합된 비-링커 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 81

제80항에 있어서, 비-링커 중합체가 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 N-말단 아미노산 잔기에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링이 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 하는 것인 조성물.

청구항 82

제65항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 중합체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 83

제82항에 있어서, 중합체가 수용성 중합체인 조성물.

청구항 84

제83항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 85

제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 제1 부착점과 제2 부착점 사이에 적어도 50개 원자의 쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체가 적어도 약 0.5 kDa, 적어도 약 1 kDa 또는 적어도 약 5 kDa의 중량 평균 분자량을 가진 것인 조성물.

청구항 87

제75항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 서열번호 3 내지 23 중 어느 한 서열번호의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 88

제75항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 사이토카인이 2개의 동일한 변형된 IL-2 폴리펩티드, 2개의 상이한 변형된 IL-2 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드와 변형된 IL-7 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드와 변형된 IL-18 폴리펩티드, 또는 변형된 IL-7 폴리펩티드와 변형된 IL-18 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드, 또는 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이 재조합 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 90

a) 제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 따른 조성물; 및

b) 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제

를 포함하는 약학 조성물.

청구항 91

제90항에 있어서, 비경구 또는 장 투여용으로 제제화된 약학 조성물.

청구항 92

제90항 또는 제91항에 있어서, 정맥내 또는 피하 투여용으로 제제화된 약학 조성물.

청구항 93

제90항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 형태로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 94

제90항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제가 각각의 탄

수화물, 무기 염, 항산화제, 계면활성제, 완충제 또는 이들의 임의의 조합 중 하나 이상을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 95

제90항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 96

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제90항 내지 제95항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 암이 암종, 육종 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 암이 암종이고, 암종이 피부 편평 세포 암종(CSCC), 요로상피 암종(UC), 신장 세포 암종(RCC), 간세포 암종(HCC), 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위식도 연접부(GEJ) 암종, 자궁내막 암종(EC), 메르켈(Merkel) 세포 암종(MCC) 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 99

제92항에 있어서, 암이 흑색종, 폐암, 방광암(BC), 마이크로세틀라이트(microsatellite) 불안정성 높음(MSI-H)/불일치 복구 결핍(dMMR) 고형 종양, 종양 돌연변이 부담 높음(TMB-H) 고형 종양, 삼중 음성 유방암(TNBC), 위암(GC), 자궁경부암(CC), 흉막 중피종(PM), 고전적 호지킨 림프종(cHL), 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL) 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 100

a) 반응성 기를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 특정 잔기에 공유결합시키는 단계;

b) 반응성 기를, 사이토카인에 부착된 상보적 반응성 기와 접촉시키는 단계; 및

c) 조성물을 형성하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 제조하는 방법.

청구항 101

프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드;

변형된 IL-2 폴리펩티드; 및

변형된 IL-2 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제1 부착점, 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함하는 링커

를 포함하는 조성물을 생성하는 방법으로서, 상기 방법이

a) 커플링 효소의 존재 하에 링커와 반응하는 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기를 가진 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하는 단계; 및

b) 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기와 링커 사이에 공유결합의 형성을 야기할 수 있는 효소의 존재 하에, 상기 항체 또는 항원 결합 단편을, 1차 아민을 포함하고 반응성 기(R)를 포함하는 링커와 반응시키는 단계

를 포함하고, 이때 상기 공유결합이 R 모이어티에 존재하지 않고, 상기 방법이 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기가 상기 링커를 통해 반응성 기와 공유결합을 형성하게 하기에 충분한 조건 하에서 수행되고, 상기 공유결합이 상기 링커의 제2 부착점을 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 효소가 트랜스아미나제를 포함하는 것인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 효소가 트랜스글루타미나제를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호참조**

[0002] 본 출원은 2021년 7월 9일에 출원된 미국 가출원 제63/219,981호 및 2021년 7월 9일에 출원된 미국 가출원 제63/219,989호의 이익을 주장하며, 이 가출원들은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 2021년, 추정된 180만 건의 새로운 암 사례가 미국에서 진단될 것이고, 600,000명 이상의 사람들이 이 질환으로 사망할 것이다. 면역요법은 질환의 치료를 돕기 위해 대상체의 면역 시스템을 이용한다. 면역요법은 치료되는 질환의 성질에 따라 면역 시스템을 활성화시키거나 억제하도록 설계될 수 있다. 암의 치료를 위한 다양한 면역요법의 목표는 면역 시스템이 종양 또는 다른 암 조직을 인식하고 파괴하도록 면역 시스템을 자극하는 것이다.

[0004] 프로그래밍된 세포 사멸 단백질(PD-1)은 T 세포 염증 활성을 억제하여 면역 시스템을 하향조절하고 자가 관용을 촉진함으로써 인체의 세포에 대한 면역 시스템의 반응을 조절하는, 세포 표면의 단백질이다. 프로그래밍된 세포 사멸-리간드1(PD-L1)은 면역 시스템의 적응 아암(arm)을 억제하는 1형 막횡단 단백질이다. PD-1 및 PD-L1 경로는 내인성 면역 항종양 활성에 반응하여 종양 세포에 의해 발휘되는 적응성 면역 시스템 저항 기작을 대표한다. PD-1 억제제, 예컨대, 항-PD-1 폴리펩티드 및 항-PD-1 항원 결합 단편은 PD-1 면역 체크포인트 단백질의 활성을 차단하는 체크포인트 억제제 항암제이다. 그러나, 많은 경우에서 단일 작용제 요법만은 암 환자에서 지속 가능한 반응을 달성하는 데 불충분하다. 따라서, 암을 치료하기 위한 개선된 요법이 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본원은 항-프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)-인터류킨 2(IL2) 면역접합체 및 이의 용도를 기술한다.

[0006] 한 측면에서, 본원은 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드; 변형된 IL-2 폴리펩티드; 및 링커를 포함하는 조성물을 기술하는 것으로, 이때 상기 링커는 변형된 IL-2 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제1 부착점; 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함한다.

[0007] 한 측면에서, 본원은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및 링커를 포함하는 조성물을 기술하는 것으로; 이때 상기 링커는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제1 부착점; 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제2 부착점을 포함한다.

[0008] 또 다른 측면에서, 본원은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및 화학적 링커를 포함하는 조성물을 기술하는 것으로; 이때 상기 화학적 링커는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제1 부착점; 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본원은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드, 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및 화학적 링커를 포함하는 조성물을 기술하는 것으로; 이때 상기 화학적 링커는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제1 부착점; 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함하고, 이때 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2 수용체 베타 서브유닛 쪽으로 편향되어 있다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본원은 IL-2 폴리펩티드; 및 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 기술하는 것으로, 이때 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 42에 부착된 제1 중합체를 포함하고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하고 서열번호 105와 90% 이상의 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편; (b) (i)

서열번호 105의 위치 25 내지 35; (ii) 서열번호 105의 위치 70 내지 80; 및 (iii) 서열번호 105의 위치 95 내지 105로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 공유결합된 하나 이상의 링커; 및 (c) 이 링커에 공유결합된 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 조성물을 기술한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) PD-1에 선택적으로 결합하고 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; (b) K246, K248, K288, K290 및 K317(Eu 넘버링)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 공유결합된 하나 이상의 링커; 및 (c) 상기 하나 이상의 링커에 공유결합된 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 조성물을 기술한다.

[0013] PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 예를 들어, 항체와 같은 재조합 단백질 또는 합성 단백질일 수 있다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본원은 a) 본원에 기재된 조성물; 및 b) 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 기술한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본원은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 임의의 조성물 또는 본원에 기재된 약학 조성물을 상기 대상체에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 기술한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 조성물을 제조하는 방법으로서, a) 반응성 기를 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 특정 잔기에 공유결합시키는 단계; b) 상기 반응성 기를 사이토카인에 부착된 상보적 반응성 기와 접촉시키는 단계; 및 c) 상기 조성물을 형성하는 단계를 포함하는 방법을 기술한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본원은 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드; 변형된 IL-2 폴리펩티드; 및 변형된 IL-2 폴리펩티드의 비-말단 잔기에 공유결합된 제1 부착점, 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함하는 링커를 포함하는 조성물을 생성하는 방법으로서, a) 커플링 효소의 존재 하에 링커와 반응하는 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기를 가진 항-PD-1 폴리펩티드를 제공하는 단계; 및 b) 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기와 링커 사이에 공유결합의 형성을 야기할 수 있는 효소의 존재 하에, 상기 항-PD-1 폴리펩티드를, 1차 아민을 포함하고 반응성 기(R)를 포함하는 링커와 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 기술하는 것으로, 이때 상기 공유결합은 R 모이어티에 존재하지 않고, 상기 방법은 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기가 링커를 통해 반응성 기와 공유결합을 형성하게 하기에 충분한 조건 하에서 수행되고, 상기 공유결합은 상기 링커의 제2 부착점을 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본원은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드; 변형된 IL-2 폴리펩티드; 및 변형된 IL-2 폴리펩티드의 잔기에 공유결합된 제1 부착점, 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 공유결합된 제2 부착점을 포함하는 링커를 포함하는 조성물을 생성하는 방법으로서, a) 작용화된 Fc 결합 친화성 펩티드의 존재 하에 링커 전구체와 반응하는 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기를 가진 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 제공하는 단계; 및 b) PD-1에 선택적으로 결합하는 상기 폴리펩티드를, 상기 수용체 아미노산 잔기와 결합을 형성할 수 있는 반응성 기(R)를 포함하는 링커 전구체와 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 기술하는 것으로, 이때 상기 방법은 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기가 링커를 통해 반응성 기와 공유결합을 형성하게 하기에 충분한 조건 하에서 수행되고, 상기 공유결합은 상기 링커의 제2 부착점을 포함한다.

[0019] 본 개시내용의 추가 측면 및 이점은 본 개시내용의 예시적인 실시양태만이 제시되고 설명되는 하기 상세한 설명으로부터 당업자에게 쉽게 명백해질 것이다. 이해될 바와 같이, 본 개시내용은 다른 실시양태 및 상이한 실시양태가 가능하며, 이의 여러 세부사항은 모두 본 개시내용을 벗어나지 않으면서 다양한 자명한 측면에서 변형될 수 있다. 따라서, 도면 및 설명은 본질적으로 예시적인 것으로서 간주되어야 하고, 제한적인 것으로서 간주되어서는 안 된다.

[0020] **참고에 의한 포함**

[0021] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적 및 개별적으로 표시되는 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다. 참고로 포함되는 간행물, 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 함유된 본 개시내용과 모순되는 경우, 본 명세서는 임의의 이러한 모순되는 자료를 대체하고/하거나 이러한 자료보다 우선한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 본 개시내용의 항-PD1-IL2 면역사이토카인, 및 IL2Rβ/γ 상향조절 및 PD-1 억제를 통한 항-PD1-IL2 면

역사이토카인과 활성화된 T 세포의 상호작용을 예시한다.

도 1b는 변형된 접합 가능한 사이토카인 조성물 AB의 구조를 보여준다.

도 2a는 1개 또는 2개의 접합 핸들(handle)을 도입하기 위한 화학적 변형 기술에 의한 항-PD1 항체의 부위 선택적 변형을 보여준다.

도 2b는 비변형 펨브롤리주맙(Pembrolizumab) 및 DBCO 접합 핸들을 가진 펨브롤리주맙의 Q-TOF 질량 스펙트럼을 보여준다.

도 2c는 DAR1, DAR2, 또는 1과 2 사이의 혼합 DAR을 가진 PD1-IL2를 생성하기 위한 변형된 IL2 사이토카인의 부위 선택적 접합을 보여준다.

도 2d는 미정제 펨브롤리주맙과 조성물 AB 접합 반응의 TIC 크로마토그램(상부) 및 온전한 RP-HPLC(하부) 프로파일을 보여준다.

도 2e는 1의 약물-항체 비(DAR1) 및 2의 약물-항체 비(DAR2) 종의 형성을 보여주는 조성물 AB 접합 반응에 접합된 미정제 펨브롤리주맙의 Q-TOF 질량 스펙트럼 프로파일을 보여준다.

도 2f는 조성물 AB에 접합된 정제된 펨브롤리주맙의 온전한 RP-HPLC(상부 왼쪽) 프로파일을 보여준다.

도 2g는 혼합 약물-항체 비(DAR)를 가진 조성물 AB에 접합된 정제된 펨브롤리주맙의 Q-TOF 질량 스펙트럼 프로파일을 보여준다.

도 2h는 조성물 AB에 접합된 펨브롤리주맙을 포함하는 정제된 면역사이토카인의 SEC-HPLC를 보여준다.

도 3은 PD1/CD279 리간드와 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 ELISA 신호를 보여주고 x-축에서 비오티닐화 PD-1 단백질의 투여량을 보여준다. 비접합 기준 항체는 펨브롤리주맙, 니볼루맙(Nivolumab) 및 LZM-009이다. 이 도면에서 시험된 접합된 항체는 조성물 A, C, D, E, F, G 및 H이다.

도 4는 PD1/PDL1 경로를 방해하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 이펙터 세포 NFAT-RE 리포터의 평균 발광 강도를 보여주고 x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 비접합 기준 항체는 펨브롤리주맙이고, 이 도면에서 시험된 접합된 항체는 조성물 B이다. 이 도면에서 시험된 IL-2 폴리펩티드는 프로류킨(Proleukin) 및 조성물 AA이다.

도 5는 pH 6에서 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 AlphaLISA® FcRn-IgG 신호를 보여주고, x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 비접합 기준 항체는 펨브롤리주맙 및 LZM-009이다. 시험된 접합된 항체는 조성물 A, D, E, H, J 및 K이다.

도 6a는 인간 Fc 감마 수용체 I(CD64), 인간 Fc 감마 수용체 IIa(CD32a), 인간 Fc 감마 수용체 IIb(CD32b) 및 인간 Fc 감마 수용체 IIIa(CD16)에 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 ELISA 신호를 보여주고 x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 비접합 기준 항체는 펨브롤리주맙 및 LZM-009이다. 시험된 접합된 항체는 조성물 A, C, D 및 H이다.

도 6b는 인간 Fc 감마 수용체 I(CD64), 인간 Fc 감마 수용체 IIa(CD32a), 인간 Fc 감마 수용체 IIb(CD32b) 및 인간 Fc 감마 수용체 IIIa(CD16)에 결합하는 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 ELISA 신호를 보여주고 x-축에서 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 시험된 접합된 항체 조성물은 위에서 아래로 각각 조성물 E, J 및 K이다.

도 7a는 비형질도입되지 않은 모 Mo7e($PD1^-$) 세포 및 안정적으로 형질도입된($PD1^+$) Mo7e 세포에서 PD-1/CD279의 표면 발현의 수준을 측정하는 도표를 보여준다.

도 7b는 x-축에 기재된 바와 같이, 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 면역사이토카인의 처리 시, "$PD1^-$"로서 표시된 모 PD1- Mo7e 세포 또는 "$PD1^+$"로서 표시된 안정한 $PD1^+$ Mo7e 세포에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성

화제 5(pSTAT5)에 대한 EC_{50} 값을 y-축에서 보여준다. PD1 음성 세포에 대해 표시된 측정값은 검정색으로 채워진 기호로 표시되는 반면, PD1 양성 세포는 회색 빈 기호로 표시된다. 이 도면에서 시험된 비접합 변형된 IL-2 폴리펩티드는 프로류킨 및 조성물 AB이다. 변형된 IL-2 항-PD-1 면역사이토카인은 조성물 A, C 및 H이다. Her2 표적화 IL-2 면역사이토카인인 조성물 O는 음성 대조군으로서 표시되어 있다.

도 8은 시험관내 인간 T 세포에서 T_{eff} 및 T_{reg} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표를 보여준다. 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도가 x-축 상의 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 면역사이토카인에 대한 투여량 반응으로서 y-축에 표시되어 있다. 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이다. 시험된 IL-2 항-PD-1 면역사이토카인은 조성물 A, B 및 C이다.

도 9a는 건강한 공여체의 말초 혈액으로부터 새로 단리된 휴면 기억(CD45RA-) 및 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포에서 PD-1/CD279의 표면 발현의 수준을 측정하는 도표뿐만 아니라, 표시된 세포 유형의 만화 묘사도 보여준다.

도 9b는 CD8+ T_{eff} 세포에 대한 IL-2와 PD-1의 접합의 투여량 반응 효과를 보여준다. 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 기억(CD45RA-) 및 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고 x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이다. 이 도면에서 시험된 IL-2 항-PD-1 면역사이토카인은 조성물 B이다. Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙(Trastuzumab) 항체)은 음성 대조군으로서 표시되어 있다.

도 10a는 과량의 비접합 항-PD1 항체 펨브롤리주맙의 존재 또는 부재 하에 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고 x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이고, 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 B, 및 대조군인 HER2 표적화 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

도 10b는 과량의 비접합 항-PD1 항체 펨브롤리주맙의 존재 또는 부재 하에 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 기억(CD45RA-) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고, x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이고, 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 B, 및 대조군인 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

도 11a는 hPD1 인간화 BALB/c 마우스에서 CT26 동계(syngeneic) 결장 암종 종양의 성장에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(평균 ± SEM).

도 11b는 치료한 지 7일 후 hPD1 인간화 BALB/c 마우스에서 CT26 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 막대 차트를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(평균 ± SEM; ** 일원 ANOVA P-값<0.001).

도 12a는 치료한 지 7일 후 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서 미감작($CD62L^{high}$ $CD44^{low}$) CD8+ T 세포의 증폭에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하

는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

도 12b는 치료한 지 7일 후 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서 이펙터 기억($CD62L^{음성}$ $CD44^{high}$) CD8+ T 세포의 증폭에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

도 13a는 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서의 지속성에 대한 면역사이토카인의 PD-1 표적화 및 비표적화의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 대조군 면역사이토카인의 혈장 또는 종양 농도를 보여주고, x-축에서 시간을 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SD).

도 13b는 PD-1 표적화가 어떻게 7일의 과정에 걸쳐 종양 내의 PD1-IL2 면역사이토카인의 점진적인 축적을 야기하는지를 보여준다. 대조적으로, 비표적화 대조군 면역사이토카인(Her2-IL2)은 4일 이내에 제거되어, 종양내 축적이 없음을 보여준다. CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스에서 분석을 수행하였고, y-축에는 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 대조군 면역사이토카인의 종양/혈장 농도의 비가 표시되어 있고, x-축에는 시간이 표시되어 있다. 분석된 면역사이토카인은 단일 적용 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)를 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

도 14a는 hPD1 C57BL/6 마우스에서 MC38 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 접합된 항-PD1 항체의 단일 주사의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사로서 1 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 H이다(n=8; 평균 ± SEM).

도 14b는 치료한 지 7일 후 hPD1 C57BL/6 마우스에서 MC38 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 접합된 항-PD1 항체의 단일 주사의 효과를 설명하는 막대 차트를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사로서 1 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 H이다(n=8마리 동물; 평균 ± SEM; ** 일원 ANOVA P-값<0.005).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본원은 항-PD-1 폴리펩티드를 개시한다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 사이토카인과 같은 세포 신호전달 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-2이다. 도 1a는 IL-2 사이토카인에 접합된 항-PD-1 폴리펩티드를 포함하는 예시적인 면역사이토카인을 예시한다. 본 개시내용의 항-PD-1 항체/IL-2 면역사이토카인(본원에서 PD1-IL2로서 지칭됨)은 대상체에 의한 더 우수한 효능 및 잠재적으로 개선된 내약성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD-1-IL-2 면역사이토카인은 종양 침윤 림프구(TIL)를 직접 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1-IL-2 면역사이토카인은 암과 같은 질환을 가진 대상체에 대한 항-PD-1 폴리펩티드 또는 IL-2의 치료 투여량을 유의미하게 감소시킬 수 있다.

[0024] 항-PD-1-IL-2 면역사이토카인은 하나 이상의 작용 방식으로 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1-IL-2 면역사이토카인은 종양 내의 PD-1 및 CD8+ T 세포를 표적화함으로써 PD-1을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1-IL-2 면역사이토카인은 IL-2R βγ를 통해 T 세포 및 NK 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0025] 하기 설명 및 실시예는 본 개시내용의 실시양태를 상세히 예시한다. 본 개시 내용은 본원에 기재된 특정 실시양태로 제한되지 않으므로 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 당업자는 본 개시내용의 범위 내에 포함되는, 본 개시내용의 수많은 변경 및 변형이 있음을 인식할 것이다.

[0026] 본 개시내용의 다양한 특징이 단일 실시양태와 관련하여 기재될 수 있지만, 이러한 특징은 개별적으로 또는 임의의 적절한 조합으로 제공될 수도 있다. 대조적으로, 본 개시내용이 명료성을 위해 별도의 실시양태들과 관련하여 본원에 기재될 수 있지만, 본 개시내용은 단일 실시양태로도 구현될 수 있다.

[0027] 본원에서 사용된 단원 제목은 단지 조직화 목적만을 위한 것이며 설명된 보호대상을 제한하는 것으로서 해석되

어서는 안 된다.

[0028] **정의**

[0029] 모든 용어는 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 이해되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0030] 하기 정의는 당분야에서의 정의를 보완하고 본원에 관한 것이며, 임의의 관련되거나 관련되지 않은 사례, 예를 들어, 임의의 공동 소유 특허 또는 출원에 귀속되어서는 안 된다. 본원에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 개시내용의 시험을 위한 실시에 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에 기재되어 있다. 따라서, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이고 제한하기 위한 것이 아니다.

[0031] 본원에서 사용된 용어는 특정 사례만을 설명하기 위한 것이며 제한하기 위한 것이 아니다. 본원에서, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 단수형의 사용은 복수형을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명시하지 않는 한, 단수형은 복수형도 포함하기 위한 것이다. 본원에서, 달리 언급되지 않는 한, "또는"의 사용은 "및/또는"을 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "및/또는" 및 "이들의 임의의 조합" 및 이들의 문법적으로 동등한 용어는 교환 가능하게 사용될 수 있다. 이 용어들은 임의의 조합이 구체적으로 예상됨을 전달할 수 있다. 오로지 예시 목적으로, 하기 어구 "A, B 및/또는 C" 또는 "A, B, C, 또는 이들의 임의의 조합"은 "개별적으로 A; 개별적으로 B; 개별적으로 C; A 및 B; B 및 C; A 및 C; 및 A, B 및 C"를 의미할 수 있다. 문맥이 구체적으로 분리적 사용을 지칭하지 않은 한, 용어 "또는"은 결합적 또는 분리적으로 사용될 수 있다.

[0032] 용어 "약" 또는 "대략"은 부분적으로 값이 어떻게 측정되거나 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 의해 좌우될, 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 결정된 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 이내에 있음을 의미할 수 있다. 예를 들어, "약"은 당분야의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내에 있음을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 최대 15%, 최대 10%, 최대 5% 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 이 용어는 값의 한 자릿수 이내, 5배 이내 또는 2배 이내에 있음을 의미할 수 있다. 특정 값이 본원 및 청구범위에 기재되어 있는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 이내에 있음을 의미하는 용어 "약"이 가정되어야 한다.

[0033] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는"(및 임의의 형태의 포함하는, 예컨대, "포함한다" 및 "포함하고"), "가진"(및 임의의 형태의 가진, 예컨대, "가진다" 및 "갖고"), "포괄하는"(및 임의의 형태의 포괄하는, 예컨대, "포괄한다" 및 "포괄하고") 또는 "함유하는"(및 임의의 형태의 함유하는, 예컨대, "함유한다" 및 "함유하고")은 포괄적이거나 제한이 없고 언급되지 않은 추가 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본 명세서에서 논의된 임의의 실시양태는 본 개시내용의 임의의 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있고, 그 반대도 마찬가지일 것으로 예상된다. 더욱이, 본 개시내용의 조성물은 본 개시내용의 방법을 달성하는 데 사용될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 "일부 실시양태", "실시양태", "한 실시양태" 또는 "다른 실시양태"의 언급은 실시양태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 개시내용의 적어도 일부 실시양태에 포함되나, 반드시 모든 실시양태에 포함되는 것이 아님을 의미한다. 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어들 및 어구들이 이하에 정의된다.

[0035] IL-2 폴리펩티드의 잔기에 "부착된" 또는 "공유결합된" 기가 본원에서 언급된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "부착된" 또는 "공유결합된"은 기가 표시된 잔기에 고정되어 있음을 의미하며, 이러한 고정은 연결기(즉, 링커)를 포함할 수 있다. 따라서, 잔기에 "부착된" 또는 "공유결합된" 기의 경우, 이러한 연결기도 포함된다는 것은 명확히 예상된다.

[0036] 결합 친화성은 단일 분자와 이의 리간드/결합 파트너 사이의 결합 상호작용의 강도를 의미한다. 더 높은 결합 친화성은 더 낮은 결합 친화성보다 더 높은 강도 결합을 의미한다. 일부 경우, 결합 친화성은 2개의 관련 분자들 사이의 해리 상수(K_D)로 측정된다. K_D 값을 비교할 때, 더 낮은 값을 가진 결합 상호작용은 더 높은 값을 가진 결합 상호작용보다 더 높은 결합 친화성을 가질 것이다. 단백질-리간드 상호작용의 경우, K_D는 하기 수학식에 따라 계산된다:

$$K_D = \frac{[L][P]}{[LP]}$$

[0037]

[0038] 상기 식에서, [L]은 리간드의 농도이고, [P]는 단백질의 농도이고, [LP]는 리간드/단백질 복합체의 농도이다.

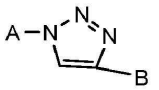
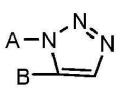
[0039] 기준 서열과 특정 퍼센트 서열 동일성을 갖거나 기준 서열의 위치에 상응하는 위치에 있는 잔기를 지칭하는 특정 아미노산 서열(예를 들어, 폴리펩티드 서열)이 본원에서 언급된다. 서열 동일성은 매트릭스 BLOSUM62, Gap Costs Existence:11, Extension:1, 및 조성 조절 조건부 조성 점수 매트릭스 조절의 파라미터를 사용하는 단백질-단백질 BLAST 알고리즘에 의해 측정된다. 이 정렬 알고리즘은 비교되는 2개의 서열의 정렬 분석을 통해 잔기가 "상응하는" 위치에 있는지를 평가하는 데에도 사용된다.

[0040] 용어 "약학적으로 허용되는"은 인간을 포함하는 동물에 사용되도록 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되었거나 승인될 수 있거나, 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 등재되어 있음을 의미한다.

[0041] "약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제"는 작용제와 함께 대상체에게 투여될 수 있고 작용제의 약리학적 활성을 파괴하지 않으며 치료량의 작용제를 전달하기에 충분한 투여량으로 투여될 때 무독성인 부형제, 담체 또는 희석제를 지칭한다.

[0042] 본 개시내용에 적합한 "약학적으로 허용되는 염"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 또는 동물의 조직과 접촉하여 사용되기에 적합한 것으로 당분야에서 일반적으로 간주되는 산 또는 염기 염일 수 있다. 이러한 염은 카르복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염뿐만 아니라, 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 및 유기 산 염도 포함한다. 구체적인 약학 염은 염산, 인산, 브롬화수소산, 말산, 글리콜산, 푸마르산, 황산, 설팜산, 설파닐산, 포름산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 벤젠 설폰산, 에탄 디설폰산, 2-하이드록시에틸 설폰산, 질산, 벤조산, 2-아세톡시벤조산, 구연산, 주석산, 젖산, 스테아르산, 살리실산, 글루탐산, 아스코르브산, 파모산, 석신산, 푸마르산, 말레산, 프로피온산, 하이드록시말레산, 요오드화수소산, 페닐아세트산, 알칸산, 예컨대, 아세트산, HOOC-$(CH_2)_n$-COOH(이때 n은 0 내지 4임) 등과 같은 산의 염을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 유사하게, 약학적으로 허용되는 양이온은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 알루미늄, 리튬 및 암모늄을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 자는 추가 약학적으로 허용되는 염이 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985)]에 나열된 염을 포함함을 본 개시내용 및 당분야의 지식으로부터 인식할 것이다. 일반적으로, 약학적으로 허용되는 산 또는 염기 염은 임의의 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모화합물로부터 합성될 수 있다. 요약하건대, 이러한 염은 이 화합물들의 유리 산 또는 염기 형태를 적절한 용매에서 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[0043] 본원에서 제공된 범위는 범위 내의 모든 값에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어, 범위 1 내지 50은 1, 2, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50, 및 상기 언급된 정수들 사이의 모든 중간 소수점 값들, 예를 들어, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 및 1.9로 이루어진 군으로부터의 임의의 숫자, 숫자의 조합 또는 하위범위를 포함하는 것으로 이해된다. 하위범위와 관련하여, 범위의 종점으로부터 확장되는 "네스티드 하위범위"가 구체적으로 예상된다. 예를 들어, 예시적인 범위 1 내지 50의 네스티드 하위범위는 한 방향으로 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30, 및 1 내지 40을 포함할 수 있거나, 다른 방향으로 50 내지 40, 50 내지 30, 50 내지 20, 및 50 내지 10을 포함할 수 있다.

[0044] 본원에서 제공된 특정 화학식 및 기타 예시는 아지드-알킨 고리추가 반응으로부터 생성된 트리아졸 반응 생성물을 도시한다. 이러한 화학식은 일반적으로 반응에서 형성된 생성된 트리아졸의 단일 위치이성질체만을 도시하지만, 화학식은 생성된 위치이성질체 둘 다를 포함한다. 따라서, 화학식은 단일 위치이성질체(예를 들어, )만을 도시하지만, 다른 위치이성질체(예를 들어, )도 포함된다.

[0045] 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 객체인 동물을 의미한다. 단지 예로서, 대상체는 인간 또는 비인간 포유동물, 예컨대, 비인간 영장류, 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하나 이들로 제한되지 않는 포유동물을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0046] 용어 "임의적" 또는 "임의로"는 후속적으로 설명된 사건 또는 상황이 발생할 수 있지만 반드시 발생할 필요는

없으며, 설명이 사건 또는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.

[0047] 용어 "모이어티"는 분자의 특정 분절 또는 작용기를 의미한다. 화학적 모이어티는 종종 분자에 내장되어 있거나 부착되어 있는 화학적 물질로서 인식된다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "수평균 분자량"(Mn)은 샘플 내의 모든 개별 유닛의 통계적 평균 분자량을 의미하며, 하기 수학식 (1)로 정의된다:

$$Mn = \frac{\sum N_i \, M_i}{\sum N_i}$$

[0049] 수학식 (1)

[0050] 상기 식에서, M_i는 유닛의 분자량이고, N_i는 그 분자량의 유닛의 수이다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "중량 평균 분자량"(Mw)은 하기 수학식 (2)로 정의된 수를 의미한다:

$$Mw = \frac{\sum N_i \, M_i^2}{\sum N_i \, M_i}$$

[0052] 수학식 (2)

[0053] 상기 식에서, M_i는 유닛의 분자량이고, N_i는 그 분자량의 유닛의 수이다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이, "피크 분자량"(Mp)은 주어진 분석 방법(예를 들어, 질량 분광분석, 크기 배제 크로마토그래피, 동적 광산란, 분석 원심분리 등)에서 가장 높은 피크의 분자량을 의미한다.

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이, "비-정규" 아미노산은 일반적으로 천연 생성 단백질 내로 통합되는 20종의 정규 아미노산에 속하지 않는 D-형태 또는 L-형태의 아미노산 잔기를 지칭할 수 있다.

[0056] 본원에서 사용된 바와 같이, "접합 핸들"은 상보적 반응성 기와 접촉할 때 결합을 형성할 수 있는 반응성 기를 지칭한다. 일부 경우, 접합 핸들은 바람직하게는 의도된 상보적 반응성 기를 포함하지 않는 다른 분자와의 실질적인 반응성을 갖지 않는다. 접합 핸들, 이들 각각의 상보적 접합 핸들 및 상응하는 반응 생성물의 비제한적 예는 아래 표에서 확인될 수 있다. 표 제목은 "접합 핸들" 또는 "상보적 접합 핸들"이라는 제목 아래에 특정 반응성 기를 배치하지만, 접합 핸들의 임의의 언급은 표에 나열된 상보적 접합 핸들을 포괄할 수 있다(예를 들어, 트랜스-사이클로옥텐은 접합 핸들일 수 있고, 이 경우 테트라진은 상보적 접합 핸들일 것이다). 일부 경우, 아민 접합 핸들 및 아민에 상보적인 접합 핸들은 생물학적 시스템에서 아민의 편재적인 존재 및 오프-표적 접합에 대한 증가된 가능성 때문에 생물학적 시스템에서 사용하기에 덜 바람직하다.

접합 핸들의 표

[0057]

접합 핸들	상보적 접합 핸들	반응 생성물
설프하이드릴	알파-할로-카르보닐(예를 들어, 브로모아세트아미드), 알파-베타 불포화 카르보닐(예를 들어, 말레이미드, 아크릴아미드)	티오에테르
아지드	알킨(예를 들어, 말단 알킨, 치환된 사이클로옥틴(예를 들어, 디벤조사이클로옥틴(DBCO), 디플루오로사이클로옥틴, 비사이클로[6.1.0]노닌 등))	트리아졸
포스핀	아지드/에스테르 쌍	아미드
테트라진	*트랜스*-사이클로옥텐	디하이드로피리다진
아민	활성화된 에스테르(예를 들어, N-하이드록시석신이미드 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르)	아미드
이소시아네이트	아민	우레아
에폭사이드	아민	알킬-아민
하이드록실아민	알데하이드, 케톤	옥심
하이드라지드	알데하이드, 케톤	하이드라존
포타슘 아실 트리플루오로보레이트	O-치환된 하이드록실아민(예를 들어, O-카르바모일하이드록실아민)	아미드

[0058] 본원 전체에 걸쳐, 접합 핸들이 연결된 작용기를 나타내기 위해 용어 "접합 핸들" 앞에 접두사가 사용된다. 예를 들어, "단백질 접합 핸들"은 (직접적으로 또는 링커를 통해) 단백질에 부착된 접합 핸들이고, "항체 접합 핸들"은 (직접적으로 또는 링커를 통해) 항체에 부착된 접합 핸들이고, "링커 접합 핸들"은 링커 기(예를 들어,

합성 단백질과 항체를 연결하는 데 사용되는 이작용성 링커)에 부착된 접합 핸들이다.

[0059] 용어 "알킬"은 1개 내지 20개의 탄소 원자를 갖고 단일 결합에 의해 분자의 나머지 부분에 부착된 선형 또는 분지형 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. 최대 10개의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_{10} 알킬로서 지칭되고, 마찬가지로, 예를 들어, 최대 6개의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_6 알킬이다. 다른 수의 탄소 원자를 포함하는 알킬(및 본원에서 정의된 다른 모이어티)도 유사하게 표시된다. 알킬 기는 C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_9 알킬, C_1-C_8 알킬, C_1-C_7 알킬, C_1-C_6 알킬, C_1-C_5 알킬, C_1-C_4 알킬, C_1-C_3 알킬, C_1-C_2 알킬, C_2-C_8 알킬, C_3-C_8 알킬 및 C_4-C_8 알킬을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 대표적인 알킬 기는 메틸, 에틸, -프로필, 1-메틸 에틸, -부틸, -펜틸, 1,1-디메틸 에틸, 3-메틸헥실, 2-메틸헥실, 1-에틸-프로필 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 알킬은 메틸 또는 에틸이다. 일부 실시양태에서, 알킬은 $-CH(CH_3)_2$ 또는 $-C(CH_3)_3$이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬 기는 임의로 치환될 수 있다. "알킬렌" 또는 "알킬렌 쇄"는 분자의 나머지 부분을 라디칼 기에 연결하는 선형 또는 분지형 2가 탄화수소 쇄를 의미한다. 일부 실시양태에서, 알킬렌은 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2-$이다. 일부 실시양태에서, 알킬렌은 $-CH_2-$이다. 일부 실시양태에서, 알킬렌은 $-CH_2CH_2-$이다. 일부 실시양태에서, 알킬렌은 $-CH_2CH_2CH_2-$이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 알킬렌 기는 임의로 치환될 수 있다.

[0060] 용어 "알케닐렌" 또는 "알케닐렌 쇄"는 분자의 나머지 부분을 라디칼 기에 연결하는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합이 존재하는 선형 또는 분지형 2가 탄화수소 쇄를 의미한다. 일부 실시양태에서, 알케닐렌은 -CH=CH-, $-CH_2CH=CH-$, 또는 $-CH=CHCH_2-$이다. 일부 실시양태에서, 알케닐렌은 -CH=CH-이다. 일부 실시양태에서, 알케닐렌은 $-CH_2CH=CH-$이다. 일부 실시양태에서, 알케닐렌은 $-CH=CHCH_2-$이다.

[0061] 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합이 존재하는 알킬 기의 유형을 의미한다. 한 실시양태에서, 알케닐 기는 화학식 $-C{\equiv}C-R^X$를 가지며, 이때 R^x는 알키닐 기의 나머지 부분을 의미한다. 일부 실시양태에서, R^x는 H 또는 알킬이다. 일부 실시양태에서, 알키닐은 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐 등으로부터 선택된다. 알키닐 기의 비제한적 예는 $-C{\equiv}CH$, $-C{\equiv}CCH_3$, $-C{\equiv}CCH_2CH$, 및 $-CH_2C^{\circ}CH$를 포함한다.

[0062] 용어 "아릴"은 고리를 형성하는 각각의 원자가 탄소 원자인 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 라디칼을 의미한다. 아릴 기는 임의로 치환될 수 있다. 아릴 기의 예는 페닐 및 나프틸을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 아릴은 페닐이다. 아릴 기는 구조에 따라 모노라디칼 또는 디라디칼(즉, 아릴렌 기)일 수 있다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 용어 "아릴" 또는 접두사 "아르"(예컨대, "아르알킬"에서)는 임의로 치환된 아릴 라디칼을 포함하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 아릴 기는 본원에서 정의된 부분적으로 환원된 사이클로알킬 기(예를 들어, 1,2-디하이드로나프탈렌)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 아릴 기는 본원에서 정의된 완전히 환원된 사이클로알킬 기(예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌)를 포함한다. 아릴이 사이클로알킬 기를 포함하는 경우, 아릴은 방향족 고리 탄소 원자를 통해 분자의 나머지 부분에 결합된다. 아릴 라디칼은 융합, 스피로 또는 가교 고리 시스템을 포함할 수 있는 단환형 또는 다환형(예를 들어, 이환형, 삼환형 또는 사환형) 고리 시스템일 수 있다.

[0063] 용어 "사이클로알킬"은 고리를 형성하는 각각의 원자(즉, 골격 원자)가 탄소 원자인 단환형 또는 다환형 비방향족 라디칼을 의미한다. 일부 실시양태에서, 사이클로알킬은 포화되거나 부분적으로 불포화된다. 일부 실시양태에서, 사이클로알킬은 스피로환형 또는 가교 화합물이다. 일부 실시양태에서, 사이클로알킬은 방향족 고리와 융합된다(이 경우 사이클로알킬은 비방향족 고리 탄소 원자를 통해 결합된다). 사이클로알킬 기는 3개 내지 10개의 고리 원자를 가진 기를 포함한다. 대표적인 사이클로알킬은 3개 내지 10개의 탄소 원자, 3개 내지 8개의 탄소 원자, 3개 내지 6개의 탄소 원자, 또는 3개 내지 5개의 탄소 원자를 가진 사이클로알킬을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 단환형 사이클로알킬 라디칼은 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단환형 사이클로알킬은 사이클로펜틸이다. 일부 실시양태에서, 단환형 사이클로알킬은 사이클로펜테닐 또는 사이클로헥세닐이다. 일부 실시양태에서, 단환형 사이클로알킬은 사이클로펜테닐이다. 다환형 라디칼은 예를 들어, 아다만틸, 1,2-디하이드로나프탈레닐, 1,4-디하이드로나프탈레닐, 테트라이닐, 데칼리닐, 3,4-디하이드로나프탈레닐-1(2H)-온, 스피로[2.2]펜틸, 노르보르닐 및 비사이클[1.1.1]펜틸을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 사이클로알킬 기는 임의로 치환될 수 있다.

[0064] 용어 "헤테로알킬렌" 또는 "헤테로알킬렌 쇄"는 분자의 나머지 부분을 라디칼 기에 연결하는 선형 또는 분지형 2가 헤테로알킬 쇄를 의미한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 헤테로알킬 또는 헤테로알킬렌 기는 아래 설명된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다. 대표적인 헤테로알킬렌 기는 $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-N(\text{알킬})-CH_2-$, $-CH_2-N(\text{아릴})-CH_2-$, $-OCH_2CH_2O-$, $-OCH_2CH_2OCH_2CH_2O-$, 또는 $-OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2O-$를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0065] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 질소, 산소 및 황으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 사이클로알킬 기를 의미한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 헤테로사이클로알킬 라디칼은 융합(아릴 또는 헤테로아릴 고리와 융합될 때, 헤테로사이클로알킬은 비방향족 고리 원자를 통해 결합됨) 또는 가교 고리 시스템을 포함할 수 있는 단환형 또는 이환형 고리 시스템일 수 있다. 헤테로사이클릴 라디칼의 질소, 탄소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있다. 질소 원자는 임의로 4차화될 수 있다. 헤테로사이클로알킬 라디칼은 부분적으로 또는 완전히 포화되어 있다. 헤테로사이클로알킬 라디칼의 예는 디옥솔라닐, 티에닐[1,3]디티아닐, 테트라하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로이소퀴놀릴, 데카하이드로퀴놀릴, 데카하이드로이소퀴놀릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 2-옥소피페라지닐, 2-옥소피페리디닐, 2-옥소피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 4-피페리도닐, 피롤리디닐, 피라졸리디닐, 퀴누클리디닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로푸릴, 트리티아닐, 테트라하이드로피라닐, 티오모르폴리닐, 티아모르폴리닐, 1-옥소-티오모르폴리닐, 1,1-디옥소-티오모르폴리닐을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 용어 헤테로사이클로알킬은 단당류, 이당류 및 올리고당류를 포함하나 이들로 제한되지 않는 모든 고리 형태의 탄수화물도 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 12개의 탄소를 가진다. 일부 실시양태에서, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 10개의 탄소를 가진다. 일부 실시양태에서, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 10개의 탄소 및 1개 또는 2개의 N 원자를 가진다. 일부 실시양태에서, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 10개의 탄소 및 3개 또는 4개의 N 원자를 가진다. 일부 실시양태에서, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 12개의 탄소, 0개 내지 2개의 N 원자, 0개 내지 2개의 O 원자, 0개 내지 2개의 P 원자, 및 0개 또는 1개의 S 원자를 가진다. 일부 실시양태에서, 헤테로사이클로알킬은 고리 내에 2개 내지 12개의 탄소, 1개 내지 3개의 N 원자, 0개 또는 1개의 O 원자 및 0개 또는 1개의 S 원자를 가진다. 헤테로사이클로알킬의 탄소 원자 수를 언급할 때, 헤테로사이클로알킬의 탄소 원자 수는 헤테로사이클로알킬을 구성하는 원자(헤테로원자를 포함함)(즉, 헤테로사이클로알킬 고리의 골격 원자)의 총 수와 동일하지 않은 것으로 이해된다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 헤테로사이클로알킬 기는 임의로 치환될 수 있다.

[0066] 용어 "헤테로아릴"은 질소, 산소 및 황으로부터 선택된 하나 이상의 고리 헤테로원자를 포함하는 아릴 기를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 단환형 또는 이환형 헤테로아릴이다. 단환형 헤테로아릴의 예시적인 예는 피리디닐, 이미다졸릴, 피리미디닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 푸릴, 티에닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피롤릴, 피리다지닐, 트리아지닐, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 푸라자닐, 인돌리진, 인돌, 벤조푸란, 벤조티오펜, 인다졸, 벤즈이미다졸, 퓨린, 퀴놀리진, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 신놀린, 프탈라진, 퀴나졸린, 퀴녹살린, 1,8-나프티리딘 및 프테리딘을 포함한다. 단환형 헤테로아릴의 예시적인 예는 피리디닐, 이미다졸릴, 피리미디닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 피라지닐, 테트라졸릴, 푸릴, 티에닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이소티아졸릴, 피롤릴, 피리다지닐, 트리아지닐, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴 및 푸라자닐을 포함한다. 이환형 헤테로아릴의 예시적인 예는 인돌리진, 인돌, 벤조푸란, 벤조티오펜, 인다졸, 벤즈이미다졸, 퓨린, 퀴놀리진, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 신놀린, 프탈라진, 퀴나졸린, 퀴녹살린, 1,8-나프티리딘 및 프테리딘을 포함한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 티아졸릴, 티에닐, 티아디아졸릴 또는 푸릴이다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 고리 내에 0개 내지 6개의 N 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 고리 내에 1개 내지 4개의 N 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 고리 내에 4개 내지 6개의 N 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 고리 내에 0개 내지 4개의 N 원자, 0개 또는 1개의 O 원자, 0개 또는 1개의 P 원자, 및 0개 또는 1개의 S 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 고리 내에 1개 내지 4개의 N 원자, 0개 또는 1개의 O 원자, 및 0개 또는 1개의 S 원자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴은 C_1-C_9 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, 단환형 헤테로아릴은 C_1-C_5 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, 단환형 헤테로아릴은 5원 또는 6원 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, 이환형 헤테로아릴은 C_6-C_9 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴 기는 본원에서 정의된 부분적으로 환원된 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 기(예를 들어, 7,8-디하이드로퀴놀린)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 헤테로아릴 기는 본원에서 정의된 완전히 환원된 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 기(예를 들어,

5,6,7,8-테트라하이드로퀴놀린)를 포함한다. 헤테로아릴이 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 기를 포함하는 경우, 헤테로아릴은 헤테로방향족 고리 탄소 또는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지 부분에 결합된다. 헤테로아릴 라디칼은 융합, 스피로 또는 가교 고리 시스템을 포함할 수 있는 단환형 또는 다환형(예를 들어, 이환형, 삼환형 또는 사환형) 고리 시스템일 수 있다.

[0067] 용어 "임의로 치환된" 또는 "치환된"은 언급된 기가 D, 할로겐, -CN, $-NH_2$, -NH(알킬), $-N(알킬)_2$, -OH, $-CO_2H$, $-CO_2$알킬, $-C(=O)NH_2$, -C(=O)NH(알킬), $-C(=O)N(알킬)_2$, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2NH(알킬)$, $-S(=O)_2N(알킬)_2$, 알킬, 사이클로알킬, 플루오로알킬, 헤테로알킬, 알콕시, 플루오로알콕시, 헤테로사이클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 아릴옥시, 알킬티오, 아릴티오, 알킬설폭사이드, 아릴설폭사이드, 알킬설폰 및 아릴설폰으로부터 개별적 및 독립적으로 선택된 하나 이상의 추가 기(들)로 임의로 치환된다는 것을 의미한다. 일부 다른 실시양태에서, 임의적 치환기는 D, 할로겐, -CN, $-NH_2$, $-NH(CH_3)$, $-N(CH_3)_2$, -OH, $-CO_2H$, $-CO_2(C_1-C_4$알킬), $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NH(C_1-C_4$알킬), $-C(=O)N(C_1-C_4$알킬$)_2$, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2NH(C_1-C_4$알킬), $-S(=O)_2N(C_1-C_4$알킬$)_2$, C_1-C_4알킬, C_3-C_6사이클로 알킬, C_1-C_4플루오로알킬, C_1-C_4헤테로알킬, C_1-C_4알콕시, C_1-C_4플루오로알콕시, $-SC_1-C_4$알킬, $-S(=O)C_1-C_4$알킬 및 $-S(=O)_2C_1-C_4$알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 임의적 치환기는 D, 할로겐, -CN, $-NH_2$, -OH, $-NH(CH_3)$, $-N(CH_3)_2$, -NH(사이클로프로필), $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CF_3$, $-OCH_3$ 및 $-OCF_3$으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 치환된 기는 상기 기들 중 1개 또는 2개의 기로 치환된다. 일부 실시양태에서, 지방족 탄소 원자(비환형 또는 환형) 상의 임의적 치환기는 옥소(=O)를 포함한다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, "AJICAP™ 기술", "AJICAP™ 방법" 및 유사한 용어는 친화성 펩티드를 사용하여 원하는 작용화를 원하는 부위에 전달하는, 항체 및 관련 분자를 부위 특이적으로 작용화하는 시스템 및 방법(현재 아지노모토 바이오-파마 서비시스(Ajinomoto Bio-Pharma Services)("아지노모토")에 의해 생산됨)을 의미한다. AJICAP™ 방법에 대한 일반적인 프로토콜은 적어도 PCT 공개 제WO2018199337A1호, PCT 공개 제WO2019240288A1호, PCT 공개 제WO2019240287A1호, PCT 공개 제WO2020090979A1호, 문헌[Matsuda et al., *Mol. Pharmaceutics* 2021, 18, 4058-4066] 및 문헌[Yamada et al., AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 5592-5597], 및 특히 미국 특허 공개 제US20200190165A1호의 실시예 2 내지 4에서 확인된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 항체 Fc 영역(예를 들어, IgG1 Fc 영역)의 위치 246, 위치 248, 위치 288, 위치 290 및 위치 317(EU 넘버링)로부터 선택된 위치에 있는 라이신 잔기에서 원하는 작용화를 부위 특이적으로 통합시킨다. 일부 실시양태에서, 원하는 작용화는 항체 Fc 영역의 잔기 위치 248(EU 넘버링)에서 통합된다. 일부 실시양태에서, 위치 248은 인간 IgG CH2 영역의 18번째 잔기(EU 넘버링)에 상응한다.

[0069] 조성물 AA는 잔기 Y45에 부착된 약 0.5 kDa PEG 기 및 잔기 F42Y에 부착된 두 번째 약 0.5 kDa PEG 기를 함유하는, 서열번호 3으로 제시된 서열을 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드를 의미한다.

[0070] 조성물 AB는 잔기 Y45에 부착된 약 0.5 kDa PEG 기 및 잔기 F42Y에서 접합을 용이하게 하기 위해 아지드 작용기로 캡핑된 0.5 kDa PEG 기를 함유하는, 서열번호 3으로 제시된 서열을 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드를 지칭한다. 조성물 AB의 만화 이미지가 도 1b에 제시되어 있다. 조성물 AB 및 관련 변형된 IL-2 폴리펩티드는 전체가 기재된 것처럼 본원에 참고로 포함되는 PCT 공개 제WO2021140416A2호에 기재되어 있다. 조성물 AB에 부착된 중합체는 조성물 AB와 IL-2 수용체 알파 서브유닛의 상호작용을 파괴하고 IL-2 수용체 베타 서브유닛 신호전달에 유리한 쪽으로 분자를 편향시키도록 작용함으로써, 생체내에서 T_{eff} 세포를 증폭시키고/시키거나 자극하는 상기 IL-2 폴리펩티드의 능력을 야생형 IL-2에 비해 향상시킨다.

[0071] 조성물 AC는 잔기 F42Y 및 Y45에 부착된 약 0.5 kDa PEG 기를 함유하는, 서열번호 3으로 제시된 서열을 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드를 의미한다. 조성물 AC는 글루타르산 링커 작용기를 통해 커플링된 약 0.5 kDa PEG(본원에서 제공된 구조 7 참조)를 통해 N-말단 A 잔기에 부착된 아지드 접합 핸들을 함유한다.

[0072] 조성물 A는 조성물 AB와 항-PD-1 항체 펨브롤리주맙 또는 LZM-009의 반응으로부터 제조된 항-PD-1 항체/IL-2 접합체를 의미한다. 조성물 A는 조성물 AB의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 A는 1의 약물-항체 비를 가진다.

[0073] 조성물 B는 조성물 AB의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기

를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 B는 1.5의 약물-항체 비를 가진다.

[0074] 조성물 C는 조성물 AB의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 C는 2의 약물-항체 비를 가진다.

[0075] 조성물 D는 조성물 AB의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K288(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 D는 1의 약물-항체 비를 가진다.

[0076] 조성물 E는 조성물 AB의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K288(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 E는 2의 약물-항체 비를 가진다.

[0077] 조성물 F는 조성물 AC의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 F는 1의 약물-항체 비를 가진다.

[0078] 조성물 G는 조성물 AC의 아지드 작용기와 펨브롤리주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 펨브롤리주맙에 추가한다. 조성물 G는 2의 약물-항체 비를 가진다.

[0079] 조성물 H는 조성물 AB의 아지드 작용기와 LZM-009의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 LZM-009에 추가한다. 조성물 H는 1의 약물-항체 비를 가진다.

[0080] 조성물 I는 조성물 AB의 아지드 작용기와 LZM-009의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 LZM-009에 추가한다. 조성물 I는 2의 약물-항체 비를 가진다.

[0081] 조성물 J는 조성물 AB의 아지드 작용기와 LZM-009의 Fc 영역의 잔기 K288(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 LZM-009에 추가한다. 조성물 J는 1의 약물-항체 비를 가진다.

[0082] 조성물 K는 조성물 AB의 아지드 작용기와 LZM-009의 Fc 영역의 잔기 K288(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 LZM-009에 추가한다. 조성물 K는 2의 약물-항체 비를 가진다.

[0083] 조성물 N은 조성물 AB의 아지드 작용기와 트라스투주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 트라스투주맙에 추가한다. 조성물 N은 1.6의 약물-항체 비를 가진다.

[0084] 조성물 O는 조성물 AB의 아지드 작용기와 트라스투주맙의 Fc 영역의 잔기 K248(EU 넘버링)에 부착된 DBCO 작용기의 반응으로부터 형성된다. 아지노모토의 AJICAP 기술에 따라 친화성 펩티드 시스템을 사용하여 DBCO 작용기를 트라스투주맙에 추가한다. 조성물 O는 1의 약물-항체 비를 가진다. 모든 면역사이토카인 조성물의 개요가 아래 표에 제시되어 있다.

조성물의 개요

조성물	항체	VH 서열번호	VL 서열번호	IL-2 폴리펩티드 조성물	IL-2 폴리펩티드 서열번호	DAR	접합 부위
A	펨브롤리주맙	46	47	AB	3	1	K248
B	펨브롤리주맙	46	47	AB	3	1.5	K248
C	펨브롤리주맙	46	47	AB	3	2	K248
D	펨브롤리주맙	46	47	AB	3	1	K288
E	펨브롤리주맙	46	47	AB	3	2	K288
F	펨브롤리주맙	46	47	AC	3	1	K248
G	펨브롤리주맙	46	47	AC	3	2	K248
H	LZM-009	76	77	AB	3	1	K248
I	LZM-009	76	77	AB	3	2	K248
J	LZM-009	76	77	AB	3	1	K288
K	LZM-009	76	77	AB	3	2	K288
N	트라스투주맙	121	122	AB	3	1.6	K248
O	트라스투주맙	121	122	AB	3	1	K248

[0085]

[0086] **사이토카인에 접합된 항-PD-1 폴리펩티드**

[0087] 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1 및 CD279로서도 알려짐)은 T 세포 염증 활성을 억제함으로써 면역 시스템을 하향조절하고 자가 관용을 촉진하는 역할을 하는 세포 표면 수용체이다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수 세포에서 발현되는 면역 세포 억제 분자이다. PD-1은 면역 체크포인트를 대표하고, 조절 T 세포의 아폽토시스를 감소시키면서, 림프절에서 항원 특이적 T 세포의 아폽토시스(프로그래밍된 세포 사멸)를 촉진하는 이중 기작을 통해 자가면역으로부터 보호한다. PD-1은 T 및 B 세포 면역에 영향을 미치는 음성 신호를 전달하는 CD28/CTLA-4/ICOS 보조자극 수용체 계열의 구성원이다. PD-1은 모두 디설파이드 연결된 동종이량체인 CTLA-4 및 다른 계열 구성원과 대조적으로 용액 및 세포 표면 둘 다에서 단량체이다. 그의 리간드인 PD-L1과 결합할 때 PD-1 억제 수용체를 통한 신호전달은 자가항원 및 종양에 대한 면역 반응을 억제하고 말초 면역 관용을 유지하는 역할을 한다. PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구의 감소, T 세포 수용체 매개 증식의 감소, 및 암세포의 면역 회피를 초래한다. 비제한적 예시적인 인간 PD-1 아미노산 서열은 하기 서열이다:

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSF
SNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR
ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV
VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGEL
DFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHC

[0088] SWPL(서열번호 120).

[0089] 본원은 하나 이상의 사이토카인 분자 또는 이의 유도체에 접합된, 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 결합하는 폴리펩티드, 예컨대, 항체 및 항-PD-1 항원 결합 단편을 제공한다. 본원에서 제공된 접합체는 사이토카인, 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 CD8+ T 이펙터(T_{eff}) 세포와 같은 표적 세포에 동시적으로 전달하는 데 효과적이다. 이처럼 두 작용제를 동일한 세포에 동시적으로 전달하는 것은 IL-2 폴리펩티드 선택성의 개선, IL-2의 치료 잠재력의 향상, 및 IL-2 요법의 투여로 인한 부작용 위험의 잠재적 감소를 포함하는 수많은 이점을 가진다.

[0090] 본원에서 제공된 접합체 조성물은 링커를 사용하여 PD-1에 결합하는 폴리펩티드를 사이토카인, 예컨대, IL-2 폴리펩티드 및 이의 유도체에 부착시킨다. 일부 실시양태에서, 링커는 특정 잔기 또는 특정 잔기 서브세트에서 각각의 모이어티(PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 및 사이토카인)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 접합체 집단이 실질적으로 균일하도록 부위 선택적 방식으로 각각의 모이어티에 부착된다. 이것은 접합 반응을 위한 시약을 접합될 모이어티에 부위 선택적으로 첨가하는 방식, 접합 반응을 위한 원하는 시약으로 접합될 모이어티를 합성하거나 제조하는 방식, 또는 이들 두 방식의 조합을 포함하는, 본원에서 제공된 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 이들 방식을 이용하여, 링커가 각각의 모이어티에 부착되는 부위(예컨대, 특정 아미노산 잔기)를 정확하게 선택할 수 있다. 추가로, 이들 방식은 융합 단백질에 필요한 아미노산 잔기로 제한되지 않는 다양한 링커들이 조성물에 사용될 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 링커 선택과 모이어티에의 정확한 부착의 이

조합은 예를 들어, 링커가 사이토카인의 수용체와 상호작용하는 위치에서 사이토카인에 부착되는 경우, 링커가 모이어티들 중 하나의 모이어티의 활성을 조절하는 기능도 수행할 수 있게 한다.

[0091] **항-PD-1 폴리펩티드**

[0092] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD-1 폴리펩티드는 PD-1에 특이적으로 결합한다. 항-PD-1 폴리펩티드는 다른 물질에 결합하는 것보다 더 큰 친화성 및 결합력으로 더 쉽게 및/또는 더 긴 지속시간 동안 결합하는 경우 표적에 선택적으로 결합하거나 우선적으로 결합한다. 따라서, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 반드시 배타적 결합을 (포함할 수는 있지만) 요구하지는 않는다. 일반적으로, 반드시 그런 것은 아니지만, 특이적 결합의 언급은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 친화성이 무관한 아미노산 서열에 대한 항체의 친화성보다 적어도 2배 더 크거나, 적어도 3배 더 크거나, 적어도 4배 더 크거나, 적어도 5배 더 크거나, 적어도 6배 더 크거나, 적어도 7배 더 크거나, 적어도 8배 더 크거나, 적어도 9배 더 크거나, 적어도 10배 더 크거나, 적어도 20배 더 크거나, 적어도 30배 더 크거나, 적어도 40배 더 크거나, 적어도 50배 더 크거나, 적어도 60배 더 크거나, 적어도 70배 더 크거나, 적어도 80배 더 크거나, 적어도 90배 더 크거나, 적어도 100배 더 크거나, 적어도 1000배 더 큰 경우 우선적 결합을 의미한다. 본 개시내용의 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 PD-1과 리간드(예를 들어, PD-L1)의 상호작용을 차단할 수 있다.

[0093] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 항원 결합 도메인이거나 항원 결합 도메인에 대한 상동성을 가진 결합 도메인을 가진 면역글로불린(Ig), 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 이 용어는 "항원 결합 단편", 및 아래에 설명된 유사한 결합 단편에 대한 다른 교환 가능한 용어도 포함한다. 천연 항체 및 천연 면역글로불린(Ig)은 일반적으로 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. 각각의 경쇄는 전형적으로 1개의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설파이드 결합의 수는 다양한 면역글로불린 이소타입(isotype)의 중쇄에 따라 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적으로 이격된 쇄내 디설파이드 가교도 가진다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에서 가변 도메인("V_H")에 이어 다수의 불변 도메인("C_H")을 가진다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에서 가변 도메인("V_L")을 갖고 그의 다른 쪽 말단에서 불변 도메인("C_L")을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 경계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0094] 일부 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 단리된 항체 또는 항원 결합 단편, 정제된 항체 또는 항원 결합 단편, 재조합 항체 또는 항원 결합 단편, 변형된 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 합성 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[0095] 본원의 항체 및 항원 결합 단편은 부분적으로 또는 전체적으로 합성에 의해 생성될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편은 항원 결합 도메인일 수 있거나 항원 결합 도메인에 대한 상동성을 가질 수 있는 결합 도메인을 가진 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있다. 한 예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 적절한 생체내 동물 모델에서 생성된 후, 단리될 수 있고/있거나 정제될 수 있다.

[0096] 면역글로불린(Ig)은 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스로 배정될 수 있다. 면역글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들 중 일부는 서브클래스(이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나누어질 수 있다. 일부 경우, Ig 또는 이의 일부는 인간 Ig일 수 있다. 일부 경우, C_H3 도메인은 면역글로불린으로부터 유래할 수 있다. 일부 경우, 항체 또는 항원 결합 단편, 변형된 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 결합제의 쇄 또는 일부는 Ig로부터 유래할 수 있다. 이러한 경우, Ig는 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM일 수 있거나, 이들로부터 유래한다. Ig가 IgG인 경우, 이것은 IgG의 서브타입일 수 있으며, 이때 IgG의 서브타입은 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 또는 IgG4를 포함할 수 있다. 일부 경우, C_H3 도메인은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린으로부터 유래할 수 있거나, 이들로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG를 포함하거나, 이로부터 유래한다. 일부 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG1을 포함하거나, 이로부터 유래한다. 일부 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG4를 포함하거나, 이로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 IgM을 포함하거나, 이로부터 유래하거나, IgM의 단량체 형태이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 IgE를 포함하거나, 이로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 IgD를 포함하거나, 이로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 IgA를 포함하거나, 이로부터 유래한다.

[0097] 임의의 척추동물 종의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파("κ" 또는 "K") 또는 람다("λ")로 지칭되는 2가지 명확히 상이한 유형의 경쇄로 배정될 수 있다.

[0098] 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각은 초가변 영역으로서도 알려진 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 각각의 쇄에서 CDR은 FR에 의해 서로 매우 가깝게 배치되어 있으며, 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 적어도 2가지 기법이 있다: (1) 종간 서열 가변성 기반 접근법(예를 들어, 문헌[Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th *Ed.*, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1991), pages 647-669]; 이하 "카바트") 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학 연구 기반 접근법(Al-Iazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948). 본원에서 사용된 바와 같이, CDR은 상기 두 접근법 중 어느 한 접근법, 또는 상기 두 접근법의 조합에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다.

[0099] 항체와 관련하여, 용어 "가변 도메인"은 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용되는 항체의 가변 도메인을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포되어 있지 않다. 오히려, 이것은 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역(CDR로서도 알려짐)으로 불리는 3개의 분절에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 "프레임워크 영역" 또는 "FR"로서 지칭된다. 비변형 중쇄와 경쇄의 가변 도메인 각각은 β-시트 구조를 연결하는 루프를 형성하고 일부 경우 β-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 CDR이 산재되어 있는 β-시트 구성을 주로 채택하는 4개의 FR(FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 함유한다. 각각의 쇄의 CDR은 FR에 의해 매우 가깝게 함께 배치되며, 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(카바트 참조).

[0100] 본원에서 사용될 때 용어 "초가변 영역" 및 "CDR"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. CDR은 항원에 상보적인 방식으로 결합하는 3개의 서열 영역의 아미노산 잔기를 포함하며 V_H 및 V_L 쇄 각각에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 알려져 있다. 경쇄 가변 도메인에서 CDR은 전형적으로 대략 잔기 24-34(CDRL1), 50-56(CDRL2) 및 89-97(CDRL3)에 상응하고, 중쇄 가변 도메인에서 CDR은 전형적으로 카바트에 따른 대략 잔기 31-35(CDRH1), 50-65(CDRH2) 및 95-102(CDRH3)에 상응한다. 상이한 항체의 CDR은 삽입을 함유할 수 있으므로 아미노산 넘버링은 상이할 수 있다는 것이 이해된다. 카바트 넘버링 시스템은 특정 잔기에 부착된 문자(예를 들어, 경쇄의 CDRL1의 27A, 27B, 27C, 27D, 27E 및 27F)를 이용하여 상이한 항체들 사이의 넘버링에서 임의의 삽입을 반영하는 넘버링 체계로 이러한 삽입을 설명한다. 대안적으로, 경쇄 가변 도메인에서 CDR은 전형적으로 대략 잔기 26-32(CDRL1), 50-52(CDRL2) 및 91-96(CDRL3)에 상응하고, 중쇄 가변 도메인에서 CDR은 전형적으로 초티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)에 따른 대략 잔기 26-32(CDRH1), 53-55(CDRH2) 및 96-101(CDRH3)에 상응한다(*J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)).

[0101] 본원에서 사용된 바와 같이, "프레임워크 영역", "FW" 또는 "FR"은 항원 결합 포켓 또는 홈의 일부를 형성하는 프레임워크 아미노산 잔기를 의미한다. 일부 실시양태에서, 프레임워크 잔기는 항원 결합 포켓 또는 홈의 일부인 루프를 형성하고, 루프의 아미노산 잔기는 항원과 접촉할 수 있거나 접촉하지 않을 수 있다. 프레임워크 영역은 일반적으로 CDR 사이의 영역을 포함한다. 경쇄 가변 도메인에서 FR은 전형적으로 대략 잔기 0-23(FRL1), 35-49(FRL2), 57-88(FRL3) 및 98-109에 상응하고, 중쇄 가변 도메인에서 FR은 전형적으로 카바트(Kabat)에 따른 대략 잔기 0-30(FRH1), 36-49(FRH2), 66-94(FRH3) 및 103-133에 상응한다. 경쇄에 대한 카바트 넘버링과 함께 상기 논의된 바와 같이, 중쇄도 유사한 방식으로 삽입을 설명한다(예를 들어, 중쇄의 CDRH1의 35A, 35B). 대안적으로, 경쇄 가변 도메인에서 FR은 전형적으로 대략 잔기 0-25(FRL1), 33-49(FRL2), 53-90(FRL3) 및 97-109(FRL4)에 상응하고, 중쇄 가변 도메인에서는 FR은 전형적으로 상기 초티아 및 레스크에 따른 대략 잔기 0-25(FRH1), 33-52(FRH2), 56-95(FRH3) 및 102-113 (FRH4)에 상응한다. FR의 루프 아미노산은 항체 중쇄 및/또는 항체 경쇄의 3차원 구조를 검사함으로써 평가되고 결정될 수 있다. 3차원 구조는 용매 접근 가능한 아미노산 위치에 대해 분석될 수 있는데, 이는 이러한 위치가 루프를 형성하고/하거나 항체 가변 도메인에서 항원 접촉을 제공할 가능성이 있기 때문이다. 용매 접근 가능한 위치들 중 일부는 아미노산 서열 다양성을 허용할 수 있고, 다른 위치(예를 들어, 구조적 위치)는 일반적으로 덜 다양화된다. 항체 가변 도메인의 3차원 구조는 결정 구조 또는 단백질 모델링으로부터 유도될 수 있다.

[0102] 본 개시내용에서, (괄호 안의) 하기 약어는 필요에 따라 관례에 맞게 사용된다: 중쇄(H 쇄), 경쇄(L 쇄), 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), 상보성 결정 영역(CDR), 제1 상보성 결정 영역(CDR1), 제2 상보성 결정 영역(CDR2), 제3 상보성 결정 영역(CDR3), 중쇄 제1 상보성 결정 영역(VH CDR1), 중쇄 제2 상보성 결정 영역(VH

CDR2), 중쇄 제3 상보성 결정 영역(VH CDR3), 경쇄 제1 상보성 결정 영역(VL CDR1), 경쇄 제2 상보성 결정 영역(VL CDR2), 및 경쇄 제3 상보성 결정 영역 (VL CDR3).

[0103] 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는 데 사용된다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기 또는 Pro230부터 그의 카르복실 말단까지 뻗어 있는 것으로 정의된다. Fc 영역의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같이 EU 지수의 넘버링이다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인인 C_H2 및 C_H3을 포함한다.

[0104] 본 개시내용에 유용한 "항체"는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 이종접합체 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 이식 항체, 탈면역화 항체, 이들의 돌연변이체, 이들의 융합체, 이들의 면역접합체, 이들의 항원 결합 단편, 및/또는 항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유적으로 변형된 항체를 비롯한, 필요한 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 구성의 면역글로불린 분자를 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 본원에서 제공된 방법 및 접합체의 특정 실시양태에서, 항체는 항체와 단백질 사이에 링커의 부착(예를 들어, AJICAP™ 기술에서와 같이 친화성 펩티드를 사용한 링커의 부착)을 가능하게 하기 위해 Fc 영역을 필요로 한다.

[0105] 일부 경우, 항체는 단일클론 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "단일클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미하며, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 생성 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 전형적으로 다양한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 다양한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제제와 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일 결정인자(에피토프)에 대해 유도된다. 수식어 "단일클론"은 항체의 특성을 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는 것으로서 표시하고 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

[0106] 일부 경우, 항체는 인간화 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "인간화" 항체는 비인간 면역글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 특정 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇄 또는 이의 단편인 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 형태를 의미한다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용체의 상보성 결정 영역(CDR)의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 생물학적 활성을 가진 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비인간 종(공여체 항체)의 CDR의 잔기로 대체되어 있는 인간 면역글로불린(수용체 항체)이다. 일부 경우, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화 항체는 수용체 항체 및 이입된 CDR 또는 프레임워크 서열 둘 다에서는 발견되지 않지만 항체 성능을 더 개선하고 최적화하기 위해 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함하고, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로불린의 CDR 영역에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 FR 영역이다. 인간화 항체는 최적으로 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부도 포함할 것이다. 항체는 예를 들어, WO 99/58572에 설명된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 가질 수 있다. 다른 형태의 인간화 항체는 원래 항체의 하나 이상의 CDR "로부터 유래한" 하나 이상의 CDR로서도 지칭되는, 원래 항체에 비해 변경된 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 CDR을 가진다.

[0107] 필요한 경우, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 면역원성에 대해 평가될 수 있고, 필요에 따라 탈면역화될 수 있다(즉, 하나 이상의 T 세포 에피토프를 변경함으로써 항체가 더 낮은 면역반응성을 갖게 만든다). 본원에서 사용된 바와 같이, "탈면역화 항체"는 항체를 대상체에게 투여한 후 T 세포 반응이 탈면역화되지 않은 항체에 비해 감소되도록 항체 서열의 하나 이상의 T 세포 에피토프가 변형되었음을 의미한다. 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 단편에 존재하는 면역원성 및 T 세포 에피토프의 분석은 소프트웨어 및 특정 데이터베이스의 사용을 통해 수행될 수 있다. 예시적인 소프트웨어 및 데이터베이스는 영국 케임브리지의 안티토프(Antitope)에 의해 개발된 iTope™를 포함한다. iTope™는 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 결합하는 펩티드를 분석하는 인 실리코(*in silico*) 기술이다. iTope™ 소프트웨어는 인간 MHC 클래스 II 대립유전자에 결합하는 펩티드를 예측함으로써, 이러한 "잠재적인 T 세포 에피토프"의 위치에 대한 초기 스크린을 제공한다. iTope™ 소프트웨어는 34개의 인간 MHC 클래스 II 대립유전자의 결합 홈 내부에서 펩티드의 아미노산 측쇄와 특정 결합 포켓 사이의 유리한 상호작용을 예측한다. 핵심 결합 잔기의 위치는 시험 항체 가변 영역 서열에 걸쳐 있는, 1개의 아미노산에 의해 중첩되는 9mer 펩티드의 인 실리코 생성에 의해 달성된다. 각각의 9mer 펩티드는 34개의 MHC 클래스 II 알로타입 각각에 대해 시험될 수 있으며 그들의 잠재적인 "적합도(fit)" 및 MHC 클래스 II 결합 홈과의 상호작용을 기준으로 점수화될 수 있다. MHC 클래스 II 대립유전자의 >50%에 대해 높은 평균 결합 점수(iTope™ 점수

화 함수에서 >0.55)를 생성하는 펩티드는 잠재적인 T 세포 에피토프로서 간주된다. 이러한 영역에서, MHC 클래스 II 홈 내부에서 펩티드 결합을 위한 핵심 9개 아미노산 서열을 분석하여 MHC 클래스 II 포켓 잔기(P1, P4, P6, P7 및 P9) 및 가능한 T 세포 수용체(TCR) 접촉 잔기(P-1, P2, P3, P5, P8)를 확인한다. 임의의 T 세포 에피토프를 식별한 후, 아미노산 잔기 변화, 치환, 추가 및/또는 결실을 도입하여 식별된 T 세포 에피토프를 제거할 수 있다. 이러한 변화는 식별된 에피토프를 여전히 제거하면서 항체 구조와 기능을 보존하도록 만들어질 수 있다. 예시적인 변화는 보존적 아미노산 변화를 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다.

[0108] 항체는 인간 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체, 및/또는 인간 항체를 제조하는 임의의 적합한 기법을 이용함으로써 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 가진 항체를 의미한다. 인간 항체의 이러한 정의는 적어도 하나의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 적어도 하나의 인간 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다. 이러한 예 중 하나는 뮤린 경쇄와 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체이다. 한 실시양태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되고, 이때 상기 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌를 형질전환 동물, 예를 들어, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화되어 있는 마우스에 도입함으로써 제조될 수도 있다. 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대해 유도된 항체를 생성하는 인간 B 림프구를 불멸화시킴으로써 제조될 수 있다(이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나 시험관내에서 면역화되었을 수 있다).

[0109] 본원의 임의의 항체는 이중특이적일 수 있다. 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 가진 항체이며, 본원에 개시된 항체를 사용함으로써 제조될 수 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 제조는 상이한 특이성을 가진 2개의 중쇄를 가진 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공발현을 기반으로 하였다. 이중특이적 항체는 한쪽 아암에서 제1 결합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에서 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성될 수 있다. 이중특이적 분자의 절반에서만 면역글로불린 경쇄를 가진 이러한 비대칭 구조는 원하지 않는 면역글로불린 쇄 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다.

[0110] 이중특이적 항체를 제조하는 한 가지 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성을 가진 항체 가변 도메인(항체-항원 조합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용함으로써 달성될 수 있다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)은 융합체 중 적어도 하나에 존재할 수 있다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별도의 발현 벡터에 삽입하고 적합한 숙주 유기체에 공형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 쇄의 동등하지 않은 비가 최적 수율을 제공할 때 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는 데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄를 동등한 비로 발현시켜 높은 수율을 얻을 때 또는 상기 비가 특별한 의미가 없을 때 2개 또는 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0111] 일부 경우, 본원의 항체는 키메라 항체이다. 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "키메라" 형태는 비인간 Ig로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 항체를 포함한다. 대부분의 경우, 키메라 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 Fc의 적어도 일부가 뮤린 Fc 대신에 삽입되어 있는 뮤린 항체이다. 키메라 또는 하이브리드 항체는 가교결합제를 사용하는 합성 단백질 화학반응을 비롯한 합성 단백질 화학반응의 적합한 방법을 이용함으로써 시험관내에서도 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 디설파이드 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캡토부티르이미데이트를 포함한다.

[0112] 본원은 항체 및 이의 항원 결합 단편, 변형된 항체 및 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 표적 항원의 하나 이상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 결합제를 제공한다. 한 경우, 결합제는 단일 항원의 에피토프에 선택적으로 결합한다. 또 다른 경우, 결합제는 2가이며 단일 항원의 2개의 상이한 에피토프에 선택적으로 결합하거나 2개의 상이한 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 또 다른 경우, 결합제는 다가(즉, 3가, 4가 등)이고, 결합제는 단일 항원의 3개 이상의 상이한 에피토프에 결합하거나 2개 이상의(다수의) 항원의 3개 이상의 상이한 에피토프에 결합한다.

[0113] 본원의 임의의 항체의 항원 결합 단편도 고려된다. 용어 "항체의 항원 결합 부분", "항원 결합 단편", "항원 결합 도메인", "항체 단편" 또는 "항체의 기능성 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭하기 위해 본원에서 교환 가능하게 사용된다. 대표적인 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 이중특이적 $F(ab')_2$, 삼중특이적 $F(ab')_2$, 가변 단편(Fv), 단일 쇄 가변 단편(scFv), dsFv, 이중특이

적 scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, AVIMER®, 미니바디, 디아바디, 이중특이적 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 맥시바디, 카멜리드(camelid), VHH, 미니바디, 인트라바디, 항체 부분(예를 들어, 도메인 항체)을 포함하는 융합 단백질, 단일 쇄 결합 폴리펩티드, scFv-Fc, Fab-Fc, 이중특이적 T 세포 인게이저(engager)(BiTE; 단일 폴리펩티드 쇄로서 생성된 2개의 scFv, 이때 각각의 scFv는 본원에 기재된 CDR의 조합 또는 VL/VL의 조합의 아미노산 서열을 포함함), 4가 탠덤 디아바디(TandAb; 머리-대-꼬리 배열로 비공유 동종이량체 폴더(folder)로서 생성되는 항체 단편, 예를 들어, scFv를 포함하는 TandAb, 이때 scFv는 본원에 기재된 CDR의 조합 또는 VL/VL의 조합의 아미노산 서열을 포함함), 이중 친화성 재표적화 항체(DART; 안정화 쇄간 디설파이드 결합에 의해 연결된 상이한 scFv), 이중특이적 항체(bscAb; 글리신-세린 링커를 통해 연결된 2개의 단일 쇄 Fv 단편), 단일 도메인 항체(sdAb), 융합 단백질, 이중특이적 디설파이드 안정화 Fv 항체 단편(dsFv-dsFv'; 유연성 링커 펩티드에 의해 연결된 2개의 상이한 디설파이드 안정화 Fv 항체 단편)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 전체 길이 항체(예를 들어, 항원 결합 단편 및 Fc 영역)이 바람직하다.

[0114] 2개의 공유연결된 항체 또는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 이종접합체 폴리펩티드도 본 개시내용의 범위 내에 있다. 결합제를 다량체화하기 위해 적합한 링커가 사용될 수 있다. 연결 펩티드의 비제한적 예는 $(GS)_n$(서열번호 24), $(GGS)_n$(서열번호 25), $(GGGS)_n$(서열번호 26), $(GGSG)_n$(서열번호 27), $(GGSGG)_n$(서열번호 28) 또는 $(GGGGS)_n$(서열번호 29)를 포함하나 이들로 제한되지 않고, 이때 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 예를 들어, 연결 펩티드는 $(GGGGS)_3$(서열번호 30) 또는 $(GGGGS)_4$(서열번호 31)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결 펩티드는 하나의 가변 영역의 카르복시 말단과 다른 가변 영역의 아미노 말단 사이의 약 3.5 nm를 가교연결한다. 다른 서열의 링커도 설계되어 사용되었다. 링커는 추가 기능, 예컨대, 약물의 부착 또는 고체 지지체에의 부착을 위해 변형될 수 있다.

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합력"은 2개 이상의 작용제의 복합체가 희석 후 해리에 대해 나타내는 저항성을 의미한다. 겉보기 친화성은 효소 연결 면역흡착 어세이(ELISA) 또는 임의의 다른 적합한 기법과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합력은 스캐차드(Scatchard) 분석 또는 임의의 다른 적합한 기법과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "친화성"은 2개의 작용제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 의미하며 K_D로서 표현된다. 본원에서 항체 또는 항원 결합 단편의 결합 친화성(K_D)은 500 nM, 475 nM, 450 nM, 425 nM, 400 nM, 375 nM, 350 nM, 325 nM, 300 nM, 275 nM, 250 nM, 225 nM, 200 nM, 175 nM, 150 nM, 125 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 50 nM, 50 nM, 49 nM, 48 nM, 47 nM, 46 nM, 45 nM, 44 nM, 43 nM, 42 nM, 41 nM, 40 nM, 39 nM, 38 nM, 37 nM, 36 nM, 35 nM, 34 nM, 33 nM, 32 nM, 31 nM, 30 nM, 29 nM, 28 nM, 27 nM, 26 nM, 25 nM, 24 nM, 23 nM, 22 nM, 21 nM, 20 nM, 19 nM, 18 nM, 17 nM, 16 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 990 pM, 980 pM, 970 pM, 960 pM, 950 pM, 940 pM, 930 pM, 920 pM, 910 pM, 900 pM, 890 pM, 880 pM, 870 pM, 860 pM, 850 pM, 840 pM, 830 pM, 820 pM, 810 pM, 800 pM, 790 pM, 780 pM, 770 pM, 760 pM, 750 pM, 740 pM, 730 pM, 720 pM, 710 pM, 700 pM, 690 pM, 680 pM, 670 pM, 660 pM, 650 pM, 640 pM, 630 pM, 620 pM, 610 pM, 600 pM, 590 pM, 580 pM, 570 pM, 560 pM, 550 pM, 540 pM, 530 pM, 520 pM, 510 pM, 500 pM, 490 pM, 480 pM, 470 pM, 460 pM, 450 pM, 440 pM, 430 pM, 420 pM, 410 pM, 400 pM, 390 pM, 380 pM, 370 pM, 360 pM, 350 pM, 340 pM, 330 pM, 320 pM, 310 pM, 300 pM, 290 pM, 280 pM, 270 pM, 260 pM, 250 pM, 240 pM, 230 pM, 220 pM, 210 pM, 200 pM, 190 pM, 180 pM, 170 pM, 또는 이들 사이의 임의의 정수 미만일 수 있다. 결합 친화성은 표면 플라스몬 공명(SPR), KINEXA 바이오센서, 신틸레이션 근접성 어세이, 효소 연결 면역흡착 어세이(ELISA), ORIGEN 면역어세이(IGEN), 형광 소광, 형광 전달, 효모 디스플레이 또는 이들의 임의의 조합을 이용함으로써 측정될 수 있다. 결합 친화성은 적합한 생물어세이를 이용함으로써 스크리닝될 수도 있다.

[0117] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합력"은 2개 이상의 작용제의 복합체가 희석 후 해리에 대해 나타내는 저항성을 의미한다. 겉보기 친화성은 효소 연결 면역흡착 어세이(ELISA) 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 기법과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합력은 스캐차드 분석 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 기법과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0118] 본원은 친화성 성숙 항체도 제공한다. 항체의 친화성을 조절하고 CDR을 특징규명하기 위해 다음 방법을 이용할

수 있다. 항체의 CDR을 특징규명하고/하거나 항체와 같은 폴리펩티드의 결합 친화성을 변경(예를 들어, 개선)하는 한 방식은 "라이브러리 스캐닝 돌연변이유발"로서 지칭된다. 일반적으로, 라이브러리 스캐닝 돌연변이유발은 다음과 같이 작동한다. CDR에서 하나 이상의 아미노산 위치는 2개 이상(예컨대, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개)의 아미노산으로 대체된다. 이것은 2개 이상의 구성원(2개 이상의 아미노산이 모든 위치에서 치환되는 경우)의 복잡성을 각각 가진 클론의 작은 라이브러리(일부 실시양태에서, 분석되는 모든 아미노산 위치에 대해 하나씩)를 생성한다. 일반적으로, 라이브러리는 천연(비치환된) 아미노산을 포함하는 클론도 포함한다. 각각의 라이브러리로부터 소수의 클론, 예를 들어, (라이브러리의 복잡성에 따라) 약 20개 내지 80개의 클론이 표적 폴리펩티드(또는 다른 결합 표적)에 대한 결합 특이성 또는 친화성에 대해 스크리닝될 수 있고, 결합이 증가되거나, 동일하거나 감소되거나 없는 후보가 식별된다. 결합 친화성은 약 2배 이상의 결합 친화성 차이를 검출하는 비아코어(Biacore) 표면 플라스몬 공명 분석을 이용함으로써 측정될 수 있다.

[0119] 일부 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 이중특이적이거나 다중특이적이며 하나 초과의 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 경우, 이러한 이중특이적 또는 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 2개 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 경우, 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 2가 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다. 일부 경우, 다중특이적 항체 또는 항원 결합 단편은 2가 항체 또는 항원 결합 단편, 3가 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 4가 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다.

[0120] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 단리된, 정제된, 재조합 또는 합성 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있다.

[0121] 본원에 기재된 항체는 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체는 종종 특히 고수준 발현 벡터를 사용할 때 대량으로 생성될 수 있다.

[0122] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD1 항체 또는 항-PD1 항원 결합 단편은 본원에 기재된 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역 (VL)의 조합을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD1 항체 또는 항-PD1 항원 결합 단편은 본원에 기재된 상보성 결정 영역(VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3)의 조합을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD-1 항체 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 변형된 티슬레리주맙(Tislelizumab), 바이지안(Baizean), 0KV0411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2, 신틸리맙(Sintilimab), Tyvyt, IBI-308, 토리팔리맙(Toripalimab), TeRuiPuLi, 테레프릴(Terepril), 투오이(Tuoyi), JS-001, TAB-001, 캄렐리주맙(Camrelizumab), HR-301210, INCSHR-01210, SHR-1210, 세미플리맙(Cemiplimab), 세미플리맙-rwlc, LIBTAYO®, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684, 람브롤리주맙(Lambrolizumab), 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11, 니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 프롤골리맙(Prolgolimab), 포르테카(Forteca), BCD-100, 펜풀리맙(Penpulimab), AK-105, 짐베렐리맙(Zimberelimab), AB-122, GLS-010, WBP-3055, 발스틸리맙(Balstilimab), 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w, 게놀림주맙(Genolimzumab), 겝타놀리맙(Geptanolimab), APL-501, CBT-501, GB-226, 도스탈리맙(Dostarlimab), ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285, 서플루리맙(Serplulimab), HLX-10, CS-1003, 레티판리맙(Retifanlimab), 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012, 사산리맙(Sasanlimab), LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888, 스파탈리주맙(Spartalizumab), NVP-LZV-184, PDR-001, QOG25L6Z8Z, 렐라트리맙/니볼루맙, BMS-986213, 세트렐리맙(Cetrelimab), JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F, 테보텔리맙(Tebotelimab), MGD-013, BCD-217, BAT-1306, HX-008, MEDI-5752, JTX-4014, 카도닐리맙(Cadonilimab), AK-104, BI-754091, 피딜리주맙(Pidilizumab), CT-011, MDV-9300, YBL-006, AMG-256, RG-6279, RO-7284755, BH-2950, IBI-315, RG-6139, RO-7247669, ONO-4685, AK-112, 609-A, LY-3434172, T-3011, MAX-10181, AMG-404, IBI-318, MGD-019, INCB-086550, ONCR-177, LY-3462817, RG-7769, RO-7121661, F-520, XmAb-23104, Pd-1-pik, SG-001, S-95016, Sym-021, LZM-009, 부디갈리맙(Budigalimab), 6VDO4TY30O, ABBV-181, PR-1648817, CC-90006, XmAb-20717, 2661380, AMP-224, B7-DCIg, EMB-02, ANB-030, PRS-332, [89Zr]데페록사미드-펨브롤리주맙, 89Zr-Df-펨브롤리주맙, [89Zr]Df-펨브롤리주맙, STI-1110, STI-A1110, CX-188, mPD-1 Pb-Tx, MCLA-134, 244C8, ENUM 224C8, ENUM C8, 388D4, ENUM 388D4, ENUM D4, MEDI0680 또는 AMP-514를 포함한다.

[0123] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항-PD-1 항체 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 변형된 티슬레리주맙, 신틸리맙, 토리팔리맙, 테레프릴, 캄렐리주맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 프롤골리맙, 펜풀리맙, 짐베렐리맙, 발스틸리맙, 게놀림주맙, 겝타놀리맙, 도스탈리주맙, 서플루리맙, 레티판리맙, 사산리맙, 스파탈리주맙, 세트렐

리맙, 테보텔리맙, 카도닐리맙, A 피딜리주맙, LZM-009 또는 부디갈리맙을 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, LZM-009, 도스탈리맙, 신틸리맙, 스파탈리주맙, 티슬레리주맙, 또는 세미플리맙이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 도스탈리맙, 신틸리맙, 스파탈리주맙, 또는 티슬레리주맙이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, LZM-009 또는 세미플리맙이다.

[0125] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 변형된 펨브롤리주맙이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 mAB3에 의해 변형된다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 mAB4에 의해 변형된다.

[0126] 표시된 항체와 동일한 아미노산 서열을 공유하는, 본원에서 명명된 항체들의 일반 또는 바이오시밀러(biosimilar) 버전도 항체의 명칭이 사용될 때 포함되는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 티슬레리주맙, 신틸리맙, 토리팔리맙, 테레프릴, 캄렐리주맙, 세미플리맙, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 프롤골리맙, 펜풀리맙, 짐베렐리맙, 발스틸리맙, 게놀림주맙, 젭타놀리맙, 도스탈리맙, 서플루리맙, 레티판리맙, 사산리맙, 스파탈리주맙, 세트렐리맙, 테보텔리맙, 카도닐리맙, A 피딜리주맙, LZM-009 또는 부디갈리맙의 바이오시밀러이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 본원에서 제공된 항체 중 어느 한 항체의 바이오시밀러이다.

[0127] 표 1은 항-PD-1 면역접합체를 제조하도록 변형될 수 있는 예시적인 항-PD-1 폴리펩티드(예를 들어, 항-PD-1 항체) 및 항-PD-1 항원 결합 단편의 서열을 제공한다. 표 1은 변형된 항-PD-1 면역접합체에 사용될 수 있는 CDR의 조합도 제공한다. 본원에서 항-PD-1 폴리펩티드의 언급은 대안적으로 항-PD-1 항원 결합 단편을 의미할 수 있다.

표 1

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
티슬레리주맙, 바이지안, 0KVO411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2 **VH**	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIYADGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGNYWYIDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	32
티슬레리주맙, 바이지안, 0KVO411B3N, BGB-A317, hu317-1/IgG4mt2 **VL**	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVSNDVAWYQQKPGQPPKLLINYAFHRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQAYSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	33
신틸리맙, Tyvyt, IBI-308 **VH**	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTGTFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	34
신틸리맙, Tyvyt, IBI-308 **VL**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL	35

[0128]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
토리팔리맙, TeRuiPuLi, 테레프릴, 투오이, JS-001, TAB-001 **VH**	QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPIH GLEWIGVIESETGGTAYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREGITTVATTYYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	36
토리팔리맙, TeRuiPuLi, 테레프릴, 투오이, JS-001, TAB-001 **VL**	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	37
캄렐리주맙, HR-301210, INCSHR-01210, SHR-1210 **VH**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGK GLEWVATISGGGANTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARQLYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	38
캄렐리주맙, HR-301210,	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAP KLLIYTATSLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ VYSIPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL	39

[0129]

[0130]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
INCSHR-01210, SHR-1210 **VL**	NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
세미플리맙, 세미플리맙-rwlc, LIBTAYO®, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684 **VH**	EVQLLESGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMTWVRQAPGK GLEWVSGISGGGRDTYFADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLK GEDTAVYYCVKWGNIYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK	40
세미플리맙, 세미플리맙-rwlc, LIBTAYO®, 6QVL057INT, H4H7798N, REGN-2810, SAR-439684 **VL**	DIQMTQSPSSLSASVGDSITITCRASLSINTFLNWYQQKPGKAPNL LIYAASSLHGGVPSRFSGSGSGTDFTLTIRTLQPEDFATYYCQQSS NTPFTFGPGTVVDFRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (디설파이드 가교) H22-H96, H131-L214, H144-H200, H223-H'223, H226-H'226, H258-H318, H364-H422, H'22-H'96, H'131-L'214, H'114-H'200, H'258-H'318, H'364-H'422, L23-L88, L134-L194, L'23-L'88, L'134-L'194)	41
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 **VH**	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPG QGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSL QFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP	46

[0131]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 **VH**	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGFPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS (디설파이드 가교) H22-H96, H134-L218, H147-H203, H226-H'226, H229-H'229, H261-H321, H367-H425, H'22-H'96, H'134-L'218, H'147-H'203, H'261-H'321, H'367-H'425, L23-L92, L138-L198, L'23-L'92, L'138-L'198)	48
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK	49
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 **VH**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS	50

[0132]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQS SNWPRTFGQGTKVEIK (디설파이드 가교) H22-H96, H127-L214, H140-H196, H219-H'219, H222-H'222, H254-H314, H360-H418, H'22-H'96, H'127-L'214, H'140-H'196, H'254-H'314, H'360-H'418, L-23-L88, L134-L194, L'23-L'88, L'134-L'194)	51
프롤골리맙, 포르테카, BCD-100 **VH**	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGK GLEWVSAIDTGGGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSL RAEDTAVYYCARDEGGGTGWGVLKDWPYGLDAWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	52
프롤골리맙, 포르테카, BCD-100 **VL**	QPVLTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPV LVIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQV WDSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	53
발스틸리맙, 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w **VH**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM	54

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	
발스틸리맙, 1Q2QT5M7EO, AGEN-2034, AGEN-2034w **VL**	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQ YNNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	55
도스탈리맙, ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285 **VH**	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKG LEWVSTISGGGSYTYYQDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCASPYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	56
도스탈리맙, ANB-011, GSK-4057190A, P0GVQ9A4S5, TSR-042, WBP-285 **VL**	DIQLTQSPSFLSAYVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQH YSSYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	57
서플루리맙, HLX-10 **VH**	OVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWIROAPGKG LEWVSTISGGGSNIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCVSYYYGIDFWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW	58

[0133]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	LNGKEYKCKVSKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
서플루리맙, HLX-10 **VL**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOO HYTIPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	59
레티판리맙, 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012 **VH**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPG QGLEWIGVIHPSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAREHYGTSPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLG	60
레티판리맙, 2Y3T5IF01Z, INCMGA-00012, INCMGA-0012, MGA-012 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGMSFMNWFQQKP GQPPKLLIHAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY FCQQSKEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	61
사산리맙, LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888 **VH**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQ GLEWMGNIYPGSSLTNYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARLSTGTFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD	62

[0134]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
사산리맙, LZZ0IC2EWP, PF-06801591, RN-888 **VL**	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLWDSGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWTSYRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYFYPHTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	63
스파탈리주맙, NVP-LZV-184, PDR-001, QOG25L6Z8Z **VH**	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	64
스파탈리주맙, NVP-LZV-184, PDR-001, QOG25L6Z8Z **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSGNQKNFLTWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	65
세트렐리맙, JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F **VH**	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT	66

[0135]

[0136]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK	
세트렐리맙, JNJ-3283, JNJ-63723283, LYK98WP91F **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR NYWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	67
테보텔리맙, MGD-013 **VH**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSVVAWYQQKPGKAP KLLIYS0ASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QHYSTPWTFGG00GTKLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYSFTSYWMN0WVRQAPGQGLEWIGVIHPSDSET WLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSS00LRSEDTAVYYCAREH YGTSPFAYWGQGTLVTVSSGGCGGGEVAACEKEVA0ALEKEVA ALEKEVAALEKESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT00L YITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTY0RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYT00LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDS0DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	68
테보텔리맙, MGD-013 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGMSFMNWFQQKP GQPPKL0LIHAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YFCQQSKEVPY00TFGGGTKVEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTD0YNMDWVRQAPGQGLEWMGDINP DNGVTIYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYM00ELRSLRSDDTAVYY CAREADYFYFDYWGQGTTLTVSSGGCGGGKVAACKE0KVAAL KEKVAALKEKVAALKE	69
피딜리주맙, CT-011, MDV-9300 **VH**	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQ GLQWMGWINTDSGESTYAEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLT AEDTGMYFCVRVGYDALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV	70

[0137]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
피딜리주맙, CT-011, MDV-9300 **VL**	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVSYMHWFQQKPGKAPKL WIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	71
SG-001 **VH**	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLTCKASGLTFSSSGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSL RAEDTAVYYCATNNDYWGQGTLVTVSS	72
SG-001 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYTASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQY SNWPRTFGQGTKVEIK	73
LZM-009 **VH**	EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYMYWVKQSHG KSLEWIGGVNPSNGGTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMELNSL TSEDSAVYYCARRDYRYDMGFDYWGQGTTLTVSS	74
LZM-009 **VL**	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKP GSSPRLLIYLASYLESGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATY YCQHSRELPLTFGTGTRLEIK	75
LZM-009 **VH**	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPG QGLEWMGGVNPSNGGTNFNEKFKSRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARRDYRYDMGFDYWGQGTTVTVSS	76
LZM-009 **VL**	EIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPG QAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYY CQHSRELPLTFGTGTKVEIK	77
부디갈리맙, 6VDO4TY3OO, ABBV-181, PR-1648817 **VH**	EIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTHYGMNWVRQAPGQ GLEWVGWVNTYTGEPTYADDFKGRLTFTLDTSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTREGEGLGFGDWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK	78

[0138]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
	SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
부디갈리맙, 6VDO4TY3OO, ABBV-181, PR-1648817 **VL**	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSHGDTYLEWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHIPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	79
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VH CDR1	NYYMY	80
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VH CDR2	GINPSNGGTNFNEKFKN	81
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VH CDR3	RDYRFDMGFDY	82

[0139]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VL CDR1	RASKGVSTSGYSYLH	83
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VL CDR2	LASYLES	84
람브롤리주맙, 펨브롤리주맙, KEYTRUDA®, MK-3475, SCH-900475, h409A11 VL CDR3	QHSRDLPLT	85
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 VH CDR1	NSGMH	86
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558,	VIWYDGSKRYYADSVKG	87

[0140]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
MDX-1106, ONO-4538 VH CDR2		
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 VH CDR3	NDDY	88
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 VL CDR1	RASQSVSSYLA	89
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 VL CDR2	DASNRAT	90
니볼루맙, 니볼루맙 BMS, OPDIVO®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538 VL CDR3	QQSSNWPRT	91

[0141]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
서플루리맙, HLX-10 VH CDR1	FTFSNYGMS	92
서플루리맙, HLX-10 VH CDR2	TISGGGSNIY	93
서플루리맙, HLX-10 VH CDR3	VSYYYGIDF	94
서플루리맙, HLX-10 VL CDR1	KASQDVTTAVA	95
서플루리맙, HLX-10 VL CDR2	WASTRHT	96
서플루리맙, HLX-10 VL CDR3	QQHYTIPWT	97
SG-001 VH CDR1	GLTFSSSG	98
SG-001 VH CDR2	IWYDGSKR	99
SG-001 VH CDR3	ATNNDY	100
SG-001 VL CDR1	RASQSVSSYLA	101
SG-001 VL CDR2	TASNRAT	102
SG-001 VL CDR3	QQYSNWPRT	103
PD-1-Fc-OX40L (코드),	MQIPQAPWPWWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVV TEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQP	104

[0142]

항체 또는 항원 결합 단편	서열	서열번호
SL-279252 (코드), TAK-252(코드)	GQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQSKYGPPCPSCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKE YKCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKIEGR MDQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSV IINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLM VASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL MQIPQAPWPWWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVV TEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQP GQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIIN CDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVA SLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	

[0143] 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 32, 34, 36, 38, 40, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 및 78 중 어느 한 서열번호의 아미노산 서열을 가진 VH를 포함할 수

있다. 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 33, 35, 37, 39, 41, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77 및 79 중 어느 한 서열번호의 아미노산 서열을 가진 VH를 포함할 수 있다.

[0144] 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 32의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 34의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 36의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 38의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 39의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 40의 아미노산 서열을 가진 VH 및 서열번호 41의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 46의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 47의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 48의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 50의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 52의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 54의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 55의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 56의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 57의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 58의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 59의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 60의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 61의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 62의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 64의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 66의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 68의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 69의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 70의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 71의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 72의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 73의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 74의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 75의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 76의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 77의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다. 또 다른 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 78의 아미노산 서열을 가진 VH, 및 서열번호 79의 아미노산 서열을 가진 VL을 포함한다.

[0145] 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 80의 아미노산 서열을 가진 VH CHR1, 서열번호 81의 아미노산 서열을 가진 VH CHR2, 서열번호 82의 아미노산 서열을 가진 VH CHR3, 서열번호 83의 아미노산 서열을 가진 VL CHR1, 서열번호 84의 아미노산 서열을 가진 VL CHR2, 및 서열번호 85의 아미노산 서열을 가진 VL CHR3을 포함한다. 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 86의 아미노산 서열을 가진 VH CHR1, 서열번호 87의 아미노산 서열을 가진 VH CHR2, 서열번호 88의 아미노산 서열을 가진 VH CHR3, 서열번호 89의 아미노산 서열을 가진 VL CHR1, 서열번호 90의 아미노산 서열을 가진 VL CHR2, 및 서열번호 91의 아미노산 서열을 가진 VL CHR3을 포함한다. 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 92의 아미노산 서열을 가진 VH CHR1, 서열번호 93의 아미노산 서열을 가진 VH CHR2, 서열번호 94의 아미노산 서열을 가진 VH CHR3, 서열번호 95의 아미노산 서열을 가진 VL CHR1, 서열번호 96의 아미노산 서열을 가진 VL CHR2, 및 서열번호 97의 아미노산 서열을 가진 VL CHR3을 포함한다. 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드 또는 항-PD-1 항원 결합 단편은 서열번호 98의 아미노산 서열을 가진 VH CHR1, 서열번호 99의 아미노산 서열을 가진 VH CHR2, 서열번호 100의 아미노산 서열을 가진 VH CHR3, 서열번호 101의 아미노산 서열을 가진 VL CHR1, 서열번호 102의 아미노산 서열을 가진 VL CHR2, 및 서열번호 103의 아미노산 서열을 가진 VL CHR3을 포함한다.

[0146] 한 경우, 항-PD-1 폴리펩티드는 융합 단백질을 포함한다. 이러한 융합 단백질은 예를 들어, CHO-K1 세포에서 발

현되는, 인간 IgG4의 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 통해 융합된 프로그래밍된 세포 사멸 1(PD-1)의 세포외 도메인(ECD) 및 종양 괴사 인자(리간드) 수퍼패밀리 구성원 4(TNFSF4 또는 OX40L)의 ECD를 포함하는 양면 Fc 융합 단백질일 수 있고, 이때 상기 융합 단백질은 서열번호 104의 예시적인 아미노산 서열을 가진다.

[0147] 본원은 항-HER2 항체도 제공한다. 항-HER2 항체는 본원에서 제공된 IL-2 폴리펩티드에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙(헤르셉티(Herceptin), Roche, Herclon, RG597, RO452317)이다. 트라스투주맙은 다음과 같은 VH 서열을 가진다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
[0148] EALHNHYTQKSLSLSPGK(서열번호 121).

[0149] 트라스투주맙의 VL 서열은 다음과 같다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
[0150] KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열번호 122).

[0151] **Fc 영역에 대한 변형**

[0152] 본원은 항-PD-1 폴리펩티드를 개시하는 것으로, 이때 항-PD-1 폴리펩티드는 Fc 영역을 포함하고, Fc 영역은 적어도 하나의 공유결합된 화학적 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 아스파라긴, 글루타민, 시스테인 또는 라이신 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 라이신 또는 시스테인 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 라이신 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 불변 영역에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 불변 영역에 공유결합된다.

[0153] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG Fc 영역, IgA Fc 영역, IgD Fc 영역, IgM Fc 영역 또는 IgE Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG Fc 영역, IgA Fc 영역, 또는 IgD Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간화 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG Fc 영역이다. 일부 경우, IgG Fc 영역은 IgG1 Fc 영역, IgG2a Fc 영역 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 경우, IgG Fc 영역은 IgG1 Fc 영역, IgG2a Fc 영역 또는 IgG4 Fc 영역이다.

[0154] 하나 이상의 돌연변이는 항체 또는 항원 결합 단편의 Fc 매개 이펙터 기능, 예를 들어, 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 기능을 감소시키도록 Fc 영역에 도입될 수 있다. 일부 경우, 변형된 Fc는 S228P Fc 돌연변이를 함유하는 인간화 IgG4 카파 이소타입을 포함한다. 일부 경우, 변형된 Fc는 인간 IgG1 카파를 포함하며, 이때 중쇄 CH2 도메인은 삼중 돌연변이, 예를 들어, (a) L238P, L239E 및 P335S; 또는 (2) K248, K288 및 K317을 갖도록 조작된다.

[0155] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 서열번호 105로 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가진다:

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro1 Glu Xaa Xaa Gly Xaa
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
Lys Xaa Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly,

[0156]

[0157] 상기 서열에서, Xaa는 임의의 천연 생성 아미노산일 수 있다.

[0158] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 예컨대, 서열번호 105에서 시스테인을 함유하지 않는 위치에서의 시스테인 잔기의 통합에 의해, 특정 잔기에서 Fc 영역이 변형 또는 접합에 민감하게 만드는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 대안적으로, Fc 영역은 링커를 통해 변형된 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산에 연결된 접합 핸들과 같은 접합 핸들을 포함하는 변형된 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산을 통합시키도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 링커가 추가 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7 또는 IL-18 폴리펩티드)에 부착되는 것을 용이하게 하는 임의의 돌연변이를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105로 제시된 천연 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 천연 라이신 잔기에 부착된다.

[0159] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 하나의 아미노산 잔기에 공유결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 Fc 영역의 비-말단 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 비-말단 잔기는 항-PD-1 폴리펩티드의 CH1, CH2 또는 CH3 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 비-말단 잔기는 항-PD-1 폴리펩티드의 CH2 영역에 존재한다.

[0160] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 10 내지 90 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 10 내지 20, 10 내지 30, 10 내지 40, 10 내지 50, 10 내지 60, 10 내지 70, 1 내지 80, 10 내지 90, 10 내지 100, 10 내지 110, 10 내지 120, 10 내지 130, 10 내지 140, 10 내지 150, 10 내지 160, 10 내지 170, 10 내지 180, 10 내지 190, 또는 10 내지 200 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 10 내지 30, 50 내지 70, 또는 80 내지 100 중 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 20 내지 40, 65 내지 85, 또는 90 내지 110 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 15 내지 26, 55 내지 65, 또는 85 내지 90 중 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 25 내지 35, 70 내지 80, 또는 95 내지 105 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 30, 32, 72, 74, 79 또는 101 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 위치 K30, K32, K72, K74, Q79 또는 K101 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 30에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 32에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 72에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 74에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 79에서 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 105의 아미노산 잔기 101에서 Fc 영역에 부착된다.

[0161] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 (예를 들어, 폴리펩티드를 변성시키지 않으면서) 폴리펩티드의 기능이 유지되도록 암 또는 염증 관련 항원에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드(예를 들어, 항-PD-1 항체)의 아미노산 잔기에 공유결합된다. 예를 들어, 폴리펩티드가 인간 IgG(예를 들어, 인간 IgG1)와 같은 항체인 경우, 노출된 라이신 잔기, 노출된 글루타민 잔기 및 노출된 티로신 잔기는 다음 위치에 존재한다(EU 넘버링에 의해 웹사이트 imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html 참조). 예시적인 노출된 라이신 잔기: CH2 도메인(위치 246, 위치 248, 위치 274, 위치 288, 위치 290, 위치 317, 위치 320, 위치 322 및 위치 338) CH3 도메인

(위치 360, 위치 414 및 위치 439). 예시적인 노출된 글루타민 잔기: CH2 도메인(위치 295). 예시적인 노출된 티로신 잔기: CH2 도메인(위치 278, 위치 296 및 위치 300) CH3 도메인(위치 436).

[0162] 인간 IgG1과 같은 인간 IgG도 후속 변형을 위해 이상적으로 표면 노출되는 잔기를 제공하기 위해 상기 나열된 위치들 중 어느 한 위치에서 라이신, 글루타민 또는 티로신 잔기에 의해 변형될 수 있다.

[0163] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 항체의 불변 영역의 아미노산 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 CH1, CH2 또는 CH3 영역의 아미노산 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 CH2 영역의 아미노산 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 인간 IgG Fc에서 EU 넘버링에 따른 하기 잔기 군으로부터 선택된 하나의 잔기에 공유결합될 수 있다: 아미노산 잔기 1 내지 478, 아미노산 잔기 2 내지 478, 아미노산 잔기 1 내지 477, 아미노산 잔기 2 내지 477, 아미노산 잔기 10 내지 467, 아미노산 잔기 30 내지 447, 아미노산 잔기 50 내지 427, 아미노산 잔기 100 내지 377, 아미노산 잔기 150 내지 327, 아미노산 잔기 200 내지 327, 아미노산 잔기 240 내지 327, 및 아미노산 잔기 240 내지 320.

[0164] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 인간 IgG Fc 영역의 하나의 라이신 또는 글루타민 잔기에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 Lys 246에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 Lys 248에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 Lys 288에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 Lys 290에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항체 폴리펩티드의 Fc 영역의 Gln 295에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Lys 317에 공유결합되고, 이때 아미노산 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 아미노산 잔기의 서브세트로부터 선택된 아미노산 잔기에 공유결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서브세트는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역의 2개의 라이신 잔기 중 하나에 공유결합될 수 있다.

[0166] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드는 항-PD-1 폴리펩티드의 Fc 영역에 공유결합된 2개의 링커를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 2개의 링커 각각은 항-PD-1 폴리펩티드의 상이한 중쇄에 공유결합될 것이다. 일부 실시양태에서, 2개의 링커 각각은 동일한 잔기 위치에서 항-PD-1 폴리펩티드의 상이한 중쇄에 공유결합될 것이다. 일부 실시양태에서, 2개의 링커 각각은 상이한 잔기 위치에서 항-PD-1 폴리펩티드의 상이한 중쇄에 공유결합될 것이다. 2개의 링커가 상이한 잔기 위치에 공유결합되는 경우, 본원에서 제공된 잔기 위치의 임의의 조합이 조합으로 사용될 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, 제1 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제1 Fc 영역의 Lys 248에 공유결합되고, 제2 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제2 Fc 영역의 Lys 288에 공유결합되고, 이때 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제1 Fc 영역의 Lys 246에 공유결합되고, 제2 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제2 Fc 영역의 Lys 288에 공유결합되고, 이때 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제1 Fc 영역의 Lys 248에 공유결합되고, 제2 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제2 Fc 영역의 Lys 317에 공유결합되고, 이때 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제1 Fc 영역의 Lys 246에 공유결합되고, 제2 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제2 Fc 영역의 Lys 317에 공유결합되고, 이때 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제1 Fc 영역의 Lys 288에 공유결합되고, 제2 화학적 링커는 항-PD-1 폴리펩티드의 제2 Fc 영역의 Lys 317에 공유결합되고, 이때 잔기 위치 번호는 Eu 넘버링을 기반으로 한다.

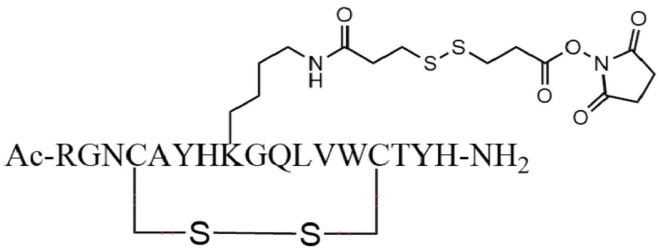
[0168] **Fc 영역을 변형하는 방법**

[0169] 본원은 예를 들어, 링커, 접합 핸들 또는 사이토카인을 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키기 위해 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 변형된 Fc 영역을 제조하는 방법도 제공한다. PD-1에 결합하는 항체 또는 다른 폴리펩티드의 Fc 영역을 부위 특이적으로 변형하는 다양한 방법들이 당분야에 알려져 있다.

[0170] *링커를 항체에 부위 특이적으로 부착시키도록 구성된 친화성 펩티드를 사용한 변형*

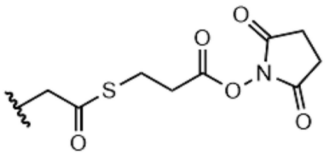
[0171] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 링커, 접합 핸들 또는 이들의 조합을 통합시키도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 변형은 링커 또는 다른 기를 Fc 영역, 예컨대, Fc 영역의 특정 잔기에 부착시키도록 구성된 페이로드를 보유하는 친화성 펩티드를 Fc 영역과 접촉시킴으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, 링커는 Fc 영역의 잔기와 결합을 형성하는 반응성 기(예를 들어, N-하이드록시석신이미드 에스테르)를 사용함으로써 부착된다. 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드는 절단 가능한 링커를 포함한다. 절단 가능한 링커는 링커 또는 다른 기가 Fc 영역에 부착된 후, Fc 영역에 부착된 원하는 링커 또는 다른 기만을 남기면서, 친화성 펩티드가 제거되도록 친화성 펩티드 상에서 구성된다. 그 다음, 링커 또는 다른 기는 추가 기, 예컨대, 사이토카인 또는 사이토카인에 부착된 링커를 Fc 영역에 부착시키는 데에도 사용될 수 있다.

[0172] 이러한 친화성 펩티드의 비제한적 예는 적어도 PCT 공개 제WO2018199337A1호, PCT 공개 제WO2019240288A1호, PCT 공개 제WO2019240287A1호 및 PCT 공개 제WO2020090979A1호에서 찾을 수 있으며, 이들 공개 공보 각각은 그 전체가 본원에 기재된 것처럼 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드는 링커/접합 핸들 페이로드를 항체의 Fc 영역의 하나 이상의 특정 잔기에 전달하도록 변형된 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드는 (1) QETNPTENLYFQQKNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDDC(서열번호 106); (2) QTADNQKNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDCSQSANLLAEAQQLNDAQAPQA(서열번호 107); (3) QETKNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDDC(서열번호 108); (4) QETFNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDDC(서열번호 109); (5) QETFNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDDC(서열번호 110); (6) QETFNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC(서열번호 111); (7) QETMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC(서열번호 112); (8) QETQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC(서열번호 113); (9) QETCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC(서열번호 114); (10) QETRGNCAYHKGQLVWCTYH(서열번호 115); 및 (11) QETRGNCAYHKGQIIWCTYH(서열번호 116)로부터 선택된 펩티드, 또는 N-말단에서 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 잔기가 절두되어 있는 상응하는 펩티드와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 페이로드를 본원에서 제공된 항체의 잔기 K248에 부착시킬 수 있는 절단 가능한 링커 및 접합 핸들 페이로드를 가진 예시적인 친화성 펩티드가 아래에 제시되어 있다(문헌[Matsuda *et al.*, "Chemical Site-Specific Conjugation Platform to Improve the Pharmacokinetics and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates," *Mol. Pharmaceutics* 2021, 18, 11, 4058-4066]에 보고된 바와 같음).



[0173]

[0174] Fc 영역의 대안적 잔기를 표적화하는 대안적 친화성 펩티드는 AJICAP™ 기술에 대해 상기 인용된 참고문헌에 기재되어 있으며, 이러한 친화성 펩티드는 원하는 작용기를 Fc 영역의 대안적 잔기(예를 들어, K246, K288 등)에 부착시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 친화성 펩티드의 디설파이드 기는 티오에스테르로 대체되어 연결기의 절단 가능한 부분으로서 설프하이드릴 보호기를 제공할 수 있다(예를 들어, 친화성 펩티드의 관련 부분

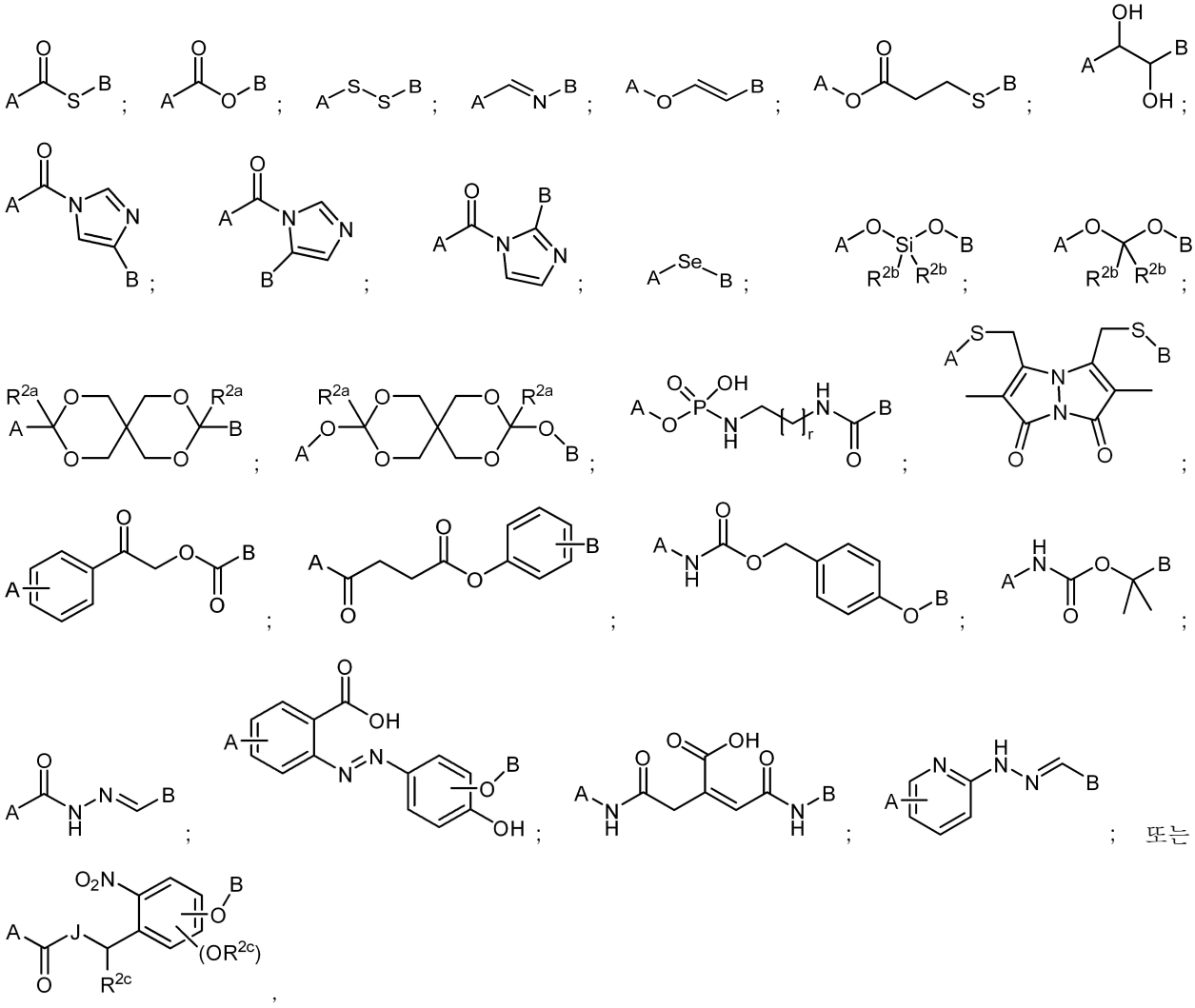


은 의 구조를 갖거나, 아래에 논의된 절단 가능한 링커들 중 또 다른 하나일 것이다).

[0175] 본 개시내용의 친화성 펩티드는 절단 가능한 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드의 절단 가능한 링커는 친화성 펩티드를 Fc 영역에 부착될 기에 연결하고, 링커 또는 접합 핸들을 포함하는 기가 부착된 후에 펩티드가 절단될 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 2가 기이다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 티오에스테르 기, 에스테르 기, 설판 기; 메탄이민 기; 옥시비닐 기; 티오프로파노에

이트 기; 에탄-1,2-디올 기; (이미다졸-1-일)메탄-1-온 기; 셀레노 에테르 기; 실릴에테르 기; 디옥시실란 기; 에테르 기; 디옥시메탄 기; 테트라옥소스피로[5.5]운데칸 기; 아세트아미도에틸 포스포라미다이트 기; 비스(메틸티오)-피라졸로피라졸-디온 기; 2-옥소-2-페닐에틸 포르메이트 기; 4-옥시벤질카르바메이트 기; 2-(4-하이드록시-옥시페닐)디아지닐)벤조산 기; 4-아미노-2-(2-아미노-2-옥소에틸)-4-옥소부트-2-엔산 기; 2-(2-메틸렌하이드라진일)피리딘 기; N'-메틸렌포르모하이드라지드 기; 또는 이소프로필카르바메이트 기를 포함할 수 있고, 이들 기 중 임의의 기는 비치환되거나 치환된다. 절단 가능한 링커를 친화성 펩티드에 부착시키는 조성물 및 부착 점뿐만 아니라 관련 사용 방법도 적어도 PCT 공개 제WO2018199337A1호, PCT 공개 제WO2019240288A1호, PCT 공개 제WO2019240287A1호 및 PCT 공개 제WO2020090979A1호에 기재되어 있다.

[0176] 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 다음과 같다:

[0177] 

[0178] 상기 식에서,

[0179] - A 또는 B 중 하나는 링커의 부착점이고, A 또는 B 중 다른 하나는 친화성 펩티드에 부착되는 부착점이고;

[0180] - R^{2a}는 각각 독립적으로 H 또는 임의로 치환된 알킬이고;

[0181] - R^{2b}는 각각 독립적으로 H 또는 임의로 치환된 알킬이고;

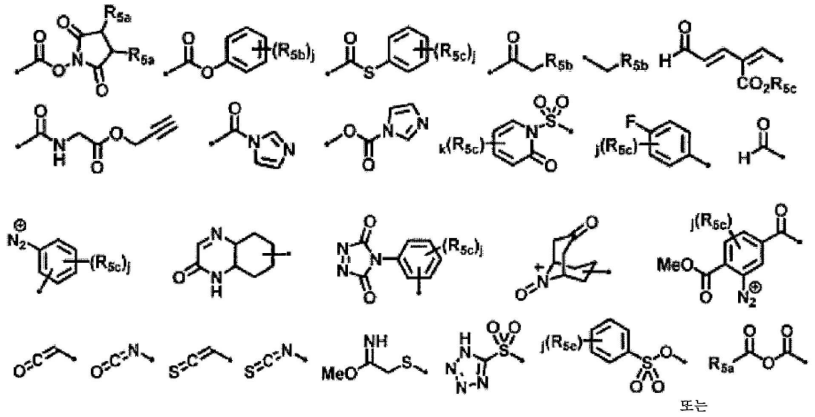
[0182] - R^{2c}는 H 또는 임의로 치환된 알킬이고;

[0183] - J는 메틸렌, N, S, Si 또는 O 원자이고;

[0184] - r은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0185] 친화성 펩티드는 링커/접합 핸들과 Fc 영역의 공유결합을 가능하게 하도록 구성된 반응성 기를 포함한다. 일부

실시양태에서, 반응성 기는 링커의 부착을 용이하게 하기 위해 통합된 Fc 영역의 특정 아미노산 잔기, 예컨대, 라이신 잔기, 티로신 잔기, 세린 잔기, 시스테인 잔기 또는 비천연 아미노산 잔기의 작용기에 대해 선택적이다. 반응성 기는 임의의 적합한 작용기, 예컨대, 라이신과의 반응을 위한 활성화된 에스테르(예를 들어, N-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 이의 유도체, 펜타플루오로페닐 에스테르 등) 또는 시스테인과의 반응을 위한 설프하이드릴 반응성 기(예를 들어, 알파-베타 불포화 카르보닐 또는 말레이미드와 같은 마이클 수용체)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 다음과 같다:

[0186] 
또는

[0187] 상기 식에서,

[0188] - R_{5a}, R_{5b} 및 R_{5c}는 각각 독립적으로 H, 할로겐 또는 임의로 치환된 알킬이고;

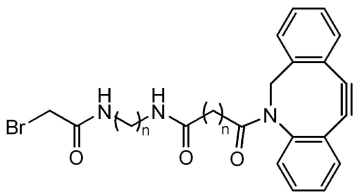
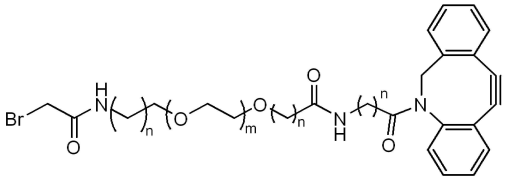
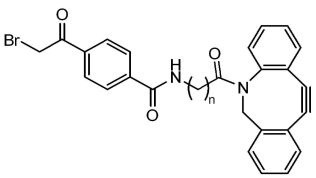
[0189] - j는 각각 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

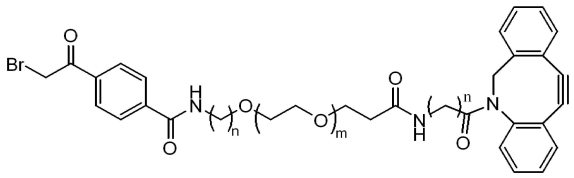
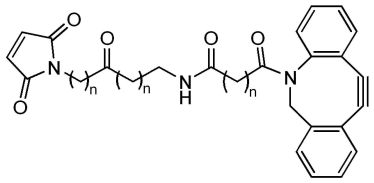
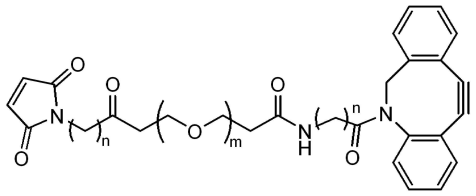
[0190] - k는 각각 1, 2, 3, 4 또는 5이다.

[0191] 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드는 절단 가능한 링커의 절단 시 반응성 모이어티가 노출되도록 반응성 모이어티를 원하는 아미노산 잔기에 전달하는 데 사용된다. 비제한적 예로서, 반응성 기는 친화성 펩티드와 Fc 영역 사이의 상호작용으로 인해 항-PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 Fc 영역의 원하는 잔기와 공유결합을 형성한다. 이 공유결합 형성 후, 절단 가능한 링커는 적절한 조건 하에서 절단되어 반응성 모이어티를 드러낸다(예를 들어, 절단 가능한 링커가 티오에스테르를 포함하는 경우, 절단 가능한 링커의 절단 후 유리 설프하이드릴 기가 Fc 영역에 부착된다). 이어서, 이 새로운 반응성 모이어티는 설프하이드릴 반응성 기(예를 들어, 알파-할로겐화 카르보닐 기, 알파-베타 불포화 카르보닐 기, 말레이미드 기 등)에 고정된 접합 핸들을 포함하는 시약을 통해 접합 핸들과 같은 추가 모이어티를 후속적으로 추가하는 데 사용될 수 있다.

[0192] 일부 실시양태에서, 친화성 펩티드는 유리 설프하이드릴 기를 Fc 영역의 라이신에 전달하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 이어서 유리 설프하이드릴 기는 이작용성 연결 시약과 반응하여 새로운 접합 핸들을 Fc 영역에 부착시킨다. 일부 실시양태에서, 새로운 접합 핸들은 부착된 사이토카인에 대한 링커를 형성하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 새로운 접합 핸들은 알킨 작용기이다. 일부 실시양태에서, 새로운 접합 핸들은 DBCO 작용기이다.

[0193] 이 목적에 유용한 예시적인 이작용성 연결 시약은 화학식 A-B-C로 표시되고, 이때 A는 설프하이드릴 반응성 접합 핸들(예를 들어, 말레이미드, α,β-불포화 카르보닐, α-할로겐화 카르보닐)이고, B는 연결 기이고, C는 새로운 접합 핸들(예를 들어, DBCO와 같은 알킨)이다. 이작용성 연결 시약의 구체적인 비제한적 예는

[0194] 
, 
, 
,


,

,
및

, 및 관련 분자(예를 들어, 이성질체)를 포함하고, 이때 n은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, m은 각각 독립적으로 1 내지 30의 정수이다.

[0195] 대안적으로, 친화성 펩티드는 반응성 기와 Fc 영역의 잔기 사이에 공유결합이 형성된 직후에 접합 핸들이 (예를 들어, 링커 기에 의해) Fc 영역에 추가되도록 구성될 수 있다. 이러한 경우, 친화성 펩티드는 절단되고, 접합 핸들은 IL-2 폴리펩티드(또는 다른 사이토카인)에의 후속 접합을 위해 즉시 준비된다.

[0196] *대안적 부착 방법 - 효소 매개*

[0197] 상기 제공된 항체의 Fc 영역의 친화성 펩티드 매개 변형은 Fc 영역을 부위 특이적으로 변형하는 데 사용될 수 있는 다른 방법에 비해 많은 이점(예를 들어, 사용 용이성, 많은 상이한 항체 접합체들을 신속하게 생성하는 능력, 시간 소모적인 단백질 조작을 수행할 필요 없이 많은 "기성품" 시판 항체를 사용하는 능력 등)을 갖지만, 변형을 수행하는 다른 방법도 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0198] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 일반적으로 1) 글루타민 함유 태그, 내인성 글루타민(예를 들어, 조작이 없는 천연 글루타민, 예컨대, 가변 도메인, CDR 등 내의 글루타민), 및/또는 항체 조작 또는 조작된 트랜스글루타미나제(transglutaminase)에 의해 반응성을 갖게 된 내인성 글루타민; 및 2) 아민 공여체 유닛, 링커 및 작용제 모이어티를 포함하는 아민 공여체 작용제를 포함하는 트랜스글루타미나제 매개 부위 특이적 항체-약물 접합체(ADC)에 관한 것이다. 이러한 트랜스글루타미나제 매개 부위 특이적 변형의 비제한적 예는 적어도 공개 제WO2020188061호, 제US2022133904호, 제US2019194641호, 제US2021128743호, 제US9764038호, 제US10675359호, 제US9717803호, 제US10434180호 및 제US9427478호에서 찾을 수 있으며, 이들은 그 전체가 본원에 기재된 것처럼 참고로 포함된다.

[0199] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 식: (Fc 함유 폴리펩티드-T-A)를 포함하는 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체를 제공하는 것으로, 이때 T는 특정 부위에서 조작된 아실 공여체 글루타민 함유 태그이고, A는 아민 공여체 작용제이고, 이때 아민 공여체 작용제는 Fc 함유 폴리펩티드의 카르복실 말단, 아미노 말단 또는 또 다른 부위에서 아실 공여체 글루타민 함유 태그에 부위 특이적으로 접합되고, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 아미노산 서열 XXQX를 포함하며, 이때 X는 임의의 아미노산이고(예를 들어, X는 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있음), 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체는 위치 295에서 글루타민이 아스파라긴으로 바뀌는 아미노산 치환(Q295N, EU 넘버링 체계)을 포함한다.

[0200] 일부 실시양태에서, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 폴리펩티드 또는 Fc 함유 폴리펩티드의 반응성 Lys에 공간적으로 인접하지 않는다(예를 들어, 아실 공여체 및 트랜스글루타미나제의 존재 하에 아민 공여체로서 공유결합을 형성하는 능력). 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 또는 Fc 함유 폴리펩티드는 동일한 위치에서 야생형 폴리펩티드에 비해 카르복실 말단의 마지막 아미노산 위치에서 아미노산 변형을 포함한다. 아미노산 변형은 아미노산 결실, 삽입, 치환, 돌연변이 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 전체 길이 항체 중쇄 및 항체 경쇄를 포함하고, 이때 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 둘 다의 카르복실 말단에 위치한다.

[0202] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 접합체는 항체를 포함하고, 이때 항체는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 디아바디 또는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG이다.

[0203] 또 다른 측면에서, 본원은 a) Fc 함유 폴리펩티드 및 아실 공여체 글루타민 함유 태그를 포함하는 조작된 (Fc 함유 폴리펩티드)-T 분자를 제공하는 단계; b) 트랜스글루타미나제의 존재 하에 아민 공여체 작용제를 조작된

(Fc 함유 폴리펩티드)-T 분자와 접촉시키는 단계; 및 c) 조작된 (Fc 함유 폴리펩티드)-T가 아민 공여체 작용제에 공유결합하도록 허용하여 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체를 형성하는 단계를 포함하는, 식: (Fc 함유 폴리펩티드-T-A)를 포함하는 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체를 제조하는 방법을 기술하는 것으로, 이때 T는 특정 부위에서 조작된 아실 공여체 글루타민 함유 태그이고, A는 아민 공여체 작용제이고, 이때 아민 공여체 작용제는 Fc 함유 폴리펩티드의 카르복실 말단, 아미노 말단 또는 또 다른 부위에서 아실 공여체 글루타민 함유 태그에 부위 특이적으로 접합되고, 이때 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 아미노산 서열 XXQX를 포함하고, 이때 X는 임의의 아미노산이고(예를 들어, X는 동일하거나 상이한 아미노산일 수 있음), 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체는 위치 295에서 글루타민이 아스파라긴으로 바뀌는 아미노산 치환(Q295N, EU 넘버링 체계)을 포함한다.

[0204] 또 다른 측면에서, 본원은 a) 폴리펩티드 및 아실 공여체 글루타민 함유 태그를 포함하는 조작된 폴리펩티드-T 분자를 제공하는 단계; b) 트랜스글루타미나제의 존재 하에 아민 공여체 작용제를 조작된 폴리펩티드-T 분자와 접촉시키는 단계; 및 c) 조작된 폴리펩티드-T가 아민 공여체 작용제에 공유결합하도록 허용하여 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체를 형성하는 단계를 포함하는, 식: 폴리펩티드-T-A를 포함하는 조작된 폴리펩티드 접합체를 제조하는 방법을 기술하는 것으로, 이때 T는 특정 부위에서 조작된 아실 공여체 글루타민 함유 태그이고, A는 아민 공여체 작용제이고, 이때 아민 공여체 작용제는 상기 폴리펩티드의 카르복실 말단, 아미노 말단 또는 또 다른 부위에서 아실 공여체 글루타민 함유 태그에 부위 특이적으로 접합되고, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 아미노산 서열 LLQGPX(서열번호 153) 또는 GGLLQGPP(서열번호 154)를 포함하고, 이때 X는 A 또는 P이다.

[0205] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 폴리펩티드 접합체(예를 들어, 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체, 조작된 Fab 함유 폴리펩티드 접합체, 또는 조작된 항체 접합체)는 적어도 약 51%의 접합 효율을 가진다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드 접합체(예를 들어, 조작된 Fc 함유 폴리펩티드 접합체, 조작된 Fab 함유 폴리펩티드 접합체, 또는 조작된 항체 접합체) 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0206] 일부 실시양태에서, 본원은 (a) 커플링 효소, 예를 들어, 트랜스아미다제의 존재 하에 연결 시약(링커)과 반응하는 적어도 하나의 수용체 아미노산 잔기(예를 들어, 천연 생성 아미노산)을 (예를 들어, 불변 영역의 1차 서열 내에) 가진 항체를 제공하는 단계; 및 (b) 연결 시약을 통해 반응성 기(R)에 (공유)연결된 수용체 아미노산 잔기를 포함하는 항체를 수득하기에 충분한 조건 하에서 (R 모이어티 이외에서) 수용체 아미노산 잔기와 연결 시약 사이에 공유결합의 형성을 야기할 수 있는 효소의 존재 하에 상기 항체를, 반응성 기(R), 임의로 보호된 반응성 기 또는 임의로 비보호 반응성 기를 포함하는 연결 시약(예를 들어, 1차 아민을 포함하는 링커)과 반응시키는 단계를 포함하는, 관심 있는 모이어티(Z)를 항체에 접합시키는 방법을 기술한다. 임의로, 항체 또는 항체 단편의 상기 수용체 잔기는 +2 위치에서 비-아스파르트산 잔기에 의해 플랭킹된다. 임의로, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산, 비-글루타민 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산, 비-아스파라긴 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 음으로 하전되지 않은 아미노산(아스파르트산 또는 글루탐산 이외의 아미노산)이다. 임의로, 수용체 글루타민은 항체 중쇄의 Fc 도메인에 있고, 임의로 CH2 도메인 내에도 존재한다. 임의로, 항체는 중쇄 N297에 연결된 글리코실화를 갖지 않는다. 임의로, 수용체 글루타민은 위치 295에 있고 +2 위치의 잔기는 항체 중쇄의 위치 297(EU 지수 넘버링)에 있는 잔기이다.

[0207] 한 측면에서, 본원은 (a) 적어도 하나의 수용체 글루타민 잔기를 가진 항체를 제공하는 단계; 및 (b) 링커를 통해 반응성 기(R)에 (공유)연결된 수용체 글루타민을 포함하는 항체를 수득하기에 충분한 조건 하에서 트랜스글루타미나제(TGase)의 존재 하에 상기 항체를, 반응성 기(R), 바람직하게는 보호된 반응성 기를 포함하는 1차 아민을 포함하는 링커(라이신 기반 링커)와 반응시키는 단계를 포함하는, 관심 있는 모이어티(Z)를 항체에 접합시키는 방법을 기술한다. 임의로, 항체 또는 항체 단편의 상기 수용체 글루타민 잔기는 +2 위치에서 비-아스파르트산 잔기로 플랭킹된다. 임의로, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산, 비-글루타민 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 비-아스파르트산, 비-아스파라긴 잔기이다. 한 실시양태에서, +2 위치의 잔기는 음으로 하전되지 않은 아미노산(아스파르트산 또는 글루탐산 이외의 아미노산)이다. 임의로, 수용체 글루타민은 항체 중쇄의 Fc 도메인에 있고, 임의로 CH2 도메인 내에도 존재한다. 임의로, 항체는 중쇄 N297에 연결된 글리코실화를 갖지 않는다. 임의로, 수용체 글루타민은 위치 295에 있고 +2 위치의 잔기는 항체 중쇄의 위치 297(EU 지수 넘버링)에 있는 잔기이다.

[0208] 그 후, 1차 아민을 포함하는 링커(라이신 기반 링커)를 통해 반응성 기(R)에 연결된 수용체 잔기 또는 수용체 글루타민 잔기를 포함하는 항체는 관심 있는 모이어티(Z)를 포함하는 반응 파트너와 반응하여, 상기 링커를 통해 관심 있는 모이어티(Z)에 연결된 수용체 잔기 또는 수용체 글루타민 잔기를 포함하는 항체를 생성할 수

있다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 방법은 (i) 1차 아민을 포함하는 링커(라이신 기반 링커)를 통해 관심 있는 모이어티(Z)에 연결된 수용체 글루타민을 포함하는 항체를 수득하기에 충분한 조건 하에서 임의로 고체 지지체에 고정된, 1차 아민을 포함하는 링커(라이신 기반 링커)를 통해 반응성 기(R)에 연결된 수용체 글루타민을 포함하는 단계 b)의 항체를, (ii) 관심 있는 모이어티(Z), 및 반응성 기 R과 반응할 수 있는 반응성 기(R')를 포함하는 화합물과 반응시키는 단계 (c)를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 관심 있는 모이어티(Z), 및 반응성 기 R과 반응할 수 있는 반응성 기(R')를 포함하는 상기 화합물은 항체에 대해 80배, 40배, 20배, 10배, 5배 또는 4배 몰 당량 미만으로 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 2개의 수용체 글루타민을 포함하고, 관심 있는 모이어티(Z) 및 반응성 기(R')를 포함하는 화합물은 항체에 대해 10 이하의 몰 당량으로 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 2개의 수용체 글루타민을 포함하고, 관심 있는 모이어티(Z) 및 반응성 기(R')를 포함하는 화합물은 항체에 대해 5 이하의 몰 당량으로 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 4개의 수용체 글루타민을 포함하고, 관심 있는 모이어티(Z) 및 반응성 기(R')를 포함하는 화합물은 항체에 대해 20 이하의 몰 당량으로 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 4개의 수용체 글루타민을 포함하고, 관심 있는 모이어티(Z) 및 반응성 기(R')를 포함하는 화합물은 항체에 대해 10 이하의 몰 당량으로 제공된다. 한 실시양태에서, 단계 (b) 및/또는 (c)는 수성 조건에서 수행된다. 임의로, 단계 (c)는 작용화된 수용체 글루타민 잔기를 포함하는 항체의 샘플을 고체 지지체에 고정시켜 고정된 항체를 포함하는 샘플을 제공하는 단계, 고정된 항체를 포함하는 샘플을 화합물과 반응시키는 단계, 임의로 임의의 미반응 화합물을 회수하고 고정된 항체와 반응시키기 위해 이러한 회수된 화합물을 상기 고체 지지체에 재도입하는 단계, 및 항체 접합체를 용출하여 Z 모이어티를 포함하는 조성물을 제공하는 단계를 포함한다.

[0209] **접합 핸들 화학반응**

[0210] 일부 실시양태에서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 적절하게 변형된 Fc 영역은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 IL-2 폴리펩티드에 접합시키는 데 사용되는 접합 핸들을 포함할 것이다.

[0211] IL-2 폴리펩티드에 부착된 상보적 반응성 기와 반응할 수 있는 임의의 적합한 반응성 기가 접합 핸들로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 Cu(I) 촉매작용 또는 "구리 부재" 알킨-아지드 트리아졸 형성 반응(예를 들어, 균주에 의해 촉진된 고리추가), 스타우딩거 라이게이션(Staudinger ligation), 역전자 요구 딜스-알더(Diels-Alder)(IEDDA) 반응, "포토-클릭(photo-click)" 화학반응, 트랜스-사이클옥텐을 사용한 테트라진 고리추가, 또는 금속 매개 공정, 예컨대, 올레핀 복분해 및 스즈키-미야우라(Suzuki-Miyaura) 또는 소노가시라(Sonogashira) 교차커플링을 위한 시약을 포함한다.

[0212] 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 "구리 부재" 알킨 아지드 트리아졸 형성 반응을 위한 시약을 포함한다. 상기 알킨 아지드 트리아졸 형성 반응을 위한 알킨의 비제한적 예는 사이클로옥틴 시약(예를 들어, (1R,8S,9s)-비사이클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 함유 시약, 디벤조사이클로옥틴-아민 시약, 디플루오로사이클로옥틴 또는 이의 유도체)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 알킨 작용기는 Fc 영역에 부착된다. 일부 실시양태에서, 아지드 작용기는 Fc 영역에 부착된다.

[0213] 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 아지드, 알킨, 테트라진, 할라이드, 설프하이드릴, 디설파이드, 말레이미드, 활성화된 에스테르, 알켄, 알데하이드, 케톤, 이민, 하이드라진 및 하이드라지드로부터 선택된 반응성 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드는 Fc 영역의 접합 핸들에 상보적인 반응성 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들 및 상보적 접합 핸들은 "클릭" 화학반응 시약을 포함한다. 클릭 화학반응 잔기의 예시적인 기는 문헌[Hein *et al.*, "Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences," Pharmaceutical Research volume 25, pages2216-2230 (2008); Thirumurugan *et al.*, "Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications," *Chem. Rev.* 2013, 113, 7, 4905-4979]; 미국 특허 출원 공개 제US20160107999A1호; 미국 특허 출원 공개 제US10266502B2호; 및 미국 특허 출원 공개 제US20190204330A1호에 제시되어 있고, 이 문헌들 각각은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0214] **링커 구조**

[0215] 일부 실시양태에서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 및 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)을 부착시키는 데 사용되는 링커는 두 모이어티들에서 부착점을 포함한다. 부착점은 본원에서 제공된 바와 같이 부착을 용이하게 하는 임의의 잔기일 수 있다. 링커 구조는 두 모이어티들 사이의 공간적 부착을 생성하는 임의의 적합한 구조일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 두 모이어티들의 공유결합을 제공한다. 일부 실시양태에서, 링커는 화학적 링커(예를 들어, 융합 단백질에서와 같이 발현된 폴리펩티드가 아님)이다.

[0216] 일부 실시양태에서, 링커는 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리(알킬렌 옥사이드)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리(알킬렌 옥사이드)는 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 폴리(알킬렌 옥사이드)는 폴리에틸렌 글리콜이다.

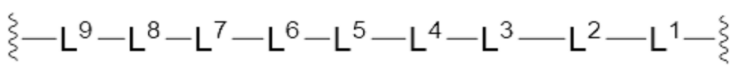
[0217] 일부 실시양태에서, 링커는 이작용성 링커이다. 일부 실시양태에서, 이작용성 링커는 아미드 기, 에스테르 기, 에테르 기, 티오에테르 기, 또는 카르보닐 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 비-중합체 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 비-중합체 이작용성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-중합체 이작용성 링커는 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트; 말레이미도카프로일; 발린-시트룰린; 알릴(4-메톡시페닐)디메틸실란; 6-(알릴옥시카르보닐아미노)-1-헥산올; 4-아미노부티르알데하이드 디에틸 아세탈; 또는 (E)-N-(2-아미노에틸)-4-{2-[4-(3-아지도프로폭시)페닐]디아제닐}벤즈아미드 염산염을 포함한다.

[0218] 링커는 분지형 또는 선형 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 선형 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 분지형 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 10개, 20개, 50개, 100개, 500개, 1000개, 2000개, 3000개 또는 5000개 원자의 쇄의 선형 부분(예를 들어, 제1 부착점과 제2 부착점 사이)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 10개, 20개, 30개, 40개 또는 50개 원자의 쇄의 선형 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 10개 원자의 선형 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 분지형 링커이고 적어도 10개, 20개, 50개, 100개, 500개, 1000개, 2000개, 3000개 또는 5000개 원자의 쇄의 선형 부분을 포함한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 링커는 약 200 달톤 내지 약 2000 달톤의 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 링커는 200 달톤 내지 100,000 달톤의 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 링커는 200 달톤 내지 500 달톤, 200 달톤 내지 750 달톤, 200 달톤 내지 1,000 달톤, 200 달톤 내지 5,000 달톤, 200 달톤 내지 10,000 달톤, 200 달톤 내지 20,000 달톤, 200 달톤 내지 50,000 달톤, 200 달톤 내지 100,000 달톤, 500 달톤 내지 750 달톤, 500 달톤 내지 1,000 달톤, 500 달톤 내지 5,000 달톤, 500 달톤 내지 10,000 달톤, 500 달톤 내지 20,000 달톤, 500 달톤 내지 50,000 달톤, 500 달톤 내지 100,000 달톤, 750 달톤 내지 1,000 달톤, 750 달톤 내지 5,000 달톤, 750 달톤 내지 10,000 달톤, 750 달톤 내지 20,000 달톤, 750 달톤 내지 50,000 달톤, 750 달톤 내지 100,000 달톤, 1,000 달톤 내지 5,000 달톤, 1,000 달톤 내지 10,000 달톤, 1,000 달톤 내지 20,000 달톤, 1,000 달톤 내지 50,000 달톤, 1,000 달톤 내지 100,000 달톤, 5,000 달톤 내지 10,000 달톤, 5,000 달톤 내지 20,000 달톤, 5,000 달톤 내지 50,000 달톤, 5,000 달톤 내지 100,000 달톤, 10,000 달톤 내지 20,000 달톤, 10,000 달톤 내지 50,000 달톤, 10,000 달톤 내지 100,000 달톤, 20,000 달톤 내지 50,000 달톤, 20,000 달톤 내지 100,000 달톤, 또는 50,000 달톤 내지 100,000 달톤의 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 링커는 200 달톤, 500 달톤, 750 달톤, 1,000 달톤, 5,000 달톤, 10,000 달톤, 20,000 달톤, 50,000 달톤 또는 100,000 달톤의 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 200 달톤, 500 달톤, 750 달톤, 1,000 달톤, 5,000 달톤, 10,000 달톤, 20,000 달톤 또는 50,000 달톤의 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 링커는 최대 500 달톤, 750 달톤, 1,000 달톤, 5,000 달톤, 10,000 달톤, 20,000 달톤, 50,000 달톤 또는 100,000 달톤의 분자량을 가진다. 바람직한 실시양태에서, 링커는 5000 달톤 미만, 4000 달톤 미만, 3000 달톤 미만 또는 2000 달톤 미만의 분자량을 갖고, 링커는 단분산성을 가진다(예를 들어, 본원의 접합체 조성물 집단의 경우, PD-L1에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드와 IL-2 폴리펩티드(또는 다른 사이토카인) 사이의 링커 구조의 높은 균일도가 있다).

[0220] 일부 실시양태에서, 링커는 접합 핸들과 이의 상보적 접합 핸들의 하나 이상의 쌍의 반응 생성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 생성물은 트리아졸, 하이드라존, 피리다진, 설파이드, 디설파이드, 아미드, 에스테르, 에테르, 옥심, 알켄, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 생성물은 트리아졸을 포함한다. 반응 생성물은 링커의 임의의 부분에 의해 제1 부착점 및 제2 부착점으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응 생성물은 실질적으로 링커의 중심에 있다. 일부 실시양태에서, 반응 생성물은 다른 부착점보다 한 부착점에 실질적으로 더 가깝다.

[0221] 일부 실시양태에서, 링커는 화학식 (X)의 구조를 포함한다:

[0222] 

[0223] 상기 식에서, L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6, L^8 및 L^9는 각각 독립적으로 -O-, $-NR^L-$, $-N(R^L)_2^+-$, $-OP(=O)(OR^L)O-$, -S-,

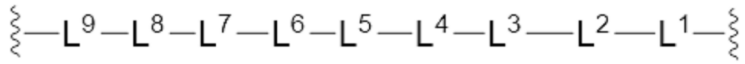
-S(=O)-, -S(=O)$_2$-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -C(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=O)-, -OC(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=O)O-, -NR^{L}C(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=S)NR^L-, -CR^L=N-, -N=CR^L, -NR^{L}S(=O)$_2$-, -S(=O)$_2$NR^L-, -C(=O)NR^{L}S(=O)$_2$-, -S(=O)$_2$NR^{L}C(=O)-, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 헤테로알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알키닐렌, 치환되거나 비치환된 C_6-C_{20} 아릴렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_{20} 헤테로아릴렌, -$(CH_2$-CH_2-$O)_{qa}$-, -$(O$-CH_2-$CH_2)_{qb}$-, -$(CH_2$-$CH(CH_3)$-$O)_{qc}$-, -$(O$-$CH(CH_3)$-$CH_2)_{qd}$-, 또는 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물이거나, 부재하고;

[0224] R^{L}은 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 알킬, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_2-C_5 알키닐, 치환되거나 비치환된 C_3-C_8 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_7헤테로사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

[0225] qa, qb, qc 및 qd는 각각 독립적으로 1 내지 100의 정수이고;

[0226]  각각은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)에 부착되는 부착점이다.

[0227] 일부 실시양태에서, 링커는 화학식 (X^a)의 구조를 포함한다:

[0228] 

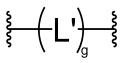
[0229] 상기 식에서, L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6, L^7, L^8 및 L^9는 각각 독립적으로 -O-, -NR^L-, -(C_1-C_6 알킬렌)NR^L-, -NR^L(C_1-C_6 알킬렌)-, -N(R^L)$_2^+$-, -(C_1-C_6 알킬렌)N(R^L)$_2^+$-, -N(R^L)$_2^+$-(C_1-C_6 알킬렌)-, -OP(=O)(OR^L)O-, -S-, -(C_1-C_6 알킬렌)S-, -S(C_1-C_6 알킬렌)-, -S(=O)-, -S(=O)$_2$-, -C(=O)-, -(C_1-C_6 알킬렌)C(=O)-, -C(=O)(C_1-C_6 알킬렌)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -C(=O)NR^L-, -C(=O)NR^L(C_1-C_6 알킬렌)-, -(C_1-C_6 알킬렌)C(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=O)-, -(C_1-C_6 알킬렌)NR^{L}C(=O)-, -NR^{L}C(=O)(C_1-C_6 알킬렌)-, -OC(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=O)O-, -NR^{L}C(=O)NR^L-, -NR^{L}C(=S)NR^L-, -CR^L=N-, -N=CR^L, -NR^{L}S(=O)$_2$-, -S(=O)$_2$NR^L-, -C(=O)NR^{L}S(=O)$_2$-, -S(=O)$_2$NR^{L}C(=O)-, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 헤테로알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알키닐렌, 치환되거나 비치환된 C_6-C_{20} 아릴렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_{20} 헤테로아릴렌, -$(CH_2$-CH_2-$O)_{qa}$-, -$(O$-CH_2-$CH_2)_{qb}$-, -$(CH_2$-$CH(CH_3)$-$O)_{qc}$-, -$(O$-$CH(CH_3)$-$CH_2)_{qd}$-, 또는 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물이거나, 부재하고; (C_1-C_6 알킬렌)

[0230] R^{L}은 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 알킬, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_2-C_5 알키닐, 치환되거나 비치환된 C_3-C_8 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_7 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

[0231] qa, qb, qc 및 qd는 각각 독립적으로 1 내지 100의 정수이고;

[0232]  각각은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)에 부착되는 부착점이다.

[0233] 일부 실시양태에서, 링커는 화학식 (X')의 구조를 포함한다:

[0234] 

[0235] 상기 식에서, L'은 각각 독립적으로 -O-, $-NR^L-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)NR^L-$, $-NR^L(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-N(R^L)_2^+-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)N(R^L)_2^+-$, $-N(R^L)_2^+-(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-OP(=O)(OR^L)O-$, -S-, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)S-$, $-S(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, -S(=O)-, $-S(=O)_2-$, -C(=O)-, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)C(=O)-$, $-C(=O)(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, $-C(=O)NR^L-$, $-C(=O)NR^L(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)C(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=O)-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)NR^LC(=O)-$, $-NR^LC(=O)(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-OC(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=O)O-$, $-NR^LC(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=S)NR^L-$, $-CR^L=N-$, $-N=CR^L$, $-NR^LS(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^L-$, $-C(=O)NR^LS(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^LC(=O)-$, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 헤테로알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알키닐렌, 치환되거나 비치환된 C_6-C_{20} 아릴렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_{20} 헤테로아릴렌, $-(CH_2-CH_2-O)_{qa}-$, $-(O-CH_2-CH_2)_{qb}-$, $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{qc}-$, $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{qd}-$, 또는 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물이거나, 부재하고; (C_1-C_6 알킬렌);

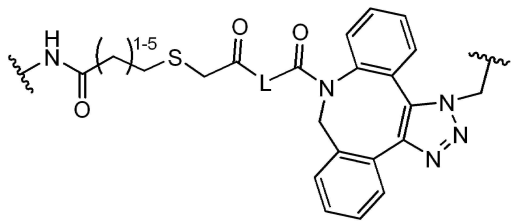
[0236] R^L은 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 알킬, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_2-C_5 알키닐, 치환되거나 비치환된 C_3-C_8 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_7 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

[0237] qa, qb, qc 및 qd는 각각 독립적으로 1 내지 100의 정수이고;

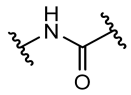
[0238] g는 1 내지 100의 정수이고;

[0239]  각각은 변형된 IL-2 폴리펩티드, 또는 항체 또는 항원 결합 단편에 부착되는 부착점이다.

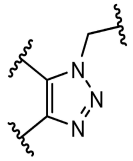
[0240] 일부 실시양태에서, 화학식 (X), 화학식 (X^a) 또는 화학식 (X')의 링커는 하기 구조 또는 이의 위치이성질체를 포함한다:

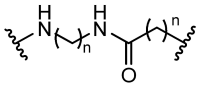
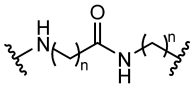
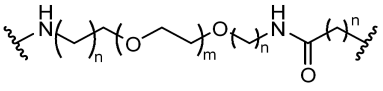
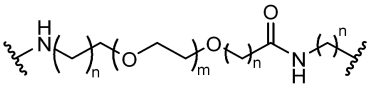
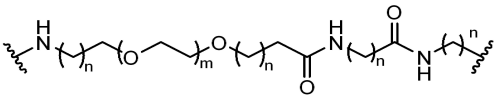
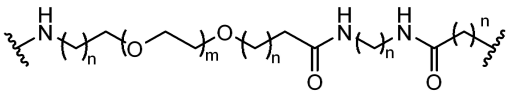
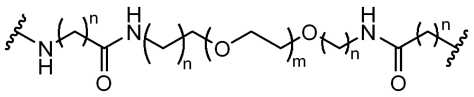
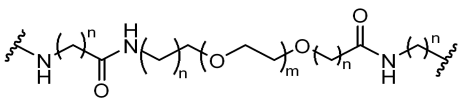
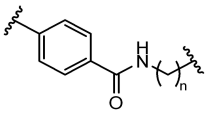
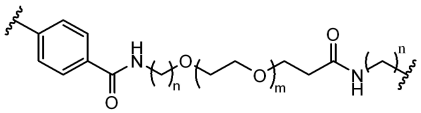
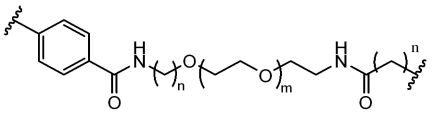
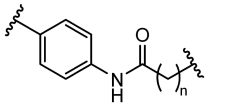
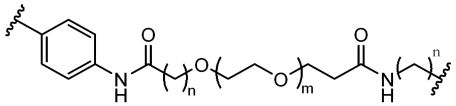
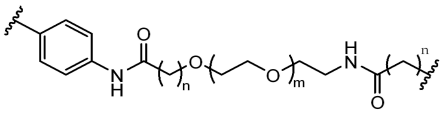
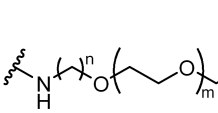
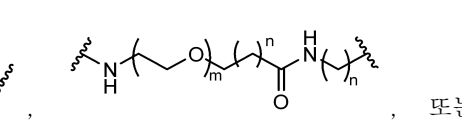
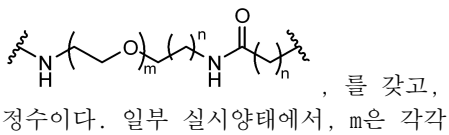
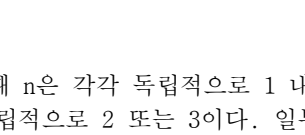
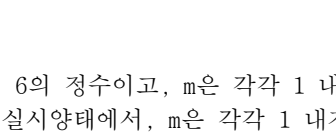
[0241] 

[0242] 상기 식에서,

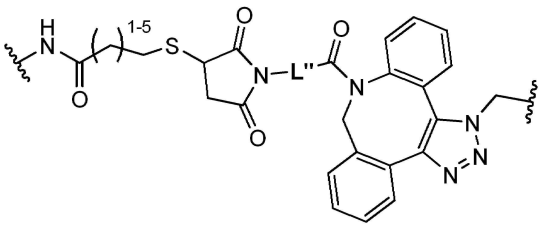
[0243]  는 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 라이신 잔기에 부착되는 제1 부착점이고;

[0244] L은 연결기이고;

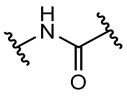
[0245]  는 제1 부착점에 연결되는 연결기에 부착되는 부착점이다.

[0246] 일부 실시양태에서, L은 구조  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는 , 를 갖고, 이때 n은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, m은 각각 1 내지 30의 정수이다. 일부 실시양태에서, m은 각각 독립적으로 2 또는 3이다. 일부 실시양태에서, m은 각각 1 내지 24, 1 내지 18, 1 내지 12, 또는 1 내지 6의 정수이다.

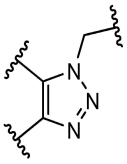
[0247] 일부 실시양태에서, 화학식 (X), 화학식 (X^a) 또는 화학식 (X')의 링커는 하기 구조 또는 이의 위치이성질체를 포함한다:

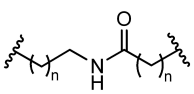
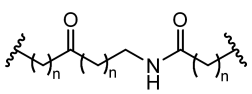
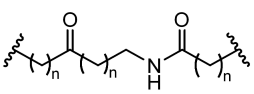
[0248] 

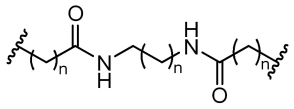
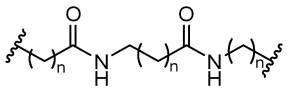
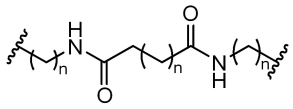
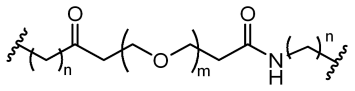
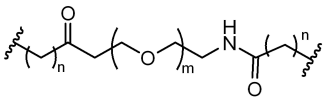
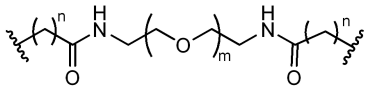
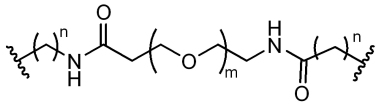
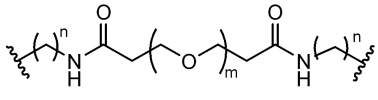
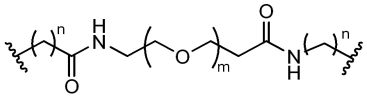
[0249] 상기 식에서,

[0250]  는 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드의 라이신 잔기에 부착되는 제1 부착점이고;

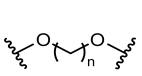
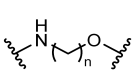
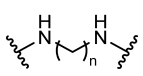
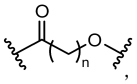
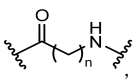
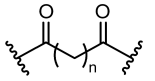
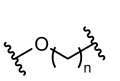
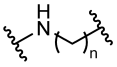
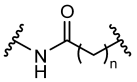
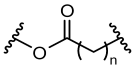
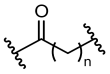
[0251] L은 연결기이고;

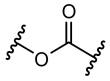
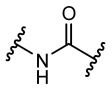
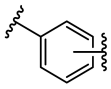
[0252]  는 제1 부착점에 연결되는 연결기에 부착되는 부착점이다.

[0253] 일부 실시양태에서, L''는 구조  ,  ,  ,

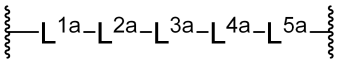

,

,

,

,

,

,

,

, 또는


를 갖고, 이때 n은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이고, m은 각각 독립적으로 1 내지 30의 정수이다. 일부 실시양태에서, m은 각각 독립적으로 2 또는 3이다. 일부 실시양태에서, m은 각각 1 내지 24, 1 내지 18, 1 내지 12, 또는 1 내지 6의 정수이다.

[0254] 일부 실시양태에서, L 또는 L''는

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


및 로부터 각각 독립적으로 선택된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개 이상의 서브유닛을 포함하고, 이때 n은 각각 독립적으로 1 내지 30의 정수이다. 일부 실시양태에서, n은 각각 독립적으로 1 내지 6의 정수이다. 일부 실시양태에서, L 또는 L''는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 상기 서브유닛을 포함한다.

[0255] 일부 실시양태에서, L 또는 L''는 화학식 (X'')의 구조이다:

[0256] 

[0257] 상기 식에서, L^{1a}, L^{2a}, L^{3a}, L^{4a}, L^{5a}는 각각 독립적으로 -O-, $-NR^{La}-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)NR^{La}-$, $-NR^{La}(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-N(R^L)_2^+-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)N(R^{La})_2^+(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-N(R^L)_2^+-$, $-OP(=O)(OR^{La})O-$, -S-, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)S-$, $-S(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, -S(=O)-, $-S(=O)_2-$, -C(=O)-, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)C(=O)-$, $-C(=O)(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, $-C(=O)NR^{La}-$, $-C(=O)NR^{La}(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)C(=O)NR^{La}-$, $-NR^{La}C(=O)-$, $-(C_1-C_6$ 알킬렌$)NR^{La}C(=O)-$, $-NR^{La}C(=O)(C_1-C_6$ 알킬렌$)-$, $-OC(=O)NR^{La}-$, $-NR^{La}C(=O)O-$, $-NR^{La}C(=O)NR^{La}-$, $-NR^{La}C(=S)NR^{La}-$, $-CR^{La}=N-$, $-N=CR^{La}$, $-NR^{La}S(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^{La}-$, $-C(=O)NR^{La}S(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^{La}C(=O)-$, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 헤테로알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알키닐렌, 치환되거나 비치환된 C_6-C_{20} 아릴렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_{20} 헤테로아릴렌, $-(CH_2-CH_2-O)_{qe}-$, $-(O-CH_2-CH_2)_{qf}-$, $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{qg}-$, $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{qh}-$, 또는 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물이거나, 부재하고;

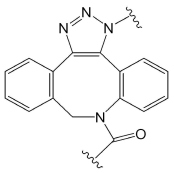
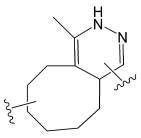
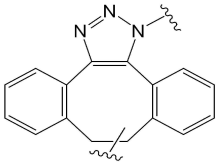
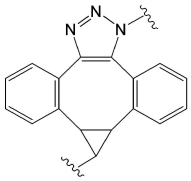
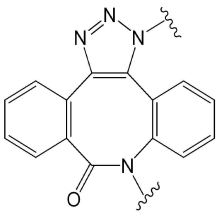
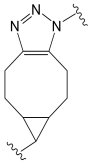
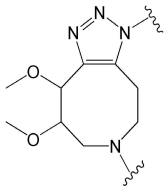
[0258] R^{La}는 각각 독립적으로 수소, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 알킬, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_2-C_5 알키닐, 치환되거나 비치환된 C_3-C_8 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_7 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고;

[0259] qe, qf, qg 및 qh는 각각 독립적으로 1 내지 100의 정수이다.

[0260] 일부 실시양태에서, L 또는 L''는 2개 내지 10개, 2개 내지 15개, 2개 내지 20개, 2개 내지 25개, 또는 2개 내지 30개 원자의 선형 쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선형 쇄는 하나 이상의 알킬 기(예를 들어, 저급 알킬 (C_1-C_4)), 하나 이상의 방향족 기(예를 들어, 페닐), 하나 이상의 아미드 기, 하나 이상의 에테르 기, 하나 이상의 에스테르 기, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0261] 일부 실시양태에서, 제1 부착점(예를 들어, 사이토카인에 부착되는 부착점)에 연결되는 연결기는 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연결기는 약 2개 내지 약 30개의 폴리(에틸렌 글리콜) 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 부착점(예를 들어, 사이토카인에 부착되는 부착점)에 연결되는 연결기는 아지드를 포함하는, 본원에서 제공된 사이토카인에 부착된 작용기이다(예를 들어, 트리아졸은 아지드의 반응 생성물이다).

[0262] 일부 실시양태에서, L은 -O-, $-NR^L-$, $-N(R^L)_2^+-$, $-OP(=O)(OR^L)O-$, -S-, -S(=O)-, $-S(=O)_2-$, -C(=O)-, -C(=O)O-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, $-C(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=O)-$, $-OC(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=O)O-$, $-NR^LC(=O)NR^L-$, $-NR^LC(=S)NR^L-$, $-CR^L=N-$, $-N=CR^L$, $-NR^LS(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^L-$, $-C(=O)NR^LS(=O)_2-$, $-S(=O)_2NR^LC(=O)-$, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 헤테로알킬렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알키닐렌, 치환되거나 비치환된 C_6-C_{20} 아릴렌, 치환되거나 비치환된 C_2-C_{20} 헤테로아릴렌, $-(CH_2-CH_2-O)_{qa}-$, $-(O-CH_2-CH_2)_{qb}-$, $-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{qc}-$ 또는 $-(O-CH(CH_3)-CH_2)_{qd}-$이고, 이때 R^L은 수소, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 알킬, 치환되거나 비치환된 C_1-C_4 헤테로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 치환되거나 비치환된 C_2-C_5 알키닐, 치환되거나 비치환된 C_3-C_8 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 C_2-C_7 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이고; qa, qb, qc 및 qd는 각각 독립적으로 1 내지 100의 정수이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물은 각각 독립적으로 트리아졸, 하이드라존, 피리다진, 설파이드, 디설파이드, 아미드, 에스테르, 에테르, 옥심 또는 알켄을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물 각각은 트리아졸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들과 상보적 접합 핸들의 반응 생성물 각각은  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  의 구조, 또는 이의 위치이성질체 또는 유도체를 포함한다.

[0264] 일부 실시양태에서, 링커는 절단 가능한 링커이다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 절단된다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 기계적 또는 물리적으로 절단된다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 화학적으로 절단된다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 환원 민감성 링커이다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 산화 민감성 링커이다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 pH의 결과로서 절단된다. 일부 실시양태에서, 상기 링커는 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 종양 대사산물에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 링커는 종양 미세환경에서, 종양 미세환경 근처에서, 또는 종양 미세환경 내에서 프로테아제에 의해 절단된다.

[0265] **IL-2 사이토카인**

[0266] 사이토카인은 세포 신호전달에 중요한, 체내에서 생성되는 단백질이다. 사이토카인은 면역 시스템을 조절할 수 있으며, 사이토카인 요법은 분자의 면역조절 성질을 이용하여 대상체의 면역 시스템을 향상시키고 암세포를 사멸시킨다. 본원은 향상된 생물학적 활성을 나타낼 수 있는, 사이토카인에 접합된 항-PD-1 폴리펩티드를 개시한다.

[0267] 인터류킨-2(IL-2)는 면역 시스템을 조절하는 데 중요한 사이토카인 신호전달 분자이다. IL-2는 면역 시스템이 외래 세포 유형과 내인성 세포 유형을 구별하는 것을 도와, 면역 시스템이 대상체 자신의 세포를 공격하지 못하게 하는 데 관여한다. IL-2는 림프구에 의해 발현된 IL-2 수용체(IL-2R)와의 상호작용을 통해 그의 활성을 달성한다. IL-2는 이러한 결합 상호작용을 통해 대상체의 T 이펙터(T_{eff}) 세포, 천연 킬러(NK) 세포 및 조절 T 세포(T_{reg}) 집단을 조절할 수 있다.

[0268] IL-2는 단독으로뿐만 아니라 다른 요법과 함께 암을 치료하는 데 사용되고 있다. 그러나, IL-2의 사용은 IL-2의 독성, 혈관 누출 증후군과 같은 바람직하지 않은 부작용 및 IL-2의 짧은 반감기에 의해 제한되었다. 본 개시내용의 IL-2와 항-PD-1 폴리펩티드의 접합은 IL-2 폴리펩티드 선택성을 개선할 수 있고, IL-2의 치료 잠재력을 향상시킬 수 있으며, IL-2 요법의 투여로 인한 부작용의 위험을 잠재적으로 감소시킬 수 있다.

[0269] 본 개시내용은 변형된 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩티드에 접합된 항-PD-1 폴리펩티드 및 치료제로서의 이의 용도를 기술한다. 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 면역요법으로서 사용될 수 있거나 다른 면역요법의 일부로서 사용될 수 있다. 이러한 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2 수용체(IL-2R)에 대해 야생형 IL-2와 상이한 결합 특성을 나타낼 수 있다. 한 측면에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2R αβγ 복합체(IL-2Rα)에 대해 감소된 친화성을 가진다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2R βγ 복합체(IL-2Rβ)에 대해 증가된 친화성을 가진다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβ 사이의 결합 친화성은 야생형 IL-2와 IL-2Rβ 사이의 결합 친화성과 동일하거나 더 높다. 본원에 기재된 실시양태에서 사용될 IL-2 아미노산 서열의 비제한적 예는 아래 표 8에서 제공된다.

[0270] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드는 야생형 IL-2에 비해 IL-2 수용체 베타 서브유닛을 통한 신호전달에 유리한 쪽으로 편향되는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 이것은 a) (예를 들어, 알파 서브유닛과 접촉하는 잔기에서 돌연변이를 갖게 하거나, 중합체를 알파 서브유닛과 접촉하는 잔기에 추가하거나, PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커를 알파 서브유닛과 접촉하는 잔기에 부착시킴으로써) IL-2 폴리펩티드와 IL-2 수용체 알파 서브유닛의 결합을 억제하거나 감소시키는 것, 및/또는 b) (예를 들어, 베타 서브유닛과 접촉하는 잔기에서 결합을 향상시키는 돌연변이를 갖게 함으로써) IL-2 폴리펩티드와 IL-2 수용체의 베타 서브유닛의 결합을 향상시키는 것 중 하나 또는 둘 다를 통해 달성된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역사이토카인 조성물의 IL-2 폴리펩티드는 야생형 IL-2에 비해 IL-2 수용체 베타 서브유닛 쪽으로 편향된다. IL-2 수용체 베타 신호전달 쪽으로 편향된 변형을 가진 IL-2 폴리펩티드의 비제한적 예는 예를 들어, PCT 공개 제WO2021140416A2호, 제WO2012065086A1호, 제WO2019028419A1호, 제WO2012107417A1호, 제WO2018119114A1호, 제WO2012062228A2호, 제WO2019104092A1호, 제WO2012088446A1호 및 제WO2015164815A1호에 기재되어 있고, 이 문헌들 각각은 그 전체가 본원에 기재된 것처럼 본원에 참고로 포함된다.

[0271] **IL-2 폴리펩티드에의 화학적 링커의 부착점**

[0272] 본원은 화학적 링커에 의해 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 결합하는 항체와 같은 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 논의된 바와 같이, 화학적 링커는 본원에서 제공된 임의의 위치에서 항-PD-1 폴리펩티드에 부착될 수 있다. 링커의 제2 부착점은 본원에서 제공된 IL-2 폴리펩티드에 부착된다.

[0273] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 서열번호 1의 아미노산 잔기 1 내지 133 중 어느 한 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 비-말단 아미노산 잔기(예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 잔기 2 내지 132 중 어느 하나, 또는 N-말단 또는 C-말단이 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 연장되어 있는 서열번호 1의 아미노산 잔기 1 내지 133 중 어느 하나)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 IL-2 폴리펩티드의 비-말단 아미노산 잔기에 부착되고, 이때 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 1에 비해 N-말단 절두 또는 C-말단 절두를 포함한다.

[0274] 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 IL-2 수용체(IL-2R) 단백질 또는 서브유닛과 상호작용하는 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 IL-2R 알파 서브유닛(IL-2Rα), IL-2R 베타 서브유닛(IL-2Rβ) 또는 IL-2R 감마 서브유닛(IL-2Rγ)과 상호작용하는 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양

태에서, 화학적 링커는 IL-2R 알파 서브유닛(IL-2Rα)과 상호작용하는 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 IL-2R 베타 서브유닛(IL-2Rβ)과 상호작용하는 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 링커는 IL-2R 감마 서브유닛(IL-2Rɣ)과 상호작용하는 아미노산 잔기에 부착된다.

[0275] 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드에 부착되는 부착점은 IL-2 폴리펩티드와 적어도 하나의 IL-2 수용체 서브유닛의 상호작용이 감소되거나 차단되도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 부착점은 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rα의 상호작용이 감소되거나 차단되도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 부착점은 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβ의 상호작용이 감소되도록 선택된다.

[0276] 일부 실시양태에서, 링커는 IL-2 폴리펩티드와 IL-2 수용체 알파 서브유닛(IL-2Rα)의 결합을 파괴하는 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 이들 잔기의 예는 PCT 공개 제WO2019028419A1호, 제WO2020056066A1호, 제WO2021140416A2호 및 제WO2021216478A1호에 기재된 바와 같이 잔기 3, 5, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 103, 104, 105 및 107을 포함하고, 이 문헌들 각각은 그 전체가 기재된 것처럼 본원에 참고로 포함된다.

[0277] 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1 내지 110 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되며, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30, 30 내지 50, 30 내지 70, 30 내지 100, 40 내지 50, 40 내지 70, 40 내지 100, 또는 40 내지 110 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 35, 37, 38, 41, 43, 44, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 69, 71, 72, 104, 105 및 107 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 또는 46 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 위치 1, 41, 42, 43, 44 및 45 중 어느 한 위치의 아미노산 잔기에서 IL-2 폴리펩티드에 부착되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 1, 42 또는 45에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 1에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 42에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 45에 부착된다.

[0278] 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 1로 제시된 IL-2 폴리펩티드의 천연 아미노산 잔기인 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 1로 제시된 IL-2 폴리펩티드의 천연 아미노산 잔기의 변형된 버전인 아미노산 잔기에 부착된다. 이러한 변형의 비제한적 예는 접합 핸들을 천연 아미노산 잔기에 통합시키거나 부착시키는 것(링커를 통한 방법을 포함함), 또는 임의의 적합한 방법을 이용하여 화학적 링커를 천연 아미노산에 부착시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 1의 IL-2 폴리펩티드에 비해 치환된 아미노산 잔기인 아미노산 잔기에 부착된다. 치환은 추가 작용기(예를 들어, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 라이신, 세린, 트레오닌 또는 티로신)이 부착되기 더 쉬운 천연 생성 아미노산, 임의의 천연 생성 아미노산의 변형된 버전의 유도체, 또는 임의의 비천연 아미노산(예를 들어, 원하는 반응성 기를 함유하는 아미노산, 예컨대, 클릭 화학반응 시약, 예컨대, 아지드, 알킨 등)에 대한 치환일 수 있다. 치환될 수 있는 아미노산의 비제한적 예는 -알파-(9-플루오레닐메틸옥시카르보닐)-L-비페닐알라닌(Fmoc-L-Bip-OH) 및 N-알파-(9-플루오레닐메틸옥시카르보닐)-O-벤질-L-티로신(Fmoc-L-Tyr(Bzl)-OH)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 비-정규 아미노산은 p-아세틸-L-페닐알라닌, p-요오도-L-페닐알라닌, p-메톡시페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-Dopa, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-보로노페닐알라닌, O-프로파르길티로신, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-브로모페닐알라닌, 셀레노시스테인, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라

닌, 아지도-라이신(AzK), 티로신 아미노산의 유사체; 글루타민 아미노산의 유사체; 페닐알라닌 아미노산의 유사체; 세린 아미노산의 유사체; 트레오닌 아미노산의 유사체; 알킬, 아릴, 아실, 아지도, 시아노, 할로, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티올, 설포닐, 셀레노, 에스테르, 티오산, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭, 에논, 이민, 알데하이드, 하이드록실아민, 케토, 또는 아미노 치환된 아미노산, β-아미노산; 프롤린 또는 히스티딘 이외의 환형 아미노산; 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판 이외의 방향족 아미노산; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-정규 아미노산은 β-아미노산, 호모아미노산, 환형 아미노산, 및 유도체화된 측쇄를 가진 아미노산으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비-정규 아미노산은 β-알라닌, β-아미노프로피온산, 피페리딘산, 아미노카프로산, 아미노헵탄산, 아미노피멜산, 데스모신, 디아미노피멜산, N^{α}-에틸글리신, N^{α}-에틸아스파르긴, 하이드록시라이신, 알로-하이드록시라이신, 이소데스모신, 알로-이소류신, ω-메틸아르기닌, N^{α}-메틸글리신, N^{α}-메틸이소류신, N^{α}-메틸발린, γ-카르복시글루타메이트, ε-N,N,N-트리메틸라이신, ε-N-아세틸라이신, O-포스포세린, N^{α}-아세틸세린, N^{α}-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신 및/또는 다른 유사한 아미노산을 포함한다.

[0279] 일부 실시양태에서, 링커는 비천연 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 접합 핸들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 링커가 변형된 IL-2 폴리펩티드에 추가되는 것을 용이하게 한다. 접합 핸들은 본원에서 제공된 임의의 접합 핸들일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 비천연 아미노산에 부위 특이적으로 공유결합된다. 접합 핸들을 포함하는 아미노산 잔기의 비제한적 예는 예를 들어, PCT 공개 제WO2015054658A1호, 제WO2014036492A1호, 제WO2021133839A1호, 제WO2006069246A2호 및 제WO2007079130A2호에서 확인될 수 있고, 이 문헌들 각각은 그 전체가 기재된 것처럼 참고로 포함된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 링커는 천연 아미노산으로 치환된 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 시스테인, 라이신 또는 티로신 잔기로 치환된 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 시스테인 잔기로 치환된 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 라이신 잔기로 치환된 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 티로신 잔기로 치환된 아미노산 잔기에 부착된다.

[0281] 일부 실시양태에서, 링커는 N-말단, A1, K35, F42Y, K43, F44Y 또는 Y45에서 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 N-말단, A1, F42Y 또는 Y45에서 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 말단 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 A1에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 F42Y에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기 Y45에 부착된다.

[0282] **IL-2 폴리펩티드에 대한 변형**

[0283] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 함유한다. 이러한 변형은 서열번호 1의 아미노산 서열과 같은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 돌연변이, 서열번호 1의 서열로부터 아미노산의 추가 및/또는 결실, 또는 아미노산 잔기에의 모이어티의 추가의 형태를 취할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열로부터 첫 번째 아미노산의 결실을 함유한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 기준 서열로서 사용할 때 C125S 돌연변이를 포함한다. 아미노산 잔기에 추가될 수 있는 모이어티는 중합체, 링커, 스페이서 및 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 특정 아미노산 잔기에 추가될 때, 이들 모이어티는 야생형 IL-2에 비해 변형된 IL-2 폴리펩티드의 활성 또는 다른 성질을 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 35 내지 46의 범위 내에서 2개의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나의 변형은 아미노산 잔기 40 내지 43의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, 하나의 변형은 아미노산 잔기 42에 있다. 일부 실시양태에서, 하나의 변형은 아미노산 잔기 44 내지 46의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, 하나의 변형은 아미노산 잔기 45에 있다.

[0284] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 하나 이상의 중합체를 함유한다. 예를 들어, 중합체를 특정 아미노산 잔기에 추가하는 것은 변형된 IL-2 폴리펩티드와 IL-2R, 특히 αβγ 복합체의 결합 상호작용을 파괴하는 효과를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이 상호작용을 파괴하기 위해 중합체가 추가되는 잔기는 F42 및 Y45를 포함한다. 일부 실시양태에서, 잔기 42 또는 45에 추가된 중합체는 IL-2 폴리펩티드와 PD-1에 결합하는 폴리펩티드 사이의 링커로서도 작용한다.

[0285] 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체와 같은 수용성 중합체이다. PEG 중합체(또는 링커)를 예를 들어, 티로신 잔기에 추가하는 것을 용이하게 하기 위해 F42 잔기를 또 다른 잔기로 돌연변이시킬 수 있다. 중합체는 잔기 F42 및 Y45 중 하나 또는 둘 다, 또는 이들의 돌연변이체에 추가될 수 있다. 이 중합체

는 IL-2 폴리펩티드와 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 사이에 링커의 형태로 존재할 수 있거나, 링커 이외의 추가 중합체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 2로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다.

표 2

야생형 IL-2 잔기 번호*	야생형 IL-2 잔기	돌연변이
31	Y	H, F, A
35	K	R, D, I, L, M, N, P, Q, T, Y
36	L	A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, R, S, W, Y
38	R	A, D, G, K, N, P, S, Y
40	L	D, G, N, S, Y
41	T	E, G, Y
42	F	A, D, E, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
43	K	H, Y
44	F	K, Y
45	Y	A, D, E, G, K, L, N, Q, R, S, T, V
46	M	I, Y
61	E	K, M, R, Y
62	E	D, L, T, Y
64	K	D, E, G, L, Q, R, Y
65	P	D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
66	L	A, F, Y
67	E	A, Y
68	E	V, Y
72	L	A, D, E, G, K, N, Q, R, S, T, Y
74	Q	P, G, A
88	N	D, E, A
125	C	S

*기준 서열인 서열번호 1을 기준으로 한 잔기 위치 넘버링

[0286]

[0287] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 3으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다.

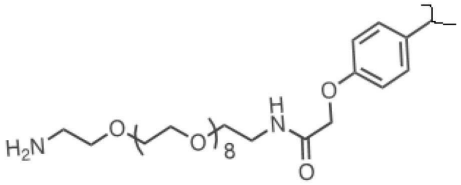
표 3

야생형 IL-2 잔기 번호*	야생형 IL-2 잔기	돌연변이
20	D	T, Y
31	Y	H, F, A
35	K	R, D, I, L, M, N, P, Q, T Y
38	R	A, D, G, K, N, P, S, Y
42	F	A, D, E, G, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
43	K	H, Y
45	Y	A, D, E, G, K, L, N, Q, R, S, T, V, Y
62	E	D, L, T, Y
65	P	D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V, W, Y
68	E	V, Y
72	L	A, D, E, G, K, N, Q, R, S, T, Y
74	Q	P, G, A
88	N	D, E, A
125	C	S

[0288] * 기준 서열인 서열번호 1을 기준으로 한 잔기 위치 넘버링

[0289] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 4로부터 선택된 하나 이상의 중합체를 포함한다.

표 4

중합체 식별기호 및 대략적인 분자량	중합체 구조
화학식 D 500 Da	

[0290]

[0291] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 5에서 제공된 바와 같은 돌연변이 및 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표의 중합체들 중 하나 이상은 PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 부착된 링커의 일부로 대체되거나 이러한 일부를 포함한다.

표 5

돌연변이*	중합체 잔기 위치	중합체
F42Y	42, 45	화학식 D(잔기 42, 45)
없음	45	화학식 D
F42A	45	화학식 D
F42Y, L72G	42, 45	화학식 D(잔기 42, 45)
F42Y, P65Y	42, 65	화학식 D(잔기 42, 65)
F42Y, P65Y	42, 45, 65	화학식 D(잔기 42, 45, 65)
R38Y, F42Y, E62Y, E68Y	38, 42, 45, 62, 68	화학식 D(잔기 38, 42, 45, 62, 68)
F42Y, L72Y	42, 45, 72	화학식 D(잔기 42, 45, 75)
F42Y, Y45K	42	화학식 D
F42A	45	화학식 D
L72G	45	화학식 D
F42Y	42, 45	화학식 D(잔기 42), PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커(잔기 45)
F42Y	42, 45	화학식 D(잔기 45), PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커(잔기 42)

*기준 서열인 서열번호 1을 기준으로 한 잔기 위치 넘버링

[0292]

[0293] 일부 경우, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 재조합체일 수 있다. 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드로서 발현되기보다는 화학적으로 합성될 수도 있다. 합성 IL-2 폴리펩티드는 적어도 PCT 공개 제WO2021140416A2호, 미국 특허 출원 공개 제US20190023760A1호 및 문헌[Asahina *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, *54*, 8226-8230]에 기재되어 있고, 이 문헌들 각각은 그 전체가 본원에 기재된 것처럼 참고로 포함된다. 변형된 IL-2 폴리펩티드는 전체 길이 변형된 IL-2 폴리펩티드의 하나 이상의 단편을 합성하고, 단편을 함께 라이게이션시키고, 라이게이션된 전체 길이 폴리펩티드를 폴딩함으로써 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 서열의 F42Y 돌연변이, 아미노산 잔기 F42Y에 공유결합된 약 500 Da의 제1 PEG 중합체, 아미노산 잔기 Y45에 공유결합된 약 500 Da의 제2 PEG 중합체, 및 변형된 IL-2 폴리펩티드의 N-말단에 공유결합된 약 6 kDa의 임의적 제3 PEG 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG 중합체는 IL-2 폴리펩티드를 PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 일부를 포함한다.

[0294] 일부 실시양태에서, 화학적으로 합성된 IL-2 폴리펩티드는 링커를 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 것을 용이하게 하기 위해 하나 이상의 잔기에 부착된 접합 핸들을 포함한다. 접합 핸들은 본원에서 제공된 임의의 이러한 접합 핸들일 수 있으며 링커가 부착될 수 있는 임의의 잔기에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 IL-2 폴리펩티드의 잔기 42 또는 45에 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 아지드 또는 알킨을 포함한다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 접합 핸들은 재조합 IL-2 폴리펩티드의 비천연 또는 변형된 천연 아미노산에 통합된다. 비천연 아미노산을 가진 재조합 IL-2 폴리펩티드는 예를 들어, 특허 협력 조약 공개 제WO2016115168호, 제WO2002085923호, 제WO2005019415호 및 제WO2005003294호에 기재된 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 대상체에게 투여될 때 T 이펙터(T_{eff}) 또는 천연 킬러(NK) 세포 증식을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 대상체에게 투여될 때 조절 T 세포(T_{reg})의 우선적인 활성화를 방지하면서 T_{eff} 또는 NK 세포 증식을 향상시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD8+ T 및 NK 세포를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 대상체에게 투여될 때 1에 가까운 T_{eff}/T_{reg} 비를 생성한다.

[0296] 한 측면에서, 본원은 변형된 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩티드를 포함하는 변형된 폴리펩티드를 기술하는 것으로, 이때 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드는 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 본원은 변형된 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩티드를 포함하는 변형된 폴리펩티드를 기술하는 것으로, 이때 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 F42Y에서 공유결합된 제1 중합체를 포함하고, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 IL-2 폴리펩티드, 및 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 부착시키는 링커와 동일하다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 링커와 구별되는 추가 중합체이다. 또 다른 측면에서, 본원은 변형된 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩티드를 포함하는 변형된 폴리펩티드를 기술하는 것으로, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드는 1차 T_{reg}(IL-2Rα/β/γ 수용체를 발현함) 및 휴면 CD8+ T_{eff}(IL-2Rβ/γ 수용체를 발현함)에 대한 아고니스트 어세이에서 절반 최대 유효 농도(EC50)로 측정될 때 고친화성 이종삼량체성 IL-2 수용체(IL-2Rα/β/γ)를 발현하는 세포에 대한 감소된 기능적 활성 및 중간 친화성 이종이량체성 IL-2 수용체(IL-2Rβ/γ)를 발현하는 세포에 대한 더 큰 기능적 활성을 나타내고, 이때 IL-2Rβ에 대한 변형된 IL-2 폴리펩티드의 EC50 값 대 IL-2Rα에 대한 변형된 IL-2 폴리펩티드의 EC50 값의 비는 3:1 미만이다. 일부 경우, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 8 또는 표 5에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 2 또는 표 3에서 제공된 돌연변이를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및/또는 표 4에서 제공된 중합체를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드이다.

[0297] **생물학적 활성**

[0298] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 바와 같이 항-PD-1 폴리펩티드에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드를 포함하는 면역접합체는 낮은 또는 중간 수준의 표면 PD-1을 발현하는 말초에서 면역 세포에 대한 감소된 친화성을 나타내면서, 종양(예를 들어, 종양 침윤 림프구(TIL)) 또는 종양 배액 림프절 내에 위치하는 높은 수준의 PD-1(CD279)을 발현하는 면역 세포에 대해 향상된 친화성을 보인다.

[0299] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드를 포함하는 면역접합체는 비표적화 IL-2 폴리펩티드 또는 비표적화 IL-2 면역접합체에 비해 혈장에서의 노출에 비해 종양 또는 종양 배액 림프절 내에서 향상된 노출을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체의 혈장 또는 혈청에서의 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 내에서의 노출의 비는 비표적화 IL-2 면역접합체 또는 비접합 IL-2 폴리펩티드에 비해 적어도 2배, 5배, 10배, 20배, 30배 또는 40배 이상 더 높다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 종양 배액 림프절 내에서의 PD1-IL2 면역접합체의 반감기는 혈장 또는 혈청에서의 그의 반감기에 비해 10배 내지 100배 더 높다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체의 혈장 또는 혈청에서의 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 내에서의 노출의 비는 비표적화 IL-2 면역접합체 또는 비접합 IL-2 폴리펩티드에 비해 10배 내지 100배, 20배 내지 100배, 30배 내지 100배, 40배 내지 100배, 20배 내지 75배, 30배 내지 75배, 40배 내지 100배, 또는 40배 내지 75배 더 높다.

[0300] 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체는 PD-1을 표적화하지 않는 IL-2 면역접합체 또는 IL-2 폴리펩티드에 비해 혈장 또는 혈청 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 노출의 향상된 비를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항-PD1-IL-2 면역접합체의 혈장 또는 혈청 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 노출의 비는 PD-1을 표적화하지 않는 IL-2 면역접합체 또는 IL-2 폴리펩티드에 비해 적어도 2배, 5배, 10배, 20배, 30배 또는 40배 더 높다. 일부 실시양태에서, 항-PD1-IL-2 면역접합체의 혈장 또는 혈청 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 노출의 비는 PD-1을 표적화하지 않는 IL-2 면역접합체 또는 IL-2 폴리펩티드에 비해 10배 내지 100배 더 높다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체의 혈장 또는 혈청 노출에 대한 종양 또는 종양 배액 림프절 노출의 비는 비표적화 IL-2 면역접합체 또는 IL-2 폴리펩티드에 비해 10배 내지 100배, 20배 내지 100배, 30배 내지 100배, 40배 내지 100배, 20배 내지 75배, 30배 내지 75배, 40배 내지 100배, 또는 40배 내지 75배 더 높다.

[0301] 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체에 의해 유도된, 다른 조직 내의 면역 세포 집단(예를 들어, 다른 조직 내의 동일한 유형의 면역 세포)의 증폭에 대한 종양(예를 들어, 종양 침윤 림프구(TIL)) 및 종양 배액 림프절 내의 면역 세포 집단의 증폭의 비는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5 이상이다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체에 의해 유도된, 다른 조직 내의 면역 세포 집단의 증폭에 대한 종양 및 종양 배액 림프절 내의 면역 세포 집단의 증폭의 비는 약 1.5 내지 10, 약 2 내지 10, 약 2.5 내지 10, 약 3 내지 10, 약 1.5 내지 8, 약 2 내지 8, 약 2.5 내지 8, 약 3 내지 8, 약 1.5 내지 6, 약 2 내지 6, 약 2.5 내지 6, 또는 약 3 내지 6이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 집단은 미감작 CD8+ 세포, CD4+ 헬퍼 세포, CD8+ 중추 기억 세포, CD8+ 이펙터 기억 세포, NK 세포, NKT 세포, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 적어도 하나이다. 일부 실시양태에서, 상기 비는 투여 후 특정된 시간(예를 들어, 6시간, 12시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또

는 7일)에 측정된다.

[0302] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 폴리펩티드에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드를 포함하는 PD1-IL2 면역접합체는 PD-L1을 발현하지 않거나 단지 중간 수준의 PD-1을 발현하는 세포에 비해 높은 수준의 PD-1을 발현하는 세포에서 변형된 IL-2 폴리펩티드의 시스-신호전달로 인해 향상된 효능을 보여준다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체의 경우, 높은 수준의 PD-1을 발현하는 세포에서의 IL-2 경로 개입의 EC50 값(pSTAT5 어세이)에 대한, PD-1을 발현하지 않거나 단지 중간 수준의 PD-1을 발현하는 세포에서의 IL-2 경로 개입의 EC50 값(pSTAT5 어세이)의 비는 적어도 10, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도 750, 적어도 1000, 적어도 1500, 적어도 2000, 적어도 2500 또는 적어도 3000이다. 일부 실시양태에서, PD1-IL2 면역접합체의 경우, 높은 수준의 PD-1을 발현하는 세포에서의 IL-2 경로 개입의 EC50 값(pSTAT5 어세이)에 대한, PD-1을 발현하지 않거나 단지 중간 수준의 PD-1을 발현하는 세포에서의 IL-2 경로 개입의 EC50 값(pSTAT5 어세이)의 비는 PD-1을 표적화하지 않는 IL-2 면역접합체 또는 IL-2 폴리펩티드에 비해 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배 또는 적어도 1000배이다.

[0303] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 야생형 IL-2와 상이한 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 아래에 제공된 이러한 변형된 생물학적 활성은 IL-2 폴리펩티드 단독(예를 들어, PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 접합되지 않거나 달리 부착되지 않음)에 적용될 뿐만 아니라, IL-2 폴리펩티드가 PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 접합되거나 달리 부착된 경우에도 적용된다(예를 들어, 변형된 생물학적 활성은 접합 또는 부착 시 유지된다). 따라서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 표시된 활성을 가진 것으로서 본원에 기재되는 경우, 본원에서 제공된 면역사이토카인 조성물(예를 들어, PD-1에 결합하는 폴리펩티드에 부착된 IL-2 폴리펩티드)도 동일한 활성을 가진 것으로 여겨진다.

[0304] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD4+ 헬퍼 세포, CD8+ 중추 기억 세포, CD8+ 이펙터 기억 세포, 미감작 CD8+ 세포, 천연 킬러(NK) 세포, 천연 킬러 T(NKT) 세포 집단, 또는 이들의 조합을 증폭시킬 수 있다. 일부 경우, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 8 또는 표 5에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 2 또는 표 3에서 제공된 돌연변이를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및/또는 표 4에서 제공된 중합체를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드이다.

[0305] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 이펙터 T 세포(T_{eff} 세포)의 세포 집단을 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 100% 또는 적어도 200% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 20% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 30% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 40% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 50% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 100% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 적어도 200% 증폭시킨다.

[0306] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 이펙터 T 세포(T_{eff} 세포)의 세포 집단을 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 5%, 최대 10%, 최대 20%, 최대 30%, 최대 40%, 최대 50%, 최대 75%, 최대 100% 또는 최대 500% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 5% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 20% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 50% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는

T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 100% 증폭시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드가 상기 집단과 접촉할 때, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 T_{eff} 세포의 세포 집단을 최대 500% 증폭시킨다.

[0307] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 약 0.1 내지 약 15, 약 0.5 내지 약 10, 약 0.75 내지 약 5, 또는 약 1 내지 약 2이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 0.1 내지 15이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 0.1 내지 0.5, 0.1 내지 0.75, 0.1 내지 1, 0.1 내지 2, 0.1 내지 5, 0.1 내지 10, 0.1 내지 15, 0.5 내지 0.75, 0.5 내지 1, 0.5 내지 2, 0.5 내지 5, 0.5 내지 10, 0.5 내지 15, 0.75 내지 1, 0.75 내지 2, 0.75 내지 5, 0.75 내지 10, 0.75 내지 15, 1 내지 2, 1 내지 5, 1 내지 10, 1 내지 15, 2 내지 5, 2 내지 10, 2 내지 15, 5 내지 10, 5 내지 15, 10 내지 15, 또는 이들 사이의 임의의 숫자 또는 범위이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 약 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2, 5, 10 또는 15이다. 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 적어도 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2, 5 또는 10이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 T_{reg} 세포의 세포 집단 증폭에 대한 T_{eff} 세포의 세포 집단 증폭의 비는 최대 0.5, 0.75, 1, 2, 5, 10 또는 15이다.

[0308] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의해 증폭된 세포 집단은 시험관내 세포 집단, 생체내 세포 집단 또는 생체외 세포 집단이다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 시험관내 세포 집단이다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 생체내 세포 집단이다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 생체외 세포 집단이다. 세포 집단은 CD4+ 헬퍼 세포, CD8+ 중추 기억 세포, CD8+ 이펙터 기억 세포, 미감작 CD8+ 세포, 천연 킬러(NK) 세포, 천연 킬러 T(NKT) 세포, 또는 이들의 조합의 집단일 수 있다.

[0309] 일부 실시양태에서, 세포 수준은 변형된 IL-2 폴리펩티드를 주사한 지 1시간 후에 측정된다. 일부 실시양태에서, 세포 수준은 변형된 IL-2 폴리펩티드를 주사한 지 2시간 후에 측정된다. 일부 실시양태에서, 세포 수준은 변형된 IL-2 폴리펩티드를 주사한 지 4시간 후에 측정된다. 일부 실시양태에서, 세포 수준은 변형된 IL-2 폴리펩티드를 주사한 지 30분 후에 측정된다(예를 들어, 시험관내 실험의 경우). 일부 실시양태에서, 세포 수준은 특히 생체내 실험의 경우 연장된 시점(예를 들어, 6시간, 12시간, 24시간, 72시간, 96시간, 120시간, 144시간, 168시간 등)에서 측정된다.

[0310] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역접합체 조성물(예를 들어, 링커를 통해 IL-2 폴리펩티드에 부착된, PD-1에 결합하는 폴리펩티드(예를 들어, 항-PD-1 항체, 예컨대, 펨브롤리주맙 또는 LZM-009))은 2개의 기들 사이의 연결의 형성 후 구성요소들 중 적어도 하나와 관련된 결합 친화성을 유지한다. 예를 들어, IL-2 폴리펩티드에 연결된 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체 조성물에서, 일부 실시양태에서 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 Fc 수용체와의 결합을 유지한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 비접합 항체에 비해 약 5배 이하, 약 10배 이하, 약 15배 이하 또는 약 20배 이하만큼 감소된, 하나 이상의 Fc 수용체와의 결합을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 Fc 수용체는 FcRn 수용체, FcγRI 수용체(CD64), FcγRIIa 수용체(CD32α), FcγRIIβ 수용체(CD32β), FcγRIII 수용체(CD16a) 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, FcRn 수용체, FcγRI 수용체(CD64), FcγRIIa 수용체(CD32α), FcγRIIβ 수용체(CD32β) 및 FcγRIII 수용체(CD16a) 각각과 상기 조성물의 결합은 비접합 항체에 비해 약 10배 이하만큼 감소된다.

[0311] 일부 실시양태에서, PD-1에 결합하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체)와 PD-1의 결합은 IL-2 폴리펩티드와의 접합에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리펩티드와 PD-1의 결합은 비접합 항체에 비해 약 5% 이하만큼 감소된다.

[0312] **부위 특이적 변형**

[0313] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 하나 이상의 아미노산 잔기에서 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 야생형 인간 IL-2 폴리펩티드를 기준으로 한다. 일부 경우, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 본원에 기재된 변형된 IL-2

폴리펩티드, 표 8 또는 표 5에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 2 또는 표 3에서 제공된 돌연변이를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및/또는 표 4에서 제공된 중합체를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드이다.

[0314] 본원에 기재된 폴리펩티드에 대한 변형은 단백질 또는 단백질 단편의 야생형 버전의 돌연변이, 다양한 작용기의 추가, 아미노산의 결실, 아미노산의 추가 또는 임의의 다른 변경을 포함한다. 폴리펩티드에 추가될 수 있는 작용기는 중합체, 링커, 알킬 기, 발색단 또는 형광단과 같은 검출 가능한 분자, 반응성 작용기, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용기는 폴리펩티드의 개별 아미노산에 추가된다. 일부 실시양태에서, 작용기는 폴리펩티드에 부위 특이적으로 추가된다. 일부 실시양태에서, 작용기는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 데 사용되는 링커의 적어도 일부를 포함한다.

[0315] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 35 내지 46의 영역의 아미노산 잔기에서 변형을 포함하고, 이때 잔기 넘버링은 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 변형은 K35, L36, T37, R38, M39, L40, T41, F42, K43, F44, Y45 또는 M46에 있다. 일부 실시양태에서, 변형은 F42에 있다. 일부 실시양태에서, 변형은 Y45에 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 N-말단 잔기에서 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 C125S 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 A1 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형은 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 데 사용되는 링커의 부착을 포함한다.

[0316] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 35 내지 46 중 임의의 아미노산 잔기에서 공유결합된 제1 중합체를 포함하고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 39 내지 43 중 임의의 아미노산 잔기에서 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 F42에서 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 F42Y에서 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 44 내지 46 중 임의의 아미노산 잔기에서 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 Y45에서 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 일부이다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커와는 별개의 변형이다.

[0317] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 35부터 아미노산 잔기 45에 이르는 영역 내의 아미노산 잔기에 위치하는 하나 이상의 PEG화된 티로신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG화된 티로신은 아미노산 잔기 42, 아미노산 잔기 45, 또는 이들 둘 다에 위치한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG화된 티로신은 아미노산 잔기 42에 위치한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG화된 티로신은 아미노산 잔기 45에 위치한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG화된 티로신은 아미노산 잔기 42 및 아미노산 잔기 45 둘 다에 위치한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 각각 독립적으로 화학식 (I)의 구조를 가진 2개의 PEG화된 티로신을 포함한다. 본원에서 제공된 바와 같은 다양한 링커 부착점 및 중합체를 가진, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 비제한적 세트는 아래 표 7에 제시되어 있다.

표 7

IL-2 구축물	링커 부착점	중합체 1 부착점	중합체 2 부착점
A	N-말단	잔기 42	잔기 45
B	N-말단	잔기 42	없음
C	N-말단	잔기 45	없음
D	잔기 42	잔기 45	없음
E	잔기 42	N-말단	잔기 45
F	잔기 42	N-말단	없음
G	잔기 45	잔기 42	없음
H	잔기 45	N-말단	잔기 42
I	잔기 45	N-말단	없음
J	N-말단	잔기 65	없음
K	잔기 65	N-말단	없음

[0318] *기준 서열인 서열번호 1을 기준으로 한 잔기 위치 넘버링

[0319] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 합성 폴리펩티드이다. 한 측면에서, 본원은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드를 개시한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 F42Y 및 Y45를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 35 내지 45 중 어느 하나에 위치한 호모세린(Hse) 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 61 내지 81 중 어느 하나에 위치한 Hse 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 94 내지 114 중 어느 하나에 위치한 Hse 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 1개, 2개 또는 3개 이상의 Hse 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse41, Hse71, Hse104 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse41, Hse71 및 Hse104를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 2개의 아미노산 치환을 포함하고, 이때 적어도 2개의 아미노산 치환은 (a) 아미노산 잔기 35 내지 45 중 어느 하나에 위치한 호모세린(Hse) 잔기; (b) 아미노산 잔기 61 내지 81 중 어느 하나에 위치한 호모세린 잔기; 및 (c) 아미노산 잔기 94 내지 114 중 어느 하나에 위치한 호모세린 잔기로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse41 및 Hse71을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse41 및 Hse104를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse71 및 Hse104를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse41을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse71을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Hse104를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 1개, 2개 또는 3개 이상의 노르류신(Nle) 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 잔기 18 내지 28 중 어느 하나에 위치한 Nle 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 34 내지 50 중 어느 하나에 위치한 하나 이상의 Nle 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기 20 내지 60 중 어느 하나에 위치한 Nle 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 3개의 Nle 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 Nle23, Nle39 및 Nle46을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 A1 결실을 가진 서열번호 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 A1 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 A1 결실을 가진 서열번호 4를 포함한다.

[0320] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 8에서 제공된 서열번호 3 내지 23 중 어느 한 서열번호의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 3 내지 23 중 어느 한 서열번호의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 3의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 4의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 9의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 10의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 11의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 12의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 13의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 14의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 15의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 17의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%,

99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 18의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 19의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 20의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 21의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 22의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 23의 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

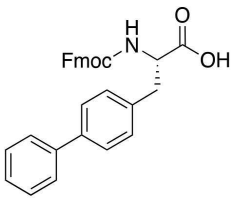
[0321] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 9개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 3개 내지 9개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 3개 또는 4개의 아미노산 치환, 3개 내지 5개의 아미노산 치환, 3개 내지 6개의 아미노산 치환, 3개 내지 7개의 아미노산 치환, 3개 내지 9개의 아미노산 치환, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 4개 내지 6개의 아미노산 치환, 4개 내지 7개의 아미노산 치환, 4개 내지 9개의 아미노산 치환, 5개 또는 6개의 아미노산 치환, 5개 내지 7개의 아미노산 치환, 5개 내지 9개의 아미노산 치환, 6개 또는 7개의 아미노산 치환, 6개 내지 9개의 아미노산 치환, 또는 7개 내지 9개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 3개의 아미노산 치환, 4개의 아미노산 치환, 5개의 아미노산 치환, 6개의 아미노산 치환, 7개의 아미노산 치환, 또는 9개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 최대 4개의 아미노산 치환, 5개의 아미노산 치환, 6개의 아미노산 치환, 7개의 아미노산 치환, 또는 9개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 표 2로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 표 3으로부터 선택된다. 일부 경우, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 8 또는 표 5에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 2 또는 표 3에서 제공된 돌연변이를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및/또는 표 4에서 제공된 중합체를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드이다.

[0322] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 제2 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 제3 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 제2 변형 및 제3 변형을 포함한다.

[0323] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열번호 3과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100% 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 동일성은 매트릭스 BLOSUM62, Gap Costs Existence:11, Extension:1 및 조성 조절 조건부 조성 점수 매트릭스 조절의 파라미터를 사용하는 단백질-단백질 BLAST 알고리즘에 의해 측정된다.

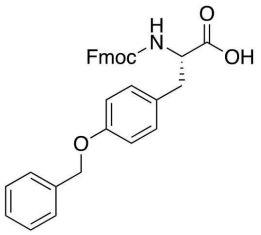
[0324] 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 하나 이상의 비-정규 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 일부 경우, Tyr 45 및/또는 Phe 42는 비-정규 아미노산으로 치환된다. 일부 실시양태에서, 표 2 및/또는 표 3에서 제공된 위치에 위치한 하나 이상의 아미노산은 하나 이상의 비-정규 아미노산으로 치환된다. 비-정규 아미노산은 N-알파-(9-플루오레닐메틸옥시카르보닐)-L-비페닐알라닌(Fmoc-L-Bip-OH) 및 N-알파-(9-플루오레닐메틸옥시카르보닐)-O-벤질-L-티로신(Fmoc-L-Tyr(Bzl)-OH)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 비-정규 아미노산은 p-아세틸-L-페닐알라닌, p-요오도-L-페닐알라닌, p-메톡시페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-Dopa, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-보로노페닐알라닌, O-프로파르길티로신, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-브로모페닐알라닌, 셀레노시스테인, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, 아지도-라이신(AzK), 티로신 아미노산의 유사체; 글루타민 아미노산의 유사체; 페닐알라닌 아미노산의 유사체; 세린 아미노산의 유사체; 트레오닌 아미노산의 유사체; 알킬, 아릴, 아실, 아지도, 시아노,

할로, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실, 알케닐, 알킨일, 에테르, 티올, 설포닐, 셀레노, 에스테르, 티오산, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭, 에논, 이민, 알데하이드, 하이드록실아민, 케토 또는 아미노 치환된 아미노산, β-아미노산; 프롤린 또는 히스티딘 이외의 환형 아미노산; 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판 이외의 방향족 아미노산; 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-정규 아미노산은 β-아미노산, 호모아미노산, 환형 아미노산 및 유도체화된 측쇄를 가진 아미노산으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비-정규 아미노산은 β-알라닌, β-아미노프로피온산, 피페리딘산, 아미노카프로산, 아미노헵탄산, 아미노피멜산, 데스모신, 디아미노피멜산, N^{α}-에틸글리신, N^{α}-에틸아스파르긴, 하이드록시라이신, 알로-하이드록시라이신, 이소데스모신, 알로-이소류신, ω-메틸아르기닌, N^{α}-메틸글리신, N^{α}-메틸이소류신, N^{α}-메틸발린, γ-카르복시글루타메이트, ε-N,N,N-트리메틸라이신, ε-N-아세틸라이신, O-포스포세린, N^{α}-아세틸세린, N^{α}-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신 및/또는 다른 유사한 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tyr 45 및/또는 Phe 42는 변형된 티로신 잔기로 치환된다. 일부 실시양태에서, 변형된 티로신 잔기는 아미노, 아지드, 알릴, 에스테르 및/또는 아미드 작용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 위치 42 또는 45의 변형된 티로신 잔기는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커에 대한 부착점으로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 위치 42 및/또는 45의 변형된 티로신 잔기는 전구체 구조 1, 구조 2, 구조 3, 구조 4 또는 구조 5로부터 구축된 구조를 갖고, 이때 구조 1은



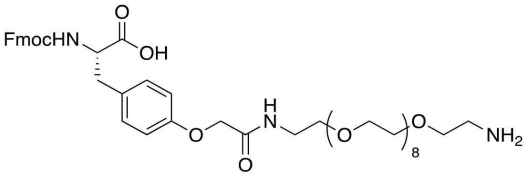
구조 1

[0325] 이고, 구조 2는



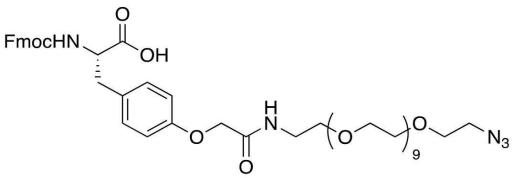
구조 2

[0326] 이고, 구조 3은



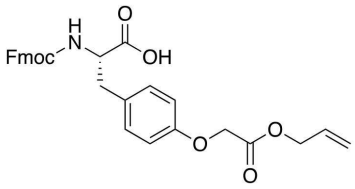
구조 3

[0327] 이고, 구조 4는



구조 4

[0328] 이고, 구조 5는



구조 5

[0329] 이다.

[0330] **중합체**

[0331] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 그에 공유결합된 하나 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 기재된 변형 IL-2 폴리펩티드는 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 적어도 일부를 포함한다. 일부 경우, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 4에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드, 표 2 또는 표 3에서 제공된 돌연변이를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및/또는 표 3에서 제공된 중합체를 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드이다.

[0332] 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드)이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 다당류이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 옥사이드)이다.

[0333] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2 폴리펩티드의 N-말단에 공유결합된 제1 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 그에 공유결합된 제2 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 그에 공유결합된 제2 중합체 및 제3 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 아미노산 잔기 42 또는 45에 공유결합되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 아미노산 잔기 F42Y 또는 Y45에 공유결합되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체 및 제3 중합체는 아미노산 잔기 42 및 45에 공유결합되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체 및 제3 중합체는 아미노산 잔기 F42Y 및 Y45에 공유결합되고, 이때 변형된 IL-2 폴리펩티드의 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체, 제2 중합체 또는 제3 중합체 중 적어도 하나는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 데 사용되는 링커의 적어도 일부를 포함한다.

[0334] 일부 실시양태에서, 제1 중합체와 같은 부착된 중합체는 약 120 달톤 내지 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 중합체는 약 120 달톤 내지 약 250 달톤, 약 120 달톤 내지 약 300 달톤, 약 120 달톤 내지 약 400 달톤, 약 120 달톤 내지 약 500 달톤, 약 120 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 250 달톤 내지 약 300 달톤, 약 250 달톤 내지 약 400 달톤, 약 250 달톤 내지 약 500 달톤, 약 250 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 300 달톤 내지 약 400 달톤, 약 300 달톤 내지 약 500 달톤, 약 300 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 400 달톤 내지 약 500 달톤, 약 400 달톤 내지 약 1,000 달톤, 또는 약 500 달톤 내지 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 중합체는 약 120 달톤, 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤 또는 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 중합체는 적어도 약 120 달톤, 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤 또는 약 500 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 중합체는 최대 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤 또는 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다.

[0335] 일부 실시양태에서, 제1 중합체와 같은 부착된 중합체는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드)과 같은 폴리(알킬렌 옥사이드)이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 변형된 폴리(알킬렌 옥사이드)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 폴리(알킬렌 옥사이드)는 하나 이상의 링커 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 링커

기는 아미드 기, 에스테르 기, 에테르 기, 티오에테르 기, 카르보닐 기 등과 같은 이작용성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 링커 기는 아미드 링커 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 폴리(알킬렌 옥사이드)는 하나 이상의 스페이서 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 기는 치환되거나 비치환된 C_1-C_6 알킬렌 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 기는 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2-$를 포함한다.

일부 실시양태에서, 링커 기는 바이오오르토고날(biorthogonal) 반응(예를 들어, 생체적합성 및 선택적 반응)의 생성물이다. 일부 실시양태에서, 바이오오르토고날 반응은 Cu(I) 촉매작용 또는 "구리 부재" 알킨-아지드 트리아졸 형성 반응, 스타우딩거 라이게이션, 역전자 요구 딜스-알더(IEDDA) 반응, "포토-클릭" 화학반응, 또는 금속 매개 공정, 예컨대, 올레핀 복분해 및 스즈키-미야우라 또는 소노가시라 교차커플링이다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 클릭 화학반응을 통해 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 적어도 일부를 포함한다.

[0336] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 변형된 IL-2 폴리펩티드와 유도체화된 분자 또는 모이어티, 예컨대, 항체 및 중합체의 접합을 용이하게 하는 반응성 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 카르복실산 유래 활성 에스테르, 혼합 무수물, 아실 할라이드, 아실 아지드, 알킬 할라이드, N-말레이미드, 이미노 에스테르, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 아지드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 일부를 형성한다.

[0337] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 아미노산 잔기에 공유결합된 화학적 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 바이오오르토고날 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 아지드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 알킨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 35 내지 46의 아미노산 잔기에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 39 내지 43의 아미노산 잔기에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 아미노산 잔기 42에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 아미노산 잔기 F42Y에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 44 내지 46의 아미노산 잔기에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 아미노산 잔기 45에 부착되고, 이때 아미노산 잔기 위치 넘버링은 기준 서열로서 서열번호 1을 기준으로 한다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 표 2 또는 표 3에 표시된 임의의 아미노산 잔기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 시약은 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 일부를 형성한다.

[0338] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 1개 내지 10개의 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 포함한다.

[0339] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제2 중합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 잔기 40부터 잔기 50에 이르는 아미노산 잔기 영역에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 아미노산 잔기 Y45에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 변형된 IL-2 폴리펩티드의 N-말단에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 적어도 일부를 포함한다.

[0340] 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 약 120 달톤 내지 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 약 120 달톤 내지 약 250 달톤, 약 120 달톤 내지 약 300 달톤, 약 120 달톤 내지 약 400 달톤, 약 120 달톤 내지 약 500 달톤, 약 120 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 250 달톤 내지 약 300 달톤, 약 250 달톤 내지 약 400 달톤, 약 250 달톤 내지 약 500 달톤, 약 250 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 300 달톤 내지 약 400 달톤, 약 300 달톤 내지 약 500 달톤, 약 300 달톤 내지 약 1,000 달톤, 약 400 달톤 내지 약 500 달톤, 약 400 달톤 내지 약 1,000 달톤, 또는 약 500 달톤 내지 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 약 120 달톤, 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤 또는 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 적어도 약 120 달톤, 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤 또는 약 500 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 최대 약 250 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤 또는 약 1,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가진다.

[0341] 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌

옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드)이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 옥사이드)이다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 클릭 화학반응을 통해 IL-2 폴리펩티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제2 중합체는 IL-2 폴리펩티드를, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 부착시키는 링커의 적어도 일부를 포함한다.

[0342] 일부 실시양태에서, 제2 수용성 중합체는 1개 내지 10개의 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 포함한다.

[0343] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 공유결합된 제3 중합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 중합체는 아미노산 잔기 40부터 아미노산 잔기 50에 이르는 아미노산 잔기 영역에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 제3 중합체는 아미노산 잔기 Y45에 공유결합된다. 일부 실시양태에서, 제3 중합체는 변형된 IL-2 폴리펩티드의 N-말단에 공유결합된다.

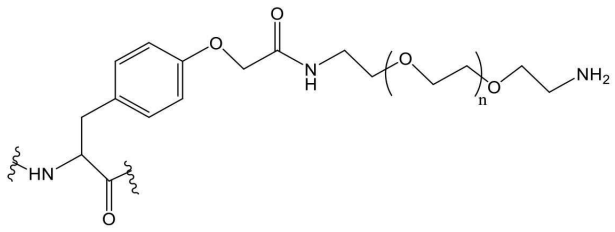
[0344] 일부 실시양태에서, 각각의 중합체는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드), 다당류, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥사졸린, 폴리(아크릴로일모르폴린), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 옥사이드)이다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0345] 일부 실시양태에서, 제1 중합체 및 제2 중합체는 각각 독립적으로 1개 내지 5개의 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 중합체 및 제2 중합체는 각각 독립적으로 단일 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 포함한다.

[0346] 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 선형 또는 분지형이다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄 각각은 선형 폴리에틸렌 글리콜이다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄 각각은 분지형 폴리에틸렌 글리콜이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 중합체 및 제2 중합체 각각은 선형 폴리에틸렌 글리콜 쇄를 포함한다.

[0347] 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 하이드록시, 알킬, 알콕시, 아미도 또는 아미노 기로 말단 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 아미노 기로 말단 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 아미도 기로 말단 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 알콕시 기로 말단 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 알킬 기로 말단 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 쇄는 각각 독립적으로 하이드록시 기로 말단 캡핑된다.

[0348] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 화학식 (I)의 구조를 가진 하나 이상의 PEG화된 티로신을 포함한다:



[0349] **화학식 (I),**

[0350] 상기 식에서, n은 4 내지 30으로부터 선택된 정수이다. 일부 실시양태에서, n은 4 내지 6, 4 내지 8, 4 내지 10, 4 내지 15, 4 내지 20, 4 내지 25, 4 내지 30, 6 내지 8, 6 내지 10, 6 내지 15, 6 내지 20, 6 내지 25, 6 내지 30, 8 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 20, 8 내지 25, 8 내지 30, 10 내지 15, 10 내지 20, 10 내지 25, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 25, 15 내지 30, 20 내지 25, 20 내지 30, 또는 25 내지 30이다. 일부 실시양태에서, n은 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 또는 30이다. 일부 실시양태에서, n은 적어도 4, 6, 8, 10, 15, 20 또는 25이다. 일부 실시양태에서, n은 최대 6, 8, 10, 15, 20, 25 또는 30이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 1개 또는 2개의 아미노산 잔기에 공유결합된 1개 또는 2개의 수용성 중합체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 표 6에 나타낸 바와 같은 특성 및 부착 부위를 가진 1개 또는 2개의 수용성 중합체를 포함한다.

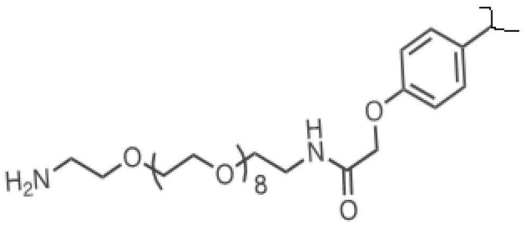
표 6

예시적인 폴리펩티드 구조 및 수용성 중합체 특성

예시적인 폴리펩티드 구조	잔기 45에 부착된 수용성 중합체의 특성	잔기 42에 부착된 수용성 중합체의 특성
1	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da
2	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da	없음
3	없음	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da
4	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da, 임의로, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커로서 역할을 한다.	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da
5	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da, 임의로, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커로서 역할을 한다.
6	없음	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da
7	선형; Mw: 약 200 내지 약 1000 Da, 임의로, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드에 대한 링커로서 역할을 한다.	없음

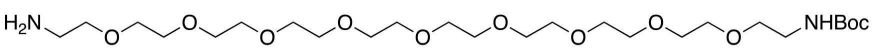
[0351]

[0352] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 부착될 수 있는 수용성 중합체는 화학식 (D)의 구조를 포함한다:



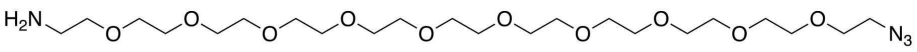
[0353] 화학식 (D)

[0354] 일부 실시양태에서, 중합체는 적합한 전구체 물질로부터 합성된다. 일부 실시양태에서, 중합체는 구조 6, 구조 7, 구조 8 또는 구조 9의 전구체 물질로부터 합성되고, 이때 구조 6은



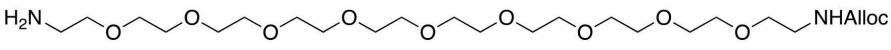
[0355] 구조 6

이고, 구조 7은



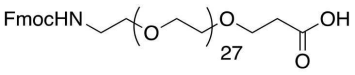
[0356] 구조 7

이고, 구조 8은



[0357] 구조 8

이고, 구조 9는



구조 9 이다.

[0358] **오르토고날 페이로드**

[0359] 본 개시내용의 항-PD-1-IL-2 면역접합체는 이중 오르토고날 페이로드를 포함할 수 있다. 비제한적 일례에서, 항-PD-1-IL-2 면역접합체는 항-PD-1 폴리펩티드, 하나의 변형된 IL-2 폴리펩티드, 및 화학적 오르토고날 연결기에 의해 항-PD-1 폴리펩티드에 연결된 하나의 페이로드를 포함할 수 있다. 오르토고날 페이로드는 아미노산, 아미노산 유도체, 펩티드, 단백질, 사이토카인, 알킬 기, 아릴 또는 헤테로아릴 기, 치료 소분자 약물, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티, 지질, 당, 비오틴, 비오틴 유도체, 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA) 또는 펩티드 핵산(PNA)일 수 있고, 이들 중 임의의 페이로드는 치환되거나, 비치환되거나, 변형되거나 비변형된다. 일부 실시양태에서, 오르토고날 페이로드는 치료 소분자이다. 일부 실시양태에서, 오르토고날 페이로드는 PEG 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 오르토고날 페이로드는 추가 사이토카인, 예를 들어, IL-7 또는 IL-18이다. 한 예시적인 경우, 인간 IL-7은 서열번호 117의 아미노산 서열을 갖거나 변형된 IL-7이다:

[0360] DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF
RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL
EENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH(**서열번호 117**).

[0361] 한 예시적인 경우, 인간 IL-18은 서열번호 118의 아미노산 서열을 갖거나 변형된 IL-18이다:

[0362] YFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT
IFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSV
PGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED(**서열번호** 118).

[0363] 일부 경우, 접합 핸들은 IL-18의 CyS68, Glu69, Lys70 중 하나 이상에서 추가될 수 있다.

[0364] **약학 조성물**

[0365] 한 측면에서, 본원은 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드; 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 기술한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 하나 이상의 부형제를 추가로 포함하고, 이때 하나 이상의 부형제는 탄수화물, 무기 염, 항산화제, 계면활성제, 완충제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 부형제를 추가로 포함하고, 이때 하나 이상의 부형제는 탄수화물, 무기 염, 항산화제, 계면활성제, 완충제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0366] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 탄수화물을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 소르비톨(글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨, 사이클로덱스트린 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0367] 대안적으로 또는 추가로, 약학 조성물은 무기 염을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 무기 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화칼슘, 인산나트륨, 인산칼륨, 황산나트륨 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0368] 대안적으로 또는 추가로, 약학 조성물은 항산화제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항산화제는 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 메타중아황산칼륨, 프로필 갈레이트, 메타중아황산나트륨, 티오황산나트륨, 비타민 E, 3,4-디하이드록시벤조산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0369] 대안적으로 또는 추가로, 약학 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트, 소르비탄 에스테르, 지질, 인지질, 포스파티딜에탄올아민, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, EDTA, 아연 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0370] 대안적으로 또는 추가로, 약학 조성물은 완충제를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 완충제는 구연산, 인산

나트륨, 인산칼륨, 아세트산, 에탄올아민, 히스티딘, 아미노산, 주석산, 석신산, 푸마르산, 젖산, 트리스, HEPES 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0371] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 비경구 또는 장 투여용으로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 정맥내(IV) 또는 피하(SQ) 투여용으로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 동결건조된 형태로 존재한다.

[0372] 한 측면에서, 본원은 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 기재된 폴리펩티드를 포함하는 액체 또는 동결건조된 조성물을 기술한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 동결건조된 분말이다. 일부 실시양태에서, 동결건조된 분말은 완충제 용액에 재현탁된다. 일부 실시양태에서, 완충제 용액은 완충제, 당, 염, 계면활성제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제 용액은 인산염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인산염은 나트륨 Na_2HPO_4이다.

일부 실시양태에서, 염은 염화나트륨이다. 일부 실시양태에서, 완충제 용액은 인산염 완충 식염수를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제 용액은 만니톨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결건조된 분말은 약 10 mM Na_2HPO_4 완충제, 약 0.022% SDS 및 약 50 mg/mℓ 만니톨을 포함하고 약 7.5의 pH를 가진 용액에 현탁된다.

[0373] **제형**

[0374] 본원에 기재된 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 다양한 제형으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 재구성된 동결건조된 분말로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 현탁액으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 용액으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 주사액으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 IV 용액으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 피하 또는 근육내 투여에 의해 투여된다.

[0375] **치료 방법**

[0376] 한 측면에서, 본원은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 본원에 기재된 약학 조성물을 상기 대상체에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 기술한다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 암이다. 암 또는 종양은 예를 들어, 원발성 암 또는 종양, 또는 전이성 암 또는 종양일 수 있다. 치료될 암 및 종양은 흑색종, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암(SCLC) 등), 암종(예를 들어, 피부 편평 세포 암종(CSCC), 요로상피 암종(UC), 신장 세포 암종(RCC), 간세포 암종(HCC), 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위식도 연접부(GEJ) 암종, 자궁내막 암종(EC), 메르켈 세포 암종(MCC) 등), 방광암(BC), 마이크로세틀라이트(microsatellite) 불안정성 높음(MSI-H)/불일치 복구 결핍(dMMR) 고형 종양(예를 들어, 대장암(CRC)), 종양 돌연변이 부담 높음(TMB-H) 고형 종양, 삼중 음성 유방암(TNBC), 위암(GC), 자궁경부암(CC), 흉막 중피종(PM), 고전적 호지킨 림프종(cHL), 또는 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL)을 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0377] 하나 이상의 추가 활성제를 사용한 조합 요법이 본원에서 고려된다. 일부 실시양태에서, 제2 치료제는 종양 유형, 종양 기원 조직, 종양 병기, 또는 종양에 의해 발현된 유전자의 돌연변이를 기준으로 선택된다. 예를 들어, 항-PD-1 항체는 다음 중 하나 이상과 함께 투여될 수 있다: 화학요법제, 면역 체크포인트 억제제, 면역 아고니스트, 생물학적 암 작용제, 저분자량 항암제, 합성 펩티드 항암제, 항암 단백질 분해제, 암 특이적 작용제, 사이토카인 요법, 항혈관신생 약물, 암 대사를 표적화하는 약물, 파괴될 암세포 표면을 표시하는 항체, 항체-약물 접합체, 세포 요법, 일반적으로 사용되는 항신생물 작용제, CAR-T 요법, 종양용해성 바이러스, 비-약물 요법, 신경전달 차단제 또는 신경 성장 인자 차단제.

[0378] 일부 실시양태에서, 암은 고형 암이다. 일부 실시양태에서, 고형 암은 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 카르시노이드암, 자궁경부암, 대장암, 식도암, 안암, 담낭암, 위장관 간질 종양, 생식세포암, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 신경내분비암, 구강암, 구인두암, 난소암, 췌장암, 소아암, 음경암, 뇌하수체암, 전립선암, 피부암, 연조직암, 척수암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 요관암, 자궁암, 질암 또는 외음부암이다.

[0379] 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 혈액암은 백혈병, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, AIDS 관련 림프종, 다발성 골수종, 형질세포종, 이식 후 림프증식성 장애 또는 발덴스트롬 마크로글로불린혈증이다.

[0380] 효과적인 반응은 대상체가 질병의 징후 또는 증상의 부분적 또는 전체적 완화 또는 감소, 종양 부담의 감소, 종양 부담 증가(종양의 진행)까지의 시간의 연장을 경험할 때 달성되며, 특히 생존의 연장을 포함하나 이것으로 제한되지 않는다. 예상되는 무진행 생존 시간은 재발 횟수, 질환의 병기 및 기타 요인을 비롯한 예후 요인에 따라 수개월 내지 수년으로 측정될 수 있다. 생존의 연장은 적어도 1개월(달), 약 적어도 2개월, 약 적어도 3개월, 약 적어도 4개월, 약 적어도 6개월, 약 적어도 1년, 약 적어도 2년, 약 적어도 3년, 약 적어도 4년, 약 적어도 5년 등의 시간을 제한 없이 포함한다. 전체 또는 무진행 생존도 수개월 내지 수년으로 측정될 수 있다. 대안적으로, 효과적인 반응은 대상체의 증상 또는 암 부담이 그대로 유지되고 악화되지 않는 것일 수 있다. 적응증 치료의 추가 적응증은 이하 더 상세히 설명된다. 일부 경우, 암 또는 종양은 적어도 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 감소된다.

[0381] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 (i) 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 1일 1회 투여되거나; (ii) 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드가 하루에 걸쳐 대상체에게 다회 투여되는 추가 실시양태를 포함하는, 단일 투여량인 유효량의 변형된 IL-2 폴리펩티드로 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드에 연결된, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 매일, 격일로, 주 3회, 주 1회, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 5주마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 격주, 주 3회, 주 4회, 주 5회, 주 6회, 월 1회, 월 2회, 월 3회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회 또는 6개월마다 1회 투여된다. 투여는 임의의 적합한 경로(예를 들어, 비경구, 장내, 정맥내, 피하 등)에 의한 주사를 포함하나 이것으로 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 조성물은 매주, 2주마다, 3주마다 또는 4주마다 투여된다.

[0382] **제조 방법**

[0383] 한 측면에서, 본원은 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드를 제공하는 단계, 반응성 기를 사이토카인에 부착된 상보적 반응성 기와 접촉시키는 단계, 및 조성물을 형성하는 단계를 포함하는, 조성물을 제조하는 방법을 기술하는 것으로, 이때 PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 반응성 기(예를 들어, 접합 핸들)를 포함한다. 생성된 조성물은 본원에서 제공된 임의의 조성물이다.

[0384] 일부 실시양태에서, PD-1에 선택적으로 결합하는 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 반응성 기를 포함하는 항체를 제공하는 단계는 반응성 기를 항체에 부착시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 부위 특이적으로 추가된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기를 항체에 부착시키는 단계는 항체를, 항체의 특정 잔기와 결합을 형성하는 반응성 작용기를 포함하는 친화성 기와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기를 항체에 부착시키는 단계는 항체를 효소와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 반응성 기를 항체의 특정 잔기에 부위 특이적으로 부착시키도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 효소는 글리코실화 효소 또는 트랜스글루타미나제 효소이다.

[0385] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상보적 반응성 기를 사이토카인에 부착시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상보적 반응성 기를 사이토카인에 부착시키는 단계는 사이토카인을 화학적으로 합성하는 단계를 포함한다.

[0386] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 변형된 IL-2 폴리펩티드를 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드를 제조하는 방법은 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들을 합성하는 단계 및 이 단편들을 라이게이션시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드를 제조하는 방법은 a. 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들을 합성하는 단계, b. 이 단편들을 라이게이션시키는 단계; 및 c. 라이게이션된 단편들을 폴딩하는 단계를 포함한다.

[0387] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들은 화학적으로 합성된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들은 고체상 펩티드 합성에 의해 합성된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들은 자동화된 펩티드 합성기에서 합성된다.

[0388] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 펩티드 단편들로부터 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 변형된 펩티드는 2개의 펩티드 단편들로부터 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 3개의 펩티드 단편들로부터 라이게이션된다. 일부 실시양

태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 4개의 펩티드 단편들로부터 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 2개 내지 10개의 펩티드 단편들로부터 라이게이션된다.

[0389] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 2개 이상의 단편들은 함께 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 3개 이상의 단편들은 순차적 방식으로 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 3개 이상의 단편들은 원-포트(one-pot) 반응에서 라이게이션된다.

[0390] 일부 실시양태에서, 라이게이션된 단편은 폴딩된다. 일부 실시양태에서, 폴딩은 변형된 IL-2 폴리펩티드 내에서 하나 이상의 디설파이드 결합을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 라이게이션된 단편은 폴딩 과정을 거친다. 일부 실시양태에서, 라이게이션된 단편은 당분야에 잘 알려진 방법을 이용함으로써 폴딩된다. 일부 실시양태에서, 라이게이션된 폴리펩티드 또는 폴딩된 폴리펩티드는 하나 이상의 중합체를 그에 부착시킴으로써 더 변형된다. 일부 실시양태에서, 라이게이션된 폴리펩티드 또는 폴딩된 폴리펩티드는 PEG화에 의해 더 변형된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 합성 폴리펩티드이다.

표 8

IL-2 폴리펩티드의 서열(서열번호)

치환	서열번호	서열
없음(WT)	1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFCQSIISTLT
ΔA1, C125S (알데스류킨)	2	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle T41Hse F42Y, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	3	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Hse, N71Hse, M104Hse, C125S	4	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, N71Hse, L72Y,	5	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)YAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

[0391]

[0392]

치환	서열번호	서열
M104Hse, C125S		
M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Nle, N71Hse, L72Y, M104Hse, C125S	6	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL(Hse)YAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, N71Hse, L72G, M104Hse, C125S	7	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL(Hse)GAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	8	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKYLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse,	9	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKYLEEV

치환	서열번호	서열
M46Nle, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S		L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, R38Y, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, E62Y, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	10	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTY(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEYLKYLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Nle, H64Nle, E62Y, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	11	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEYLKYLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Nle, E62Y, N71Hse, M104Hse, C125S	12	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEYLKPLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

[0393]

치환	서열번호	서열
M23Nle, M39Nle, T41Hse, K43Y, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	13	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)FYFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F44Y, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	14	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)FKYY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, K35Y, M39Nle, T41Hse, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	15	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPYLT R(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
H16Y, M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Hse, N71Hse, M104Hse, C125S	16	APTSSSTKKTQLQLEYLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

[0394]

[0395]

치환	서열번호	서열
H16Y, M23Nle, M39Nle, T41Hse, F41Y, M45Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	17	APTSSSTKKTQLQLEYLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
D20Y, M23Nle, M39Nle, T41Hse, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	18	APTSSSTKKTQLQLEHLLLYLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
D20Y, M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, N71Hse, M104Hse, C125S	19	APTSSSTKKTQLQLEHLLLYLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLT R(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, K35Y, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle,	20	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPYLT R(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEV L(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse) CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

치환	서열번호	서열
N71Hse, M104Hse, C125S		
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, E62Y, N71Hse, M104Hse, C125S	21	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEYLKPLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle, T41Hse, F42Y, M46Nle, E62Y, P65Y, N71Hse, M104Hse, C125S	22	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)YKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEYLKYLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
M23Nle, M39Nle,T41Hse, M46Nle, N71Hse, M104Hse	23	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ(Nle)ILNGINNYKNPKLTR(Nle)L(Hse)FKFY(Nle)PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL(Hse)LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF(Hse)CEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0396]

[0397] 상기 표 8에서, Nle은 노르류신 잔기이고, Hse는 호모세린 잔기이다.

[0398] 본 개시내용 및 이의 장점이 상세히 설명되었지만, 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 개시내용의 사상과 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화, 치환 및 변경을 만들 수 있음을 이해해야 한다.

[0399] 본 개시내용은 예시 목적으로만 제공되고 어떠한 방식으로도 본 개시내용을 제한하기 위한 것이 아닌 하기 실시예에 더 예시되어 있다.

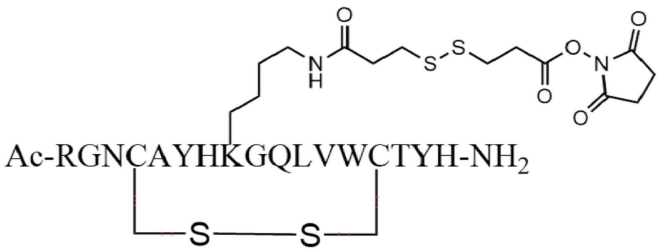
[0400] **실시예**

[0401] **실시예 1: 펨브롤리주맙-(IL-2 폴리펩티드) 면역접합체의 제조**

[0402] 미국 특허 출원 공개 제US20200190165A1호의 실시예 2 내지 4에 기재된 방법을 이용하여 변형된 펨브롤리주맙 폴리펩티드를 제조한다. 요약하건대, DBCO 접합기를 가진 아지캡핑된(Ajicapped)(적어도 PCT 공개 제WO2018199337A1호, PCT 공개 제WO2019240288A1호, PCT 공개 제WO2019240287A1호, PCT 공개 제WO2020090979A1호, 문헌[Matsuda et al., *Mol. Pharmaceutics* 2021, 18, 4058-4066] 및 문헌[Yamada et al., AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 5592-5597], 및 특히 미국 특허 출원 공개 제US20200190165A1호의 실시예 2 내지 4에 기재되어 있는, 아지노모토 바이오-파마 서비시스(Ajinomoto Bio-Pharma Services)에 의한 AJICAP™) 펨브롤리주맙 폴리펩티드를 실온에서 (IL-2 폴리펩티드) 아지드 폴리펩티드와 48시간 동안 반응시켰다. 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, DBCO-PEG에 의한 트랩핑, 단백질 A 크로마토그래피 또는 DBCO 수지 컬럼 정제를 이용하여 미정제 펨브롤리주맙-(IL-2 폴리펩티드) 면역접합체를 분리하였다.

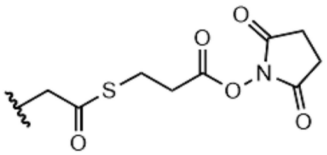
[0403] AJICAP™ 방법에 대한 예시적인 공정은 다음과 같다: 미국 특허 출원 공개 제US20200190165A1호의 실시예 2 내지 4로부터 변형된 프로토콜을 사용하여 DBCO 접합 핸들을 포함하는 변형된 항체(예를 들어, 펨브롤리주맙 또는 LZM-009와 같은 항-PD-1 항체)를 제조한다. 요약하건대, 항체를, 설프하이드릴 기의 보호된 버전(예를 들어, 티

오에스테르 또는 환원 가능한 디설파이드)을 라이신 잔기에 전달하도록 구성된 친화성 펩티드와 접촉시킴으로써, Fc 영역 내의 라이신 잔기 측쇄에 부착된 유리 설프하이드릴 기를 가진 항-PD1 항체를 제조한다. 문헌[Matsuda et al., *Mol. Pharmaceutics* 2021, 18, 4058-4066]에 보고된 바와 같이, 항체의 Fc 영역의 잔기 K248에서 NHS 에스테르를 통해 설프하이드릴 기를 선택적으로 부착시키는, 이 반응을 수행할 수 있는 예시적인 펩티드는 다음과 같이 표시된다:



[0404]

[0405] Fc 영역의 대안적 잔기를 표적화하는 대안적 친화성 펩티드는 AJICAP™ 기술에 대해 앞서 인용된 참고문헌에 설명되어 있으며, 이러한 친화성 펩티드는 원하는 작용기를 Fc 영역의 대안적 잔기(예를 들어, K246, K288 등)에 부착시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 친화성 펩티드의 디설파이드 기를 티오에스테르로 대체하여 설



프하이드릴 보호기를 제공할 수 있다(예를 들어, 친화성 펩티드의 관련 부분은 의 구조를 가질 것이다).

[0406] 이어서, (예를 들어, 티오에스테르의 가수분해 또는 TCEP를 사용한 디설파이드의 환원으로) 보호기를 제거하여 유리 설프하이드릴을 드러낸다. 그 다음, 유리 설프하이드릴을, 연결기를 통해 DBCO 접합 핸들에 연결된 브로모아세트아미드 또는 브로모케톤 기를 포함하는 이작용성 시약(예를 들어, 브로모아세트아미도-dPEG®$_4$-아미도-DBCO)과 반응시킨다. 이 방법은 1개의 DBCO 기가 존재하는 항체(DAR1), 및/또는 항체에 부착된 2개의 DBCO 기를 가진 항체(DAR2, 항체의 Fc 각각에 연결된 1개의 DBCO 기)를 생성하는 데 이용될 수 있다. 그 다음, 원하는 아지드 변형된 IL-2 폴리펩티드(예를 들어, 조성물 AB)를 DBCO 변형된 항체와 반응시켜 면역사이토카인을 생성한다.

[0407] 또 다른 실시양태에서, 먼저 과량의 항-PD-1 항체를 적절하게 로딩된 친화성 펩티드와 반응시켜 보호기의 적절한 제거(예를 들어, 디설파이드 환원 또는 티오에스테르 절단) 후 단일 설프하이드릴을 도입함으로써, 단일 DBCO 접합 핸들을 포함하는 항체를 제조한다. 이어서, 설프하이드릴 반응성 접합 핸들 및 DBCO 접합 핸들을 가진 이작용성 연결기(예를 들어, 브로모아세트아미도-dPEG®$_4$-아미도-DBCO)를 단일 설프하이드릴과 반응시켜 단일 DBCO 함유 항체를 생성한다. 이어서, 단일 DBCO 함유 항체를 적합한 아지드 함유 IL-2(예를 들어, 조성물 AB)와 접합시켜, DAR이 1인 항-PD-1-IL-2 면역접합체를 달성한다.

[0408] 도 2a는 1개 또는 2개의 접합 핸들을 도입하는 화학적 변형 기술에 의한 항-PD1 항체의 부위 선택적 변형을 보여준다. 도 2b는 비변형 펨브롤리주맙 및 AJICAP 기술의 이용을 통해 DBCO 접합 핸들에 접합된 펨브롤리주맙의 Q-TOF 질량 스펙트럼을 보여준다. 도 2c는 DAR1 또는 DAR2를 가진 PD1-IL2를 생성하기 위한 IL2 사이토카인의 부위 선택적 접합을 보여준다. 1과 2 사이의 혼합 DAR을 가진 PD1-IL2의 집단도 제조할 수 있다. 도 2d는 미정제 펨브롤리주맙 및 조성물 AB 접합 반응 혼합물의 TIC 크로마토그램(상부) 및 온전한 RP-HPLC(하부) 프로파일을 보여준다. DAR0은 IL-2가 접합되지 않은 펨브롤리주맙을 나타내고, DAR1은 1개의 IL-2가 접합된 펨브롤리주맙을 나타내고, DAR2는 2개의 IL-2가 접합된 펨브롤리주맙을 나타낸다. 도 2e는 DAR1 및 DAR2 종의 형성을 보여주는, 미정제 펨브롤리주맙 및 (조성물 AB) 접합 반응 혼합물의 Q-TOF 질량 스펙트럼 프로파일을 보여준다. 도 2f는 정제된 PD1-IL2의 대표적인 RP-HPLC 크로마토그램을 보여주고, 도 2g는 정제된 PD1-IL2의 대표적인 Q-TOF 질량 스펙트럼을 보여주고, 도 2h는 정제된 PD1-IL2(조성물 B)의 대표적인 분석 SEC를 보여준다.

[0409] 아래 표 9는 본원에서 제공된 방법 또는 다른 곳에 기재된 유사한 방법에 따라 제조된 다양한 면역사이토카인을

요약한다.

표 9

면역사이토카인의 특성

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위	내독소 (EU/ml)	응집체 (SEC-HPLC)
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	<5	1.5 %
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	2.5	0 %
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	8.9	0.9 %
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	<5	1.78 %
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	<5.5	1.02 %
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	69.7	2.53 %
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	75.6	2.65 %
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	<5.0	2.1 %
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	17.5	1.7 %
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	7.81	1.48 %
K	LZM-009	조성물 AB	2	K288	<0.006	<5 %
N	트라스투주맙	조성물 AB	1.6	K248	11.3	0.2%
O	트라스투주맙	조성물 AB	1	K248	<0.5	<0.1%

[0410]

[0411] **실시예 2: PD-1 결합 ELISA 어세이(도 3)**

[0412] 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체와 PD-1(CD279)의 상호작용을 ELISA 어세이로 측정하였다. 이 연구를 위해, 코닝(Corning) 고결합 절반 면적 플레이트(Fisher Scientific, 스위스 라이나흐)를 PBS 중의 2.5 ㎍/㎖의 비변형 항-PD1 항체 또는 접합된 항-PD1 항체 25 ㎕로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 플레이트 표면을 1시간 동안 37℃에서 25 ㎕의 PBS-0.02% Tween20-1% BSA로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 바이오레전드(Biolegend)(789406, 영국 런던)의 재조합 비오티닐화 PD1/CD279 단백질 25 ㎕를 23 nM에서 시작하여 0.0003 nM까지 낮아지는 5배 연속 희석액으로 PBS-0.02% Tween20-0.1% BSA에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. PBS-0.02% Tween20-0.1% BSA에 1:500으로 희석된 스트렙타비딘-호스라디쉬 퍼옥시다제(#RABHRP3, Merck, 스위스 부흐스) 25 ㎕를 웰 각각에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 50 ㎕의 TMB 기질 시약(#CL07, Merck, 스위스 부흐스)을 웰 각각에 첨가하고 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 37℃에서 5분 후, 웰당 50 ㎕의 0.5 M H_2SO_4 중단 용액을 첨가하여 호스라디쉬 퍼옥시다제 반응을 중단시켰다. 이어서, ELISA 신호를 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)(스위스 슈베르첸바흐)의 EnSpire 플레이트 판독기에서 450 nm에서 측정하였다.

표 10

ELISA에 의해 측정된, 면역사이토카인과 PD-1의 상호작용의 K_D 값

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위 (Fc 영역의 Eu 넘버링)	K_D (pM)
-	펨브롤리주맙	-	0	-	
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	60
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	NT
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	56
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	31
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	29
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	36
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	41
	LZM-009	-	0	-	35
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	37
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	NT
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	27
K	LZM-009	조성물 AB	2	K288	41
-	니볼루맙/Opdivo	-	0	-	66

NT: 시험되지 않음

[0413]

[0414] 도 3은 PD1/CD279 리간드와 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 ELISA 신호를 보여주고 x-축에서 비오티닐화 PD-L1 단백질의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 비접합 기준 항체 및 접합된 항체는 각각 조성물 펨브롤리주맙, 니볼루맙, LZM-009, 및 조성물 A, C, D, E, F, G 및 H이다.

[0415] *PD-1/PD-L1 차단 생물어세이*: PD-1/PD-L1 차단 생물어세이를 이용하여 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 펨브롤리주맙-(IL-2 폴리펩티드) 면역접합체의 능력을 측정하였다.

[0416] 프로메가(Promega)(카탈로그 # J1250, 미국 위스콘신주 매디슨)의 PD-1/PD-L1 차단 생물어세이를 이용하여 PD1/PDL1 경로를 방해하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 측정하였다. PD-1/PD-L1 차단 생물어세이는 면역학적 시냅스를 모방하는, 이펙터 세포와 표적 세포의 공-배양을 기반으로 하는 생체발광 세포 기반 어세이이다. 인간 PD-1, 및 NFAT 반응 요소(NFAT-RE)에 의해 유도되는 루시퍼라제 리포터를 발현하는 Jurkat T 세포는 인간 PD-L1, 및 Jurkat 동족 TCR을 활성화시키도록 설계된 조작된 세포 표면 단백질을 발현하는 CHO-K1 세포에 의해 활성화된다. 동시 상호작용 PD-1/PD-L1은 TCR 신호전달을 억제하고 NFAT-RE 매개 발광을 억제한다. PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체의 추가는 억제 신호를 방출하여, TCR 활성화를 회복시키고 NFAT-RE 발광 리포터의 신호 획득을 야기한다.

[0417] 요약하건대, PD-L1 aAPC/CHO-K1 표적 세포를 흰색 조직 배양 96웰 플레이트에 플레이팅하고 37℃/5% CO_2에서 밤새 배양하였다. 시험 분자를 1 μM에서 시작하여 0.002 nM까지 낮아지는 4배 연속 희석액으로 측정하고 10분 동안 표적 세포에서 사전인큐베이션한 후, 새로 해동된 PD-1 Jurkat 이펙터 세포를 첨가하였다. 37℃/5% CO_2에서 6시간 후, Bio-Glo 시약을 첨가하여 NFAT-RE 발광 리포터의 활성을 평가하고 퍼킨 엘머(스위스 슈베르첸바흐)의 EnSpire 플레이트 판독기(1초/웰)에서 측정하였다.

[0418] 도 4는 PD1/PDL1 경로를 차단하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 이펙터 세포 NFAT-RE 리포터의 평균 발광 강도를 보여주고 x-축에서 비변형 항-

PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 비접합 기준 항체 및 접합된 항체는 각각 펨브롤리주맙 및 조성물 B이다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 프로류킨 및 조성물 AA이다.

[0419] 퍼킨 엘머(스위스 슈베르첸바흐)의 AlphaLISA® 인간 FcRn 결합 키트(AL3095C)를 사용하여 pH 6에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체와 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)의 상호작용을 측정하였다. FcRn 및 IgG 결합의 AlphaLISA® 검출은 스트렙타비딘 코팅 공여체 비드에 포획된 비오티닐화 인간 FcRn과 상호작용하는 IgG 코팅 AlphaLISA® 수용체 비드를 사용한다. 기준 IgG가 FcRn에 결합할 때, 공여체 비드와 수용체 비드는 근접하게 되어, 수용체 비드에서 일련의 에너지 전달 반응을 유발하는 일중항 산소의 전달을 가능하게 함으로써, 615 nm에서 날카로운 발광 피크를 생성한다. 유리 IgG 항체를 AlphaLISA® 혼합물에 첨가하여 FcRn과 기준 항체의 결합에 대한 경쟁을 생성함으로써, 신호의 손실을 야기한다.

[0420] 요약하건대, 시험 분자를 5 μM에서 시작하여 64 pM까지 낮아지는 연속 희석액으로 측정하였고 pH 6 MES 완충제에서 800 nM의 재조합 비오티닐화 인간 FcRn, 40 μg/mℓ의 인간 IgG 접합된 수용체 비드 및 40 μg/mℓ의 스트렙타비딘 코팅 공여체 비드로 구성된 AlphaLISA® 반응 혼합물과 함께 인큐베이션하였다. 23℃의 암실에서 90분 동안 방치한 후, AlphaLISA® 신호를 퍼킨 엘머(스위스 슈베르첸바흐)의 EnSpire 플레이트 판독기(680 nm에서 여기, 615 nm에서 방출)에서 측정하였다.

[0421] 도 5는 pH 6에서 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 AlphaLISA® FcRn-IgG 신호를 보여주고 x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 비접합 기준 항체 및 접합된 항체는 각각 펨브롤리주맙, LZM-009, 및 조성물 A, D, E, H, J, K이다.

표 11

AlphaLISA에 의해 측정된, pH 6에서 면역사이토카인과 인간 FcRn 수용체의 상호작용의 K_D 값

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위	K_D (nM)
-	펨브롤리주맙	-	0	-	7.31
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	26.31
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	27.80
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	85.80
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	18.56
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	48.04
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	NT
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	NT
	LZM-009	-	0	-	15.27
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	25.27
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	NT
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	10.69
K	LZM-009	조성물 AB	1.9	K288	27.11

[0422] NT: 시험되지 않음

[0423] **실시예 3: 인간 FcγR 결합 어세이(도 6)**

[0424] 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체와 인간 Fc 감마 수용체 I(FcγRI/CD64), 인간 Fc 감마 수용체

IIa(FcγRIIa/CD32a), 억제성 인간 Fc 감마 수용체 IIb(FcγRIIb/CD32b) 및 인간 Fc 감마 수용체 III FcγR3a/CD16의 상호작용을 ELISA로 측정하였다. 요약하건대, 코닝 고결합 절반 면적 플레이트(Fisher Scientific, 스위스 라이나흐)를 PBS 중의 2.5 ㎍/㎖의 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체 25 ㎕로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 플레이트 표면을 1시간 동안 37℃에서 25 ㎕의 PBS-0.02% Tween20-1% BSA로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 그 다음, 25 ㎕의 재조합 인간 Fc 감마 RI/CD64 단백질(R&D 시스템, 1257-FC-050, CF), 재조합 인간 Fc 감마 RIIA/CD32a(H167) 단백질(R&D 시스템, 9595-CD-050, CF), 재조합 인간 Fc 감마 RIIB/CD32b Avi-태그 단백질(R&D 시스템, AVI1875-050, CF), 또는 재조합 인간 Fc 감마 RIIIA/CD16a 단백질(R&D 시스템, 4325-FC-050; CF)을 1000 nM부터 0.001 nM까지 5배 연속 희석액으로 PBS-0.02% Tween20-0.1% BSA에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. PBS-0.02% Tween20-0.1% BSA에 1:500으로 희석된 스트렙타비딘-호스라디쉬 퍼옥시다제(#RABHRP3, Merck, 스위스 부흐스) 25 ㎕를 웰 각각에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 100 ㎕의 PBS-0.02% Tween20으로 4회 세척하였다. 50 ㎕의 TMB 기질 시약(#CL07, Merck, 스위스 부흐스)을 웰 각각에 첨가하고 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 37℃에서 5분 후, 웰당 50 ㎕의 0.5 M H_2SO_4 중단 용액을 첨가하여 호스라디쉬 퍼옥시다제 반응을 중단시켰다. 이어서, ELISA 신호를 퍼킨 엘머(스위스 슈베르첸바흐)의 EnSpire 플레이트 판독기에서 450 ㎚에서 측정하였다.

표 12

ELISA에 의해 측정된, 면역사이토카인과 인간 Fcγ 수용체의 상호작용의 K_D 값

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위	FcgRI CD64 (nM)	FcgRIIa CD32a (nM)	FcgRIIb CD32b (nM)	FcgRIIIa CD16 (nM)
	펨브롤리주맙	-	0	-	0.488	160.2	209.3	289
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	1.265	313.7	744.5	339.5
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	NT	NT	NT	NT
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	18.57	314.2	780.2	390
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	1.261	488.9	2082.3	609.05
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	6.128	767.9	5084.6	1055.5
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	NT	NT	NT	NT
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	NT	NT	NT	NT
	LZM-009	-	0	-	0.248	904.6	543.6	921.5
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	3.81	1142	4709	481.1
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	NT	NT	NT	NT
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	2.298	1179	6683	272.5
K	LZM-009	조성물 AB	1.9	K288	11.99	1873	3341	5407

NT: 시험되지 않음

[0425]

[0426] 도 6a는 인간 Fc 감마 수용체 I(CD64), 인간 Fc 감마 수용체 IIa(CD32a), 인간 Fc 감마 수용체 IIb(CD32b) 및 인간 Fc 감마 수용체 IIIa(CD16)에 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 ELISA 신호를 보여주고, x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 비접합 기준 항체는 펨브롤리주맙, LZM-009 및 조성물 A이고, 이 도면에서 시험된 접합된 항체는 조성물 C, D 및 H이다.

[0427] 도 6b는 인간 Fc 감마 수용체 I(CD64), 인간 Fc 감마 수용체 IIa(CD32a), 인간 Fc 감마 수용체 IIb(CD32b) 및 인간 Fc 감마 수용체 IIIa(CD16)에 결합하는 비변형 항-PD1 항체 및 접합된 항-PD1 항체의 능력을 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 평균 ELISA 신호를 보여주고, x-축에서 비변형 항-PD1 항체 및 접합

된 항-PD1 항체의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 접합된 항체는 조성물 E, J 및 K이다.

[0428] **실시예 4: PD1^{양성} Mo7e 세포 대 PD1^{음성} Mo7e 세포에서 IL2에 의해 유도된 pStat5 활성화(도 7a 및 7b)**

[0429] 인간 PD-1을 안정적으로 발현하는 인간 Mo7e 세포주를 확립하였다. 요약하건대, 인간 PD1 유전자(PDCD1 NM_005018; Origene, CAT#: RC210364L3V)를 운반하는 렌티바이러스 입자를 4의 MOI(감염 다중도)로 250x10^{5}개의 Mo7e 세포에 형질도입하였다. 37℃에서 완전 배양 배지(RPMI, 20% FBS, 10 ng/㎖ GM-CSF)에서 5 ㎍/㎖의 폴리브렌 및 10 mM의 HEPES의 존재 하에 회전감염(spinfection)을 90분 동안 1260g로 수행하였다. 형질도입 5일 후, 0.75 ㎍/㎖의 퓨로마이신을 첨가하여 PD-1 양성 세포를 선택하였다. PD-1의 안정적이고 균질한 발현을 표면 염색으로 검증하였다.

[0430] PD-1 음성(형질도입되지 않은 모 균주) Mo7e 세포 및 PD-1 발현(형질도입된) Mo7e 세포에 대한 다양한 IL-2 폴리펩티드의 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 세포를 웰당 100,000개의 세포로 분배하고, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 10배 연속 희석액을 949 nM에서 시작하여 10 pM까지 낮아지는 농도로 사용하여 37℃/5% CO_2에서 40분 동안 상기 세포를 자극하였다. 인큐베이션 후, 전사 인자 포스포 완충제 키트(BD Biosciences)를 사용하여 세포를 고정하고 투과 가능하게 만든 후, PD-1 및 pStat5에 대한 표면 및 세포내 면역염색을 수행하여 세포 식별을 가능하게 하고 Stat5(신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5) 인산화의 수준을 측정할 수 있게 하였다. 아세아(Acea)의 콴테온(Quanteon) 유세포분석기를 이용하여 FACS(형광 활성화 세포 분류) 측정을 수행하였다.

[0431] 도 7a는 형질도입되지 않은 모 Mo7e(PD1^{-}) 세포 및 안정적으로 형질도입된(PD1^{+}) Mo7e 세포에서 PD-1/CD279의 표면 발현의 수준을 설명하는 도표를 보여준다.

[0432] 도 7b는 시험관내에서 PD1^{음성}(검은색으로 채워진 기호) Mo7e 세포 및 PD1^{양성}(회색 빈 기호) Mo7e 세포에서 IL-2 신호전달 경로의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 EC_{50} 값을 보여주고, x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 프로류킨 및 조성물 AB이다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 A, C, H, L 및 대조군인 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

표 13

PD1⁻ Mo7e 세포 및 PD1⁺ Mo7e 세포에서 STAT5 인산화 어세이의 EC_{50} 값

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위	EC_{50} $PD1^-$ 세포 (nM)	EC_{50} $PD1^+$ 세포 (nM)	$PD1^-/PD1^+$ 비
프로류킨	-		-	-	2.925	2.484	
AB	-	조성물 AB	-	-	1.03	1.582	0.65
AC	-	조성물 AC	-	-	NT	NT	NT
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	3.437	0.0024	1424
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	NT	NT	NT
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	3.589	0.0011	3175
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	NT	NT	NT
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	NT	NT	NT
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	NT	NT	NT
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	NT	NT	NT
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	1.722	0.003	581
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	NT	NT	NT
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	NT	NT	NT
K	LZM-009	조성물 AB	1.9	K288	NT	NT	NT
O	트라스투주맙	조성물 AB	1	K248	5.781	1.308	1.62

NT: 시험되지 않음

[0433]

[0434] **실시예 5: 1차 T 세포에서 IL2에 의해 유도된 pStat5 활성화(도 8 내지 10)**

[0435] 인간 T 세포 집단에 대한 다양한 IL-2 폴리펩티드의 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 피콜(ficoll) 구배 원심분리를 이용한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 정제에 이어 자성 비드를 사용한 음성 단리를 통해 건강한 공여체 버피 코트로부터 1차 범 T 세포(CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 T_{reg})를 수득한 후, 사용할 때까지 냉동보존하였다. 범 T 세포를 T 세포 배지(RPMI 10% FCS, 1% 글루타민, 1% NEAA, 25 μM βMeoH, 1% 피루브산나트륨)에서 해동시켜 밤새 회복시키고, PBS를 사용한 2회 세척 단계 후, 세포를 PBS에 재현탁하였다. 표시된 경우, 세포를 100 nM의 비접합 항-PD1 항체 펨브롤리주맙과 함께 37℃에서 20분 동안 사전인큐베이션한다. 그 다음, 세포를 웰당 200,000개의 세포로 분배하고, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 3.16배 연속 희석액을 316 nM에서 시작하여 3 pM까지 낮아지는 농도로 사용하여 37℃/5% CO_2에서 40분 동안 상기 세포를 자극하였다. 인큐베이션 후, 전사 인자 포스포 완충제 키트를 사용하여 세포를 고정하고 투과 가능하게 만든 후, CD4, CD8, CD25, FoxP3, CD45RA 및 pStat5에 대한 표면 및 세포내 면역염색을 수행하여 세포 서브세트 식별을 가능하게 하고 Stat5(신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5) 인산화의 수준을 측정할 수 있게 하였다. 아세아의 노보사이트(NovoCyte) 또는 콴테온 유세포분석기를 이용하여 FACS(형광 활성화 세포 분류) 측정을 수행하였다.

[0436] 하기 T 세포 서브세트에 대한 pStat5 MFI(중간 형광 강도) 신호를 야생형 또는 변형된 IL-2 폴리펩티드의 농도에 대해 작도하였다. 그래프패드 프리즘(GraphPad PRISM) 소프트웨어를 사용하여 가변 기울기, 4 파라미터 분석을 기반으로 절반 최대 유효 농도(EC_{50})를 계산하였다.

T 세포 서브세트 식별을 위한 게이팅 전략

T-Reg	CD4+, $CD25^{Hi}$, FoxP3+
CD8 Teff	CD8+
미감작 CD8 Teff	CD8+, CD45RA+
기억 CD8 Teff	CD8+, CD45RA-
CD4 conv	CD4+, FoxP3-

[0437]

표 14

1차 인간 T 세포에서 STAT5 인산화 어세이의 EC_{50} 값

조성물	항체	IL-2 폴리펩티드	DAR	접합 부위	EC_{50} Treg (nM)	EC_{50} CD8 (nM)	CD8/Treg 비
프로류킨	-		-	-			
AB	-	조성물 AB	-	-	0.385	0.818	2.1
AC	-	조성물 AC	-	-	0.386	0.941	2.4
A	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K248	0.411	2.287	5.6
B	펨브롤리주맙	조성물 AB	1.5	K248	0.228	1.013	4.4
C	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K248	0.154	0.833	5.4
D	펨브롤리주맙	조성물 AB	1	K288	0.081	0.996	12.3
E	펨브롤리주맙	조성물 AB	2	K288	NT	NT	NT
F	펨브롤리주맙	조성물 AC	1	K248	7.775	10.72	1.8
G	펨브롤리주맙	조성물 AC	2	K248	0.229	2.211	9.7
H	LZM-009	조성물 AB	1	K248	0.098	0.864	8.8
I	LZM-009	조성물 AB	2	K248	NT	NT	NT
J	LZM-009	조성물 AB	1	K288	NT	NT	NT
K	LZM-009	조성물 AB	1.9	K288	NT	NT	NT

[0438]

[0439] 도 8은 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 T_{eff} 및 T_{reg} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고, x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 A, B 및 C이다.

[0440] 도 9a는 건강한 공여체의 말초 혈액으로부터 새로 단리된 휴면 기억(CD45RA-) 및 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포에서 PD-1/CD279의 표면 발현의 수준을 설명하는 도표를 보여준다.

[0441] 도 9b는 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 기억(CD45RA-) 및 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고, x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이고, 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 B, 및 대조군인 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

[0442] 도 10a는 과량의 비접합 항-PD1 항체 펨브롤리주맙의 존재 또는 부재 하에 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 미감작(CD45RA+) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항

-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고 x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이고, 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 B, 및 대조군인 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

[0443] 도 10b는 과량의 비접합 항-PD1 항체 펨브롤리주맙의 존재 또는 부재 하에 인간 T 세포의 시험관내 샘플에서 휴면 기억(CD45RA-) CD8+ T_{eff} 세포의 유도에 대한, 항-PD1 항체에 접합되지 않은 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 항-PD1 항체에 접합된 변형된 IL-2 폴리펩티드의 효과를 측정하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 인산화된 신호 전달도입제 및 전사 활성화제 5(pSTAT5)에 대한 평균 형광 강도를 보여주고, x-축에서 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 면역사이토카인의 투여량을 보여준다. 이 도면에서 시험된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 조성물 AA이고, 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 조성물 B, 및 대조군인 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 N(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)이다.

[0444] **실시예 6: 종양 보유 마우스에서의 PK/PD 연구(도 11 내지 13)**

[0445] 생체내 PK/PD 연구를 마우스에서 수행하였다. 종양을 발생시키기 위해 0.1 ㎖ PBS 중의 야생형 CT26 종양 세포(3×10^5)를 6주령 내지 8주령의 미감작 BALB/c-hPD1 암컷 마우스(GemPharmatech Co, Ltd, 중국 난징)의 왼쪽 옆구리에 피하 접종하였다. (종양 부피를 기준으로 한 계층화된 무작위배정을 수행하는 엑셀 기반 무작위배정 소프트웨어를 사용하여) 동물을 무작위배정하고, 평균 종양 부피가 대략 186 mm^3에 도달하였을 때 치료를 시작하였다. 조성물 A로 치료한 동물은 변형된 IL-2 폴리펩티드에 접합된 PD-1 항체 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 10 ㎖/kg 볼루스 정맥내(i.v.) 주사를 제공받았다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)로 치료한 동물은 변형된 IL-2 폴리펩티드에 접합된 항-Her2 항체 2.5 mg/kg의 단일 10 ㎖/kg 볼루스 정맥내(i.v.) 주사를 제공받았다. 접종 후, 동물을 이환률 및 사망률에 대해 매일 확인하였다. 동시에, 동물을 종양 성장 및 정상적인 행동에 대한 효과, 예컨대, 이동성, 음식 및 물 섭취, 체중 증가/감소(체중은 매주 2회 측정됨), 눈/모발 뭉침 및 임의의 다른 비정상적인 효과에 대해 확인하였다. 캘리퍼를 사용하여 종양 크기를 2차원으로 매주 3회 측정하였고, 수학식: $V = 0.5\ a \times b^2$를 이용하여 부피를 mm^3 단위로 표현하였고, 이때 a 및 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다. 각각의 서브세트 내의 동물 수를 기준으로 사망 및 관찰된 임상 징후를 기록하였다.

[0446] 약동학 연구는 9개의 시점(5분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 72시간, 96시간, 120시간, 168시간)을 포함하였고, 이때 시점당 3마리의 마우스를 샘플링하였다. 표시된 시점에서, 꼬리 정맥 샘플링 또는 심장 천자(종료점)를 통해 EDTA의 존재 하에 혈액 샘플을 채취하였다. 또한, 주사한 지 72시간, 96시간, 120시간, 168시간 후, 군당 3마리의 마우스를 희생시키고 종양 샘플을 채취하였다.

[0447] 각각의 마우스의 신선한 종양 샘플을 개별적으로 잘게 자르고 C 튜브에서 혼합 효소로 분해하였다. C 튜브를 젠틀(Gentle) MACS 해리기의 슬리브에 부착시킨 후, 프로그램 "m_imptumor_01_01"을 한 번 실행하였다. 그 다음, C 튜브를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 또 다른 라운드의 프로그램 "m_imptumor_01_01"을 실행하였다. 분해된 조직을 70 ㎛ 세포 여과기를 통해 여과하였다. 세포를 DPBS로 2회 세척한 후 염색하였다.

[0448] EDTA의 존재 하에 채취된 마우스 혈액을 4℃의 샘플 튜브에서 5분 동안 4,000 rpm으로 즉시 원심분리하였다. 혈장(상청액)을 채취하고 생체분석이 수행될 때까지 -80℃에서 보관하였다. 그 다음, 1 부피의 세포 펠릿을 20 부피의 1x 적혈구 용해 용액과 혼합하였다. 이어서, 3분 동안 인큐베이션하고 원심분리하였다. 혈액이 잘 용해되지 않는 경우, 2 ㎖ 1x 적혈구 용해 용액으로 다시 현탁하고 3분 동안 인큐베이션한다.

[0449] 세포를 DPBS로 2회 세척하였다. 시험당 100 ㎕의 재현탁된 세포(1천만/㎖의 농도)를 96 V-홀 플레이트에 시딩하였다. 원심분리 후, 세포를 100 ㎕ DPBS로 현탁하였다. BV510 라이브/데드(live/dead)를 첨가하고 4℃의 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 DPBS로 2회 세척하였다. 세포외 항체 인큐베이션 후, 세포를 염색 완충제로 2회 세척하고 고정하고 30분 동안 투과 가능하게 만들었다. 5분 인큐베이션을 위해 정제된 래트 항-마우스 CD16/CD32를 첨가하고 구체적인 세포내 항체 설명서에 표시된 절차에 따라 세포를 염색하였다. 그 다음, 세포를 2회 세척하고 200 ㎕ 염색 완충제로 현탁하였다. 염색된 세포를 BD 포르테사(Fortessa) X20 유세포분석기로 분석하였다.

표 15

하기 항체 패널을 사용하여 염색을 수행하였다.

#	형광색소	항체	공급업체	카탈로그 #	클론
1	BUV395	CD8	BD	563786	53-6.7
2	BUV737	F4/80	BD	749283	T45-2342
3	BV421	CD62L	바이오레전드	104436	MEL-14
4	BV510	라이브/데드	인비트로겐	L34957	-
5	BV605	MHCII	바이오레전드	107639	M5/114.15.2
6	BV785	muPD-L1	바이오레전드	124331	10F.9G2
7	BV785	이소타입	바이오레전드	400647	RTK4530
8	FITC	CD45	BD	553080	30-F11
9	PerCP-Cy5.5	CD44	BD	560570	IM7
10	PE	CD206	이바이오사이언스	12-2061-82	MR6F3
11	PE-CF594	CD49b	BD	562453	DX5
12	PE-Cy7	CD4	바이오레전드	100422	GK1.5
13	APC	hPD-1	바이오레전드	621610	A17188B
14	APC	이소타입	바이오레전드	400322	MPC-11
15	AF700	CD11b	BD	557960	M1/70
16	APC-Cy7	CD3	바이오레전드	100222	17A2

[0450]

[0451] 도 11a는 hPD1 인간화 BALB/c 마우스에서 CT26 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(평균 ± SEM).

[0452] 도 11b는 치료한 지 7일 후 hPD1 인간화 BALB/c 마우스에서 CT26 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 막대 차트를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(평균 ± SEM; ** 일원 ANOVA P-값<0.001).

[0453] 도 12a는 치료한 지 7일 후 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서 미감작($CD62L^{high}$ $CD44^{low}$) CD8+ T 세포의 증폭에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

[0454] 도 12b는 치료한 지 7일 후 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서 이펙터 기억(CD62L

^{음성} CD44^{high}) CD8+ T 세포의 증폭에 대한 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 비표적화 면역사이토카인의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

[0455] 도 13a는 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액 및 종양에서 면역사이토카인의 지속성에 대한 면역사이토카인의 PD-1 표적화 및 비표적화의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 대조군 면역사이토카인의 혈장 또는 종양 농도를 보여주고, x-축에서 시간을 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SD).

[0456] 도 13b는 CT26 종양 보유 hPD1 인간화 BALB/c 마우스의 혈액에 비해 종양에서 면역사이토카인의 지속성에 대한 면역사이토카인의 PD-1 표적화 및 비표적화의 효과를 설명하는 도표를 보여주는 것으로, 이 도면은 y-축에서 PD-1 표적화 면역사이토카인 및 대조군 면역사이토카인의 종양/혈장 농도의 비를 보여주고, x-축에서 시간을 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 주사 일정 후 1 mg/kg 및 2.5 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 A이다. 대조군 Her2 표적화 면역사이토카인 조성물 O(IL-2 폴리펩티드에 접합된 트라스투주맙 항체)도 2.5 mg/kg에서 시험하였다(n=3; 평균 ± SEM).

[0457] **실시예 7: 효능 연구(도 14a 및 14b)**

[0458] 생체내 효능 연구를 마우스에서 수행하였다. 종양을 발생시키기 위해 0.1 ㎖ PBS 중의 MC38 종양 세포(3 x 10^5)를 6주령 내지 8주령의 미감작 C57BL/6-hPD1 암컷 마우스(GemPharmatech Co, Ltd, 중국 난징)의 오른쪽 상부 옆구리에 피하 접종하였다. (종양 부피를 기준으로 한 계층화된 무작위배정을 수행하는 엑셀 기반 무작위배정 소프트웨어를 사용하여) 동물을 무작위배정하고, 평균 종양 부피가 대략 90 mm^3에 도달하였을 때 치료를 시작하였다. 조성물 H로 치료한 동물은 변형된 IL-2 폴리펩티드에 접합된 PD-1 항체 1 mg/kg의 단일 10 ㎖/kg 볼루스 정맥내(i.v.) 주사를 제공받았다. 접종 후, 동물을 이환률 및 사망률에 대해 매일 확인하였다. 동시에, 동물을 종양 성장 및 정상적인 행동에 대한 효과, 예컨대, 이동성, 음식 및 물 섭취, 체중 증가/감소(체중은 매주 2회 측정됨), 눈/모발 뭉침 및 임의의 다른 비정상적인 효과에 대해 확인하였다. 주요 종료점은 지연된 종양 성장 또는 완전한 종양 퇴행이었다. 캘리퍼를 사용하여 종양 크기를 2차원으로 매주 3회 측정하였고, 수학식: $V = 0.5\ a\ x\ b^2$를 이용하여 부피를 mm^3 단위로 표현하였고, 이때 a 및 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다. 각각의 서브세트 내의 동물 수를 기준으로 사망 및 관찰된 임상 징후를 기록하였다.

[0459] 도 14a는 hPD1 C57BL/6 마우스에서 MC38 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 접합된 항-PD1 항체의 단일 주사의 효과를 설명하는 도표를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 정맥내 주사로서 1 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 H이다(n=8; 평균 ± SEM).

[0460] 도 14b는 치료한 지 7일 후 hPD1 C57BL/6 마우스에서 MC38 동계 결장 암종 종양의 성장에 대한 접합된 항-PD1 항체의 단일 주사의 효과를 설명하는 막대 차트를 보여준다. 이 도면에서 시험된 면역사이토카인은 단일 정맥내 주사로서 1 mg/kg의 단일 작용제로서 시험된 조성물 H이다(n=8마리 동물; 평균 ± SEM; ** 일원 ANOVA P-값 <0.005).

[0461] **실시예 8: 조성물 AB의 합성**

[0462] 고체상 펩티드 합성(SPPS)을 이용하여 합성된 개별 펩티드를 라이게이션시킴으로써, 잔기 F42Y에 부착된 아지도-PEG 및 Y45에 부착된 PEG 기를 함유하고 서열번호 3의 아미노산 서열을 가진 변형된 IL-2 폴리펩티드 조성물 AB를 합성하였다. 이하 설명된 방법을 이용하여 자동화된 펩티드 합성기에서 개별 펩티드를 합성하였다. 유사한 프로토콜을 이용하여 본원에서 제공된 관련 변형된 IL-2를 합성하였다.

[0463] 시판되는 시약을 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 아크로스(Acros), 머크(Merck) 또는 TCI 유럽으로부터 구입하고 추가 정제 없이 사용하였다. 고체상 펩티드 합성에 적합한 측쇄 보호기를 가진 Fmoc 아미노산을 노바바이오켐(Novabiochem), 크리스토프 센 레이보레이토리스 아게(Christof Senn Laboratories AG) 또는 펩트아트(PeptART)로부터 구입하고 공급된 그대로 사용하였다. 펩티드 합성에 사용된 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 폴리퓨어(Polypure)로부터 구입하였다. 시그마 알드리치의 HPLC 등급 CH_3CN을 분석 및 제조 HPLC 정제에

사용하였다.

[0464] 4-하이드록시-α-시아노신남산(HCCA)을 매트릭스로서 사용하여 이중 ESI/MALDI-FTICR 공급원이 장착된 브루커 솔라릭스(Bruker SolariX)(9.4T 자석)에서 펩티드 및 단백질에 대한 고해상 질량 스펙트럼(FTMS)을 측정하였다. 1.0 mm 경로 길이 셀을 가진 자스코(Jasco) J-715 분광계를 이용하여 CD 스펙트럼을 기록하였다. 표준 감도(100 mdeg), 0.5 nm 데이터 피치, 50 nm/분 스캐닝 속도, 1 nm 밴드폭 및 5회 누적을 이용하여 연속 스캐닝 모드로 25℃에서 스펙트럼을 수집하였다.

[0465] 펩티드 및 단백질 단편을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로 분석하고 정제하였다. 이중 펌프, 혼합기 및 인-라인(in-line) 탈기장치, 자동샘플러, 가변 파장 UV 검출기(220 nm 및 254 nm에서 용출액의 동시 모니터링), 및 100 mℓ 주입 루프를 갖춘 주입기를 가진 분석 자스코 기기에서 펩티드 분석 및 반응 모니터링을 수행하였다. 20 mℓ 주입 루프를 가진 길슨(Gilson) 분취 기기에서 펩티드 단편의 정제를 수행하였다. 두 경우, 이동상은 0.1% TFA를 함유하는 MilliQ-H_2O(완충제 A), 및 0.1% TFA를 함유하는 HPLC 등급 CH_3CN(완충제 B)이었다.

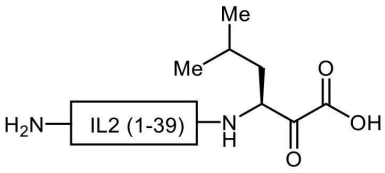
bioZenTM 온전한 C4 컬럼(3.6 ㎛, 150 x 4.6 mm) 또는 시세이도 캡셀(Shiseido Capcell) Pak MG III(5 ㎛, 150 x 4.6 mm) 컬럼에서 1 mℓ/분의 유속으로 분석 HPLC를 수행하였다. 시세이도 캡셀 Pak UG80 C18 컬럼(5 ㎛, 50 mm I.D. x 250 mm)에서 40 mℓ/분의 유속으로 분취 HPLC를 수행하였다.

[0466] Fmoc SPPS 화학반응을 이용하여 Syro I 또는 CS Bio 136X 펩티드 합성기에서 펩티드 분절을 합성하였다. 측쇄 보호기를 가진 하기 Fmoc 아미노산을 사용하였다: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys (Acm), Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(1-Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH. 필요한 경우, Fmoc-슈도프롤린 디펩티드를 합성에 포함시켰다. DMF 중의 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc 탈보호를 수행하였고(2x8분), 피드백 루프를 사용하여 304 nm에서 UV로 모니터링하여 완전한 Fmoc 제거를 보장하였다. 실온 또는 50℃의 DMF에서 Fmoc-아미노산(수지 치환에 대한 3.0 내지 5.0 당량), 커플링 시약인 HCTU 또는 HATU(2.9 내지 4.9 당량) 및 DIPEA 또는 NMM(6 내지 10 당량)을 사용하여 커플링을 수행하였다. 3분 동안 사전활성화시킨 후, 용액을 옮기고 아미노산에 따라 30분 또는 2시간 동안 수지 상의 펩티드와 반응시켰다. 일부 경우, 이중 커플링이 필요하였다. 커플링 후, 수지를 DMF 중의 20% 아세트산 무수물로 처리하여 임의의 미반응 유리 아민을 캡핑하였다. 필요에 따라 LiCl 세척을 수행하였다. 무수 디클로로메탄 중의 페닐실란(24 당량) 및 팔라듐(0) 테트라키스(트리페닐포스핀)(0.5 당량)을 사용하여 알릴에스테르 탈보호를 수행하였다.

[0467] SPPS에 의한 펩티드 분절의 합성을 상응하는 수지의 미세절단 및 분석으로 모니터링하였다. 95:2.5:2.5 TFA:DODT:H_2O(α-케토산 수지에서 합성된 α-케토산 분절) 또는 95:2.5:2.5 TFA:TIPS:H_2O(2-클로로트리틸 폴리스티렌 수지에서 합성된 펩티드)의 혼합물을 사용하여 2시간 동안 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 수지를 여과하여 제거하였고, 여액을 증발시키고 냉각된 디에틸 에테르로 처리하고 분쇄하고 원심분리하였다. 에테르 층을 조심스럽게 따라내고 잔사를 디에틸 에테르에 재현탁하고 분쇄하고 원심분리하였다. 에테르 세척을 2회 반복하였다.

[0468] ***1.1 IL-2의 조성물 AB 변이체의 합성***

[0469] *IL-2(1-39)-Leu-α-케토산의 합성*



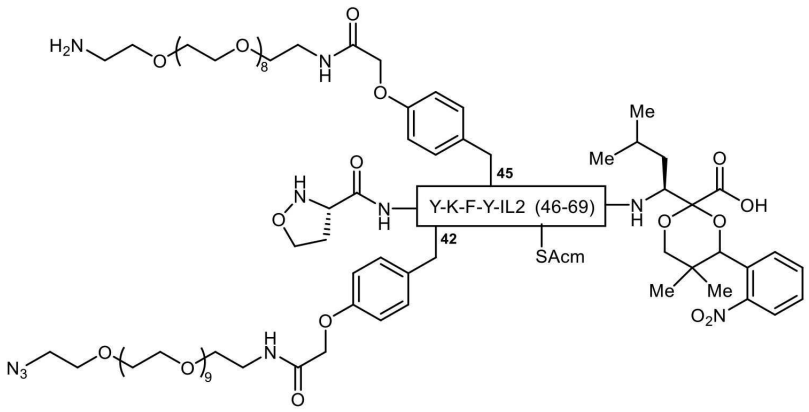
분절 1

[0470]

[0471] 보호된 Fmoc-α-Leu-케토산이 0.25 mmol/g의 치환 용량으로 사전로딩된 Rink-아미드 수지에서 IL2(1-39)-Leu-α-케토산(서열번호 3 참조)을 합성하였다. 이를 위해, Fmoc-Rink 아미드 MBHA 수지(4 g)를 DMF에서 15분 동안 사전팽윤시키고 Fmoc 탈보호를 수행하였다. Fmoc-류신 보호된 α-케토산(795 mg, 1 mmol, 1.00 당량)을 40 mℓ DMF에 용해시키고 HATU(361 mg, 0.95 mmol, 0.95 당량) 및 DIPEA(348 ㎕, 2 mmol, 2.00 당량)로 사전활성화시켰다. 커플링을 실온에서 6시간 동안 진행시켰다. 그 다음, 수지를 캡핑한 후 Fmoc 탈보호를 수행하였다. 일반적인 방법 단원에 설명된 절차를 이용하여 자동화된 Fmoc SPPS로 Ala1까지 0.250 mmol 규모로 분절의 합성을

수행하였다. 1.5시간 동안 (95:2.5:2.5) TFA:DODT:H_2O의 혼합물을 사용하여 미세절단 및 분석을 수행함으로써 펩티드 합성의 진행을 모니터링하였다. HPLC 분석을 60℃의 C18 컬럼에서 수행하였다. 일반적인 방법에 설명된 절차에 따라 2시간 동안 95:2.5:2.5 TFA:DODT:H_2O(15 ㎖/g 수지)의 혼합물을 사용하여 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 30분 이내 0.1% TFA를 함유하는 30% 내지 80% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 시세이도 캡셀 pak C18 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 미정제 IL2(1-39)의 정제를 수행하였다. 순수한 생성물 분획을 모으고 동결건조하여 650 mg의 순수한 IL2(1-39)1-39)-Leu-α-케토산(펩티드 합성, 수지 절단 및 정제 단계에 대한 69% 수율)을 수득하였다. 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도와 정확한 질량을 확인하였다. $C_{204}H_{346}N_{56}O_{61}$[M]에 대해 계산된 m/z: 4556.5694; 측정치: 4556.5783.

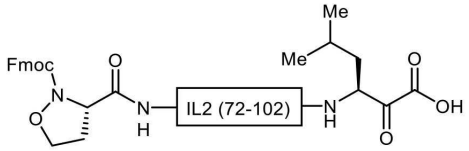
[0472] *조성물 AB의 Opr-IL2(42-69) 광보호된 Leu-α-케토산의 합성*



[0473] **분절 2**

[0474] Fmoc-류신 광보호된 α-케토산이 0.25 mmol/g의 치환 용량으로 사전로딩된 Rink 아미드 MBHA 수지에서 Opr-IL2(42-69)(서열번호 3 참조) 광보호된 Leu-α-케토산 분절을 제조하였다. 이를 위해, 4 g의 Fmoc-Rink 아미드 MBHA 수지를 DMF로 15분 동안 팽윤시키고 Fmoc 탈보호를 수행하였다. Fmoc-류신 광보호된 α-케토산(795 mg, 1 mmol, 1.00 당량)을 40 ㎖ DMF에 용해시키고 HATU(361 mg, 0.95 mmol, 0.95 당량) 및 DIPEA(348 ㎕, 2 mmol, 2.00 당량)로 사전활성화시켰다. 반응물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 그 다음, 수지를 캡핑한 후 Fmoc 탈보호를 수행하였다. 일반적인 방법 단원에 설명된 절차를 이용하여 자동화된 Fmoc SPPS로 0.151 mmol 규모로 Nle46까지 분절의 합성을 수행하였다. 실온에서 2시간 동안 DIC(수지에 비해 5 당량)를 사용하는 대칭 무수물 방법으로 Cys58을 커플링시키기 위해 Cys(Acm)-OH(수지에 비해 10 당량)를 사용하였다. HATU(2.9 당량) 및 DIPEA(6 당량)를 사용하여 단일 커플링으로 사전형성된 아미노산 Fmoc-Tyr(Ac0.5kDaPEG)-OH(3 당량)를 위치 45에서 커플링시켰다. Phe44 및 Lys43을 자동화된 SPPS로 커플링시킨 후, 각각 위치 42 및 41에서 Fmoc Tyr-알릴 아세테이트 및 Boc-5-(S)-옥사프롤린을 수동 커플링시켰다. 실온에서 30분 동안 페닐실란(449 ㎕, 3.6 mmol, 24 당량) 및 $Pd(Ph_3)_4$(87 mg, 0.075 mmol, 0.5 당량)을 사용하여 확립된 표준 조건에 따라 알릴 에스테르 탈보호를 수행하였다. 탈보호 후, O-(2-아미노에틸)-O'-(2-아지도에틸) 노나에틸렌 글리콜(237 mg, 0.450 mmol, 3 당량)을 50℃에서 1.5시간 동안 커플링시켰다. 1.5시간 동안 (95:2.5:2.5) TFA:DODT:H_2O의 혼합물을 사용하여 미세절단 및 분석을 수행함으로써 펩티드 합성의 진행을 모니터링하였다. HPLC 분석을 60℃의 C18 컬럼에서 수행하였다. 일반적인 방법에 설명된 절차에 따라 2시간 동안 95:2.5:2.5 TFA:DODT:H_2O(15 ㎖/g 수지)의 혼합물을 사용하여 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 냉각된 에테르:펜탄 혼합물(1:1)을 사용하여 미정제 펩티드를 처리하고 세척하였다. 2 단계 구배, 즉 먼저 5분 이내 0.1% TFA를 함유하는 MQ-H_2O 중의 10% 내지 30% CH_3CN, 이어서 30분 이내 0.1% TFA를 함유하는 MQ-H_2O 중의 30% 내지 60% CH_3CN을 사용하면서, 시세이도 캡셀 pak C18 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 미정제 IL2(42-69)의 정제를 수행하였다. 순수한 생성물 분획을 모으고 동결건조하여 117.4 mg의 순수한 IL2(42-69)(펩티드 합성, 수지 절단 및 정제 단계에 대한 16% 수율)를 수득하였다. 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도와 정확한 질량을 확인하였다. $C_{230}H_{376}N_{46}O_{74}S$[M]에 대해 계산된 m/z: 4998.6794; 측정치: 4998.6749.

[0475] *조성물 AB의 Fmoc-Opr IL2(72-102)-Phe-α-케토산의 합성*

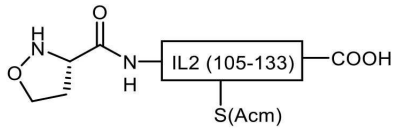


분절 3

[0476]

[0477] Fmoc-Phe 보호된 α-케토산이 약 0.25 mmol/g의 치환 용량으로 사전로딩된 Rink 아미드 켐매트릭스(ChemMatrix) 수지에서 Fmoc-Opr IL2(72-102)-페닐알라닌-α-케토산을 합성하였다. HCTU를 커플링 시약으로서 사용하여 자동화된 Fmoc SPPS로 Ala73까지 0.588 mmol 규모로 합성을 수행하였다. HATU를 커플링 시약으로서 사용하여 잔기 72, Fmoc-Leu의 커플링을 수행하였다. 완전한 커플링을 보장하기 위해 커플링을 45℃에서 2회 더 반복하였다. 실온에서 2시간 동안 HATU(수지에 비해 2.95 당량) 및 NMM(수지에 비해 6.00 당량)을 사용하여 Fmoc-5-옥사프롤린(수지에 비해 3.00 당량)을 유리 아민에 수동으로 커플링시켰다. 2시간 동안 (95:2.5:2.5) TFA:DODT:H_2O의 혼합물을 사용하여 미세절단 및 분석을 수행함으로써 펩티드 합성의 진행을 모니터링하였다. 60℃에서 C18 컬럼에서 HPLC 분석을 수행하였다. 2.0시간 동안 95:2.5:2.5 TFA:DODT:H_2O의 혼합물(15 mℓ/g 수지)을 사용하여 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 30분 이내 0.1% TFA를 함유하는 20% 내지 75% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 60℃로 예열된 시세이도 캡셀 Pak C18 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 미정제 분절의 정제를 수행하였다. 순수한 생성물 분획을 모으고 동결건조하여 >98% 순도(147.9 mg, 합성, 절단 및 정제 단계에 대한 6% 수율)로 Fmoc-Opr IL2(72-102)-Phe-α-케토산을 수득하였다. 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도 및 정확한 질량을 확인하였다. $C_{184}H_{285}N_{47}O_{53}$[M]에 대해 계산된 m/z: 4001.1051; 측정치 4001.1227.

[0478] *Opr-IL2(105-133)의 합성*

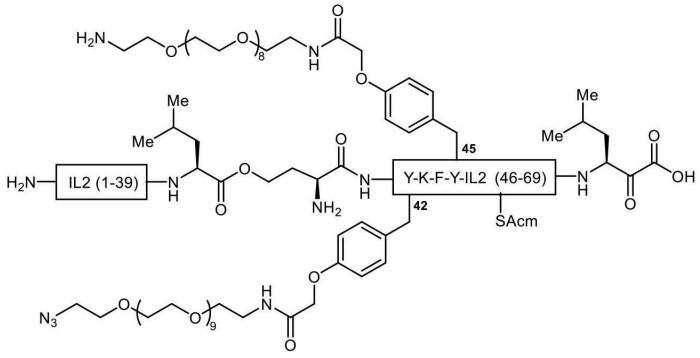


분절 4

[0479]

[0480] Fmoc-Thr-OH가 0.25 mmol/g의 치환 용량으로 사전로딩된 2-클로로트리틸-수지에서 Opr-IL2(105-133)를 합성하였다. 캡핑(디이소프로필에틸아민, 메탄올) 후, 자동화된 Fmoc SPPS로 Glu106까지 0.34 mmol 규모(1.5 g의 수지)로 합성을 수행하였다. 실온에서 2시간 동안 DIC(수지에 비해 5 당량)를 사용하여 대칭 무수물 방법으로 Cys105를 커플링시키기 위해 Cys(Acm)-OH(수지에 비해 10 당량)를 사용하였다. 그 다음, HATU(1.95 당량) 및 NMM(4 당량)을 사용하여 Boc-5-옥사프롤린(수지에 비해 2.00 당량)을 수지 상의 유리 아민에 커플링시켰다. 1.5시간 동안 (95:2.5:2.5) TFA:TIPS:H_2O의 혼합물을 사용하여 미세절단 및 분석을 수행함으로써 펩티드 합성의 진행을 모니터링하였다. 60℃에서 C18 컬럼에서 HPLC 분석을 수행하였다. 2.0시간 동안 95:2.5:2.5 TFA:TIPS:H_2O의 혼합물(15 mℓ/g 수지)을 사용하여 펩티드를 수지로부터 절단하였다. 10분 이내 0.1% TFA를 함유하는 10% 내지 65% CH_3CN에 이은 20분 이내 0.1% TFA를 함유하는 65% 내지 95% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 60℃로 예열된 시세이도 캡셀 Pak C4 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 미정제 Opr-IL2(105-133)의 정제를 수행하였다. 순수한 생성물 분획을 모으고 동결건조하여 >98% 순도(108.5 mg, 합성, 절단 및 정제 단계에 대한 9% 수율)로 Opr-IL2(105-133)를 수득하였다. 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도 및 정확한 질량을 확인하였다. $C_{158}H_{242}N_{37}O_{52}S$[M+H]에 대해 계산된 m/z: 3521.7145, 실측치 3521.7140.

[0481] *KAHA 라이게이션에 의한 조성물 AB의 IL2-Seg12의 합성*



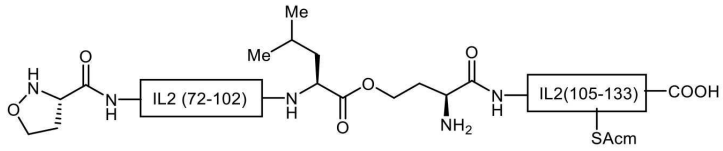
분절 12

[0482]

[0483] *KAHA 라이게이션*: Seg1(44 mg, 9.6 μmol, 1.2 당량) 및 Seg2(40 mg, 8.0 μmol, 1 당량)를 0.1 M 옥살산(400 μℓ, 20 mM)이 함유된 DMSO:H_2O(9:1)에 용해시키고 60℃에서 20시간 동안 반응시켰다. 라이게이션 바이알을 알루미늄 호일로 포장하여 빛으로부터 보호하였다. 7분 이내 5% 내지 95% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 60℃에서 페노메넥스(Phenomenex) C18 컬럼(150 x 4.6 mm)을 사용하고 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN/H_2O을 이동상으로서 사용하여 uHPLC로 KAHA 라이게이션의 진행을 모니터링하였다.

[0484] *광-탈보호 및 정제*: 라이게이션 완료 후, 혼합물을 0.1% TFA가 함유된 CH_3CN/H_2O(1:1)로 약 20배(8 mℓ) 희석하고 1시간 동안 365 nm의 파장에서 방사선조사하였다. 앞서 기재된 방법을 이용하여 uHPLC에서 샘플을 주입함으로써 광분해 반응의 완료를 확인하였다. 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN 및 MQ-H_2O을 용출제로서 사용하는 2 단계 구배, 즉 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 CH_3CN의 이중 구배(5분 이내 10% 내지 35%에 이어, 35분 이내 35% 내지 65%)를 40 mℓ/분의 유속으로 사용하면서, 60℃로 유지된 시세이도 캡셀 Pack UG80 C18 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 광-탈보호된 샘플을 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 모으고 동결건조하여 순수한 Seg12(25.4 mg, 라이게이션 및 정제 단계에 대한 40% 수율)를 제공하였다. $C_{422}H_{709}N_{101}O_{130}S$[M]에 대해 계산된 m/z: 9304.1694; 측정치: 9304.1639.

[0485] *KAHA 라이게이션에 의한 조성물 AB의 IL2-Seg34 제조를 위한 KAHA 라이게이션*



분절 34

[0486]

[0487] *라이게이션*: Seg3(136 mg, 34 μmol, 1.2 당량) 및 Seg4(100 mg, 28.40 μmol, 1 당량)를 0.1 M 옥살산(1.8 mℓ, 15 mM)이 함유된 DMSO/H_2O(9:1)에 용해시키고 60℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 7분 이내 30% 내지 70% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 60℃에서 페노메넥스 C18 컬럼(150 x 4.56 mm)을 사용하고 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN/H_2O을 이동상으로서 사용하여 uHPLC로 KAHA 라이게이션의 진행을 모니터링하였다.

[0488] *Fmoc 탈보호 및 정제*: 라이게이션 완료 후, 반응 혼합물을 DMSO(6 mℓ)로 희석하고, 5% 디에틸아민(300 μℓ)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 7분 동안 진탕하였다. 정제용 샘플을 준비하기 위해, 이를 TFA(300 μℓ)가 함유된 DMSO(4 mℓ)로 희석하였다.

[0489] 35분 이내 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 30% 내지 70% CH_3CN의 구배를 40 mℓ/분의 유속으로 사용하여, 60℃로 유지된 시세이도 캡셀 Pack UG80 C18 컬럼(50 x 250mm)에서 분취 HPLC로 샘플을 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 모으고 동결건조하여 순수한 Seg34를 제공하였다(라이게이션 및 정제 후 43.4 mg, 21% 수율). 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도 및 정확한 질량을 확인하였다. $C_{326}H_{516}N_{84}O_{101}S$[M]에 대해 계산된 m/z: 7255.7545; 측정치: 7255.7653.

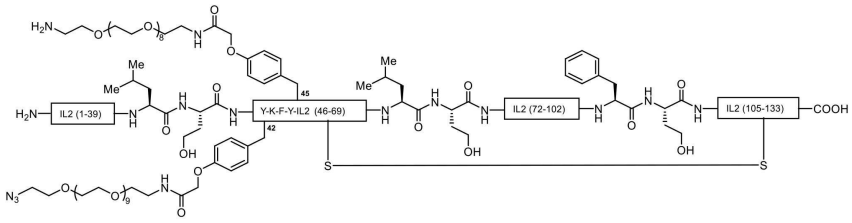
[0490] *KAHA 라이게이션에 의한 IL2 선형 단백질 조성물 AB의 제조를 위한 최종 KAHA 라이게이션*

[0491] *라이게이션*: Seg12(59.2 mg, 6.35 μmol, 1.2 당량) 및 Seg34(38.5 mg, 5.3 μmol, 1 당량)를 0.1 M 옥살산(423 ㎕, 15 mM)이 함유된 DMSO/H_2O(9:1)에 용해시키고, 라이게이션을 60℃에서 24시간 동안 진행시켰다. 14분 이내 30% 내지 95% CH_3CN의 구배를 사용하면서, 60℃에서 시세이도 캡셀 Pak UG80 C18 컬럼(250 x 4.6 mm)을 사용하고 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN/H_2O을 이동상으로서 사용하여 분석 HPLC로 KAHA 라이게이션의 진행을 모니터링하였다.

[0492] *정제*: 라이게이션 완료 후, 반응 혼합물을 150 ㎕ DMSO로 희석한 후, 0.1% TFA를 함유하는 (1:1) CH_3CN:H_2O의 혼합물(7 ㎖)로 더 희석하였다. 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN 및 MQ-H_2O을 용출제로서 사용하는 2 단계 구배, 즉 5분 이내 10% 내지 40% 및 35분 이내 40% 내지 80%를 40 ㎖/분의 유속으로 사용하면서, 60℃로 예열된 시세이도 캡셀 Pack UG80 C18 컬럼(50 x 250 mm)을 사용하는 분취 HPLC에 주입함으로써 샘플을 정제하였다. 생성물을 함유하는 분획을 모으고 동결건조하여 Acm을 가진 순수한 조성물 AB 선형 단백질을 제공하였다(42.3 mg, 라이게이션 및 정제 단계에 대한 48% 수율). 분석 HPLC 및 ESI-HRMS를 이용하여 생성물의 순도 및 정확한 질량을 확인하였다. $C_{747}H_{1225}N_{185}O_{229}S_2$[M]에 대해 계산된 m/z: 16515.9340, 측정치: 16515.9008.

[0493] *Acm 탈보호*: Acm을 가진 펩티드 IL2 선형 단백질(35.4 mg, 2.14 μmol)을 AcOH/H_2O(1:1)(8.6 ㎖, 0.25 mM)에 용해시키고 86 mg AgOAc(1% m/v)를 용액에 첨가하였다. 혼합물을 빛으로부터 보호된 상태로 50℃에서 2.5시간 동안 진탕하였다. HPLC에 의해 확인된 반응 완료 후, 샘플을 0.1% TFA가 함유된 CH_3CN:H_2O(1:1)로 희석하고, 60℃로 유지된 시세이도 캡셀 Pak UG80 C18 컬럼(20 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC로 정제하였다. 0.1% TFA를 함유하는 CH_3CN 및 MQ-H_2O을 용출제로서 사용하는 2 단계 구배를 정제에 사용하였다: 5분 이내 10% 내지 40%, 및 30분 이내 40% 내지 95%, 유속: 10 ㎖/분. 생성물을 함유하는 분획을 모으고 동결건조하여 순수한 IL2 선형 단백질을 제공하였다(26.1 mg, 탈보호 및 정제 단계에 대한 74% 수율). $C_{741}H_{1215}N_{183}O_{227}S_2$[M]에 대해 계산된 m/z: 16373.8597; 측정치: 16373.8253.

[0494] *폴딩된 IL-2 조성물 AB의 합성*



조성물 AB

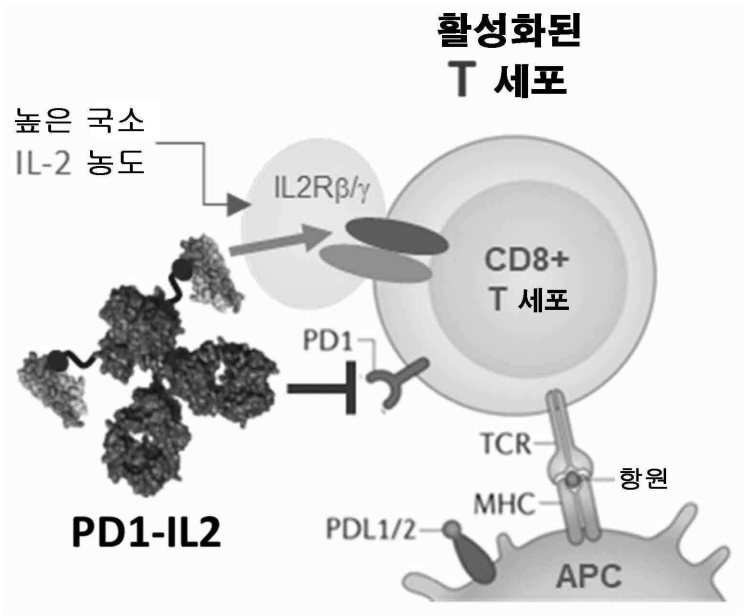
[0495]

[0496] *선형 단백질의 재배열*: 선형 단백질(20 mg, 1.221 μmol)을, 0.1 M 트리스 및 30 mM 환원된 글루타티온(81 ㎖, 15 μM 단백질 농도)이 함유된 수성 6 M Gu·HCl에 용해시키고 6 M HCl 수용액으로 pH 8.0까지 조절하였다. 혼합물을 50℃에서 2시간 동안 부드럽게 진탕하고, 18분 이내 0.1% TFA를 함유하는 MQ-H_2O 중의 30% 내지 95% CH_3CN의 구배를 1.0 ㎖/분의 유속으로 사용하면서, 25℃에서 bioZenTM 3.6 ㎛ 온전한 C4 컬럼(150 x 4.6 mm)을 사용하여 분석 역상 HPLC로 모니터링하였다.

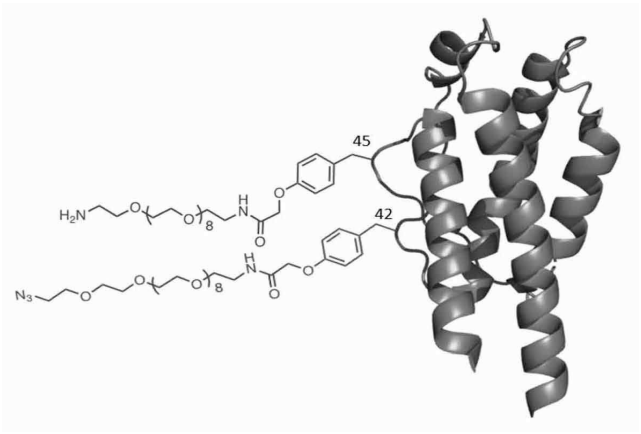
[0497] *선형 재배열된 단백질의 폴딩*: 상기 용액을 실온으로 냉각시키고 pH 8.0에서 0.1 M 트리스 및 1.5 mM 산화된 글루타티온을 함유하는 제2 완충제 용액(240 ㎖)으로 3배 희석하였다. 혼합물을 실온에서 보관하고, 18분 이내 0.1% TFA를 함유하는 30% 내지 95% 아세토니트릴의 구배를 1.0 ㎖/분의 유속으로 사용하면서, 25℃에서 bioZenTM 3.6 ㎛ 온전한 C4 컬럼(150 x 4.6 mm)을 사용하여 분석 HPLC로 모니터링하였다. 20시간 후, 폴딩 용액을 10% 수성 TFA로 약 pH 3까지 산성화하고, 60분 이내 0.1% TFA를 함유하는 5% 내지 40% 아세토니트릴 및 40% 내지 95% 아세토니트릴의 2 단계 구배를 10.0 ㎖/분의 유속으로 사용하면서, 시세이도 프로테오나비(Proteonavi) C4 컬럼(20 x 250 mm)을 사용하여 분취 HPLC에서 정제하였다. 폴딩된 IL2 단백질을 함유하는 분획을 함께 모으고 동결건조하였다. 순수한 폴딩된 단백질(3.5 mg, 18% 수율)의 순도 및 동일성을 분석 RP-HPLC 및 고해상 ESI 질량 분광분석으로 더 확인하였다. $C_{741}H_{1213}N_{183}O_{227}S_2$[M]에 대해 계산된 m/z: 16371.8441; 측정치: 16371.8107, 조성물 AB의 성공적인 합성을 확인함.

도면

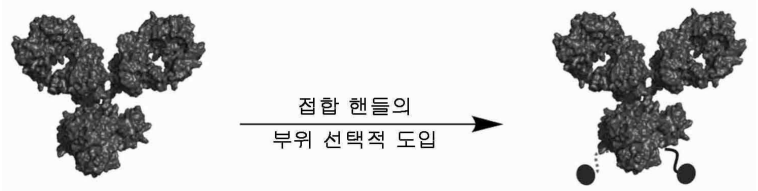
도면1a



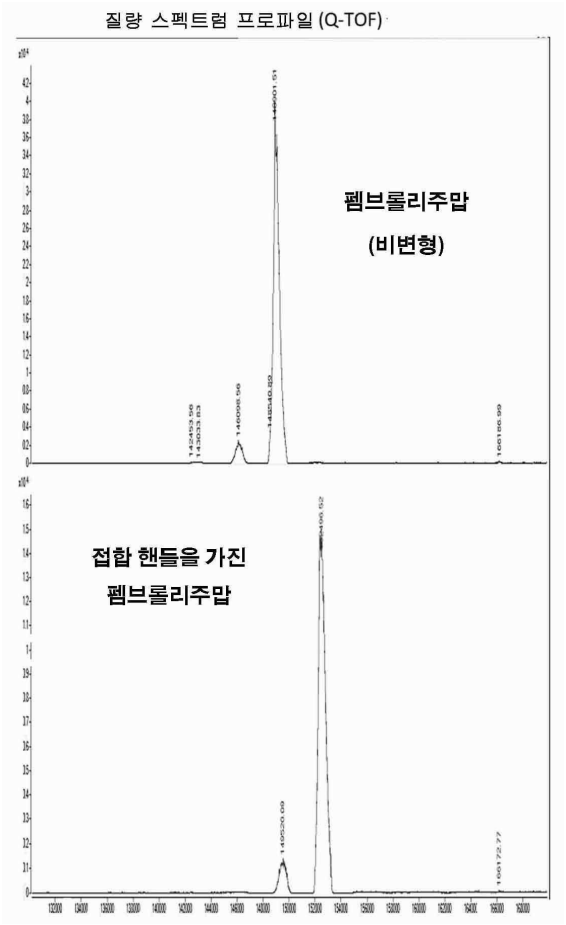
도면1b



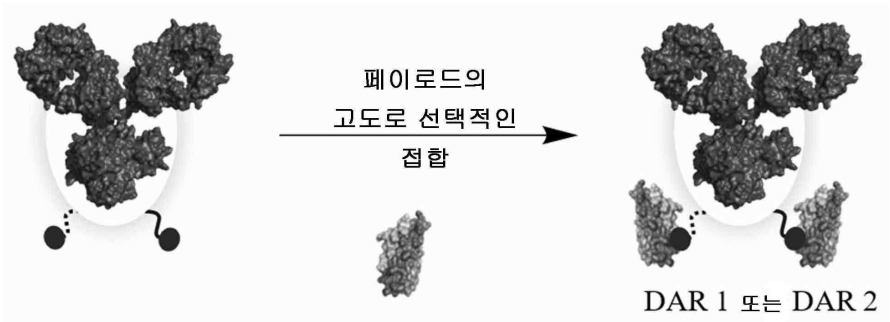
도면2a



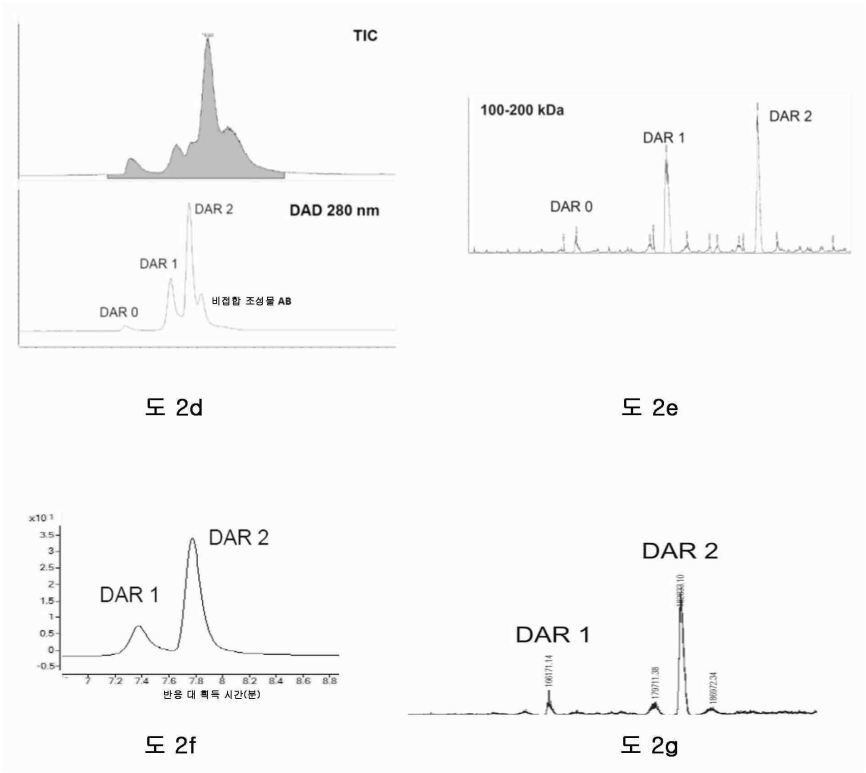
도면2b


질량 스펙트럼 프로파일 (Q-TOF)
펨브롤리주맙
(비변형)
접합 핸들을 가진
펨브롤리주맙

도면2c


페이로드의
고도로 선택적인
접합
DAR 1 또는 DAR 2

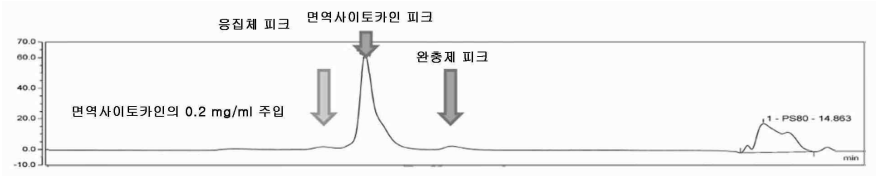
도면2d



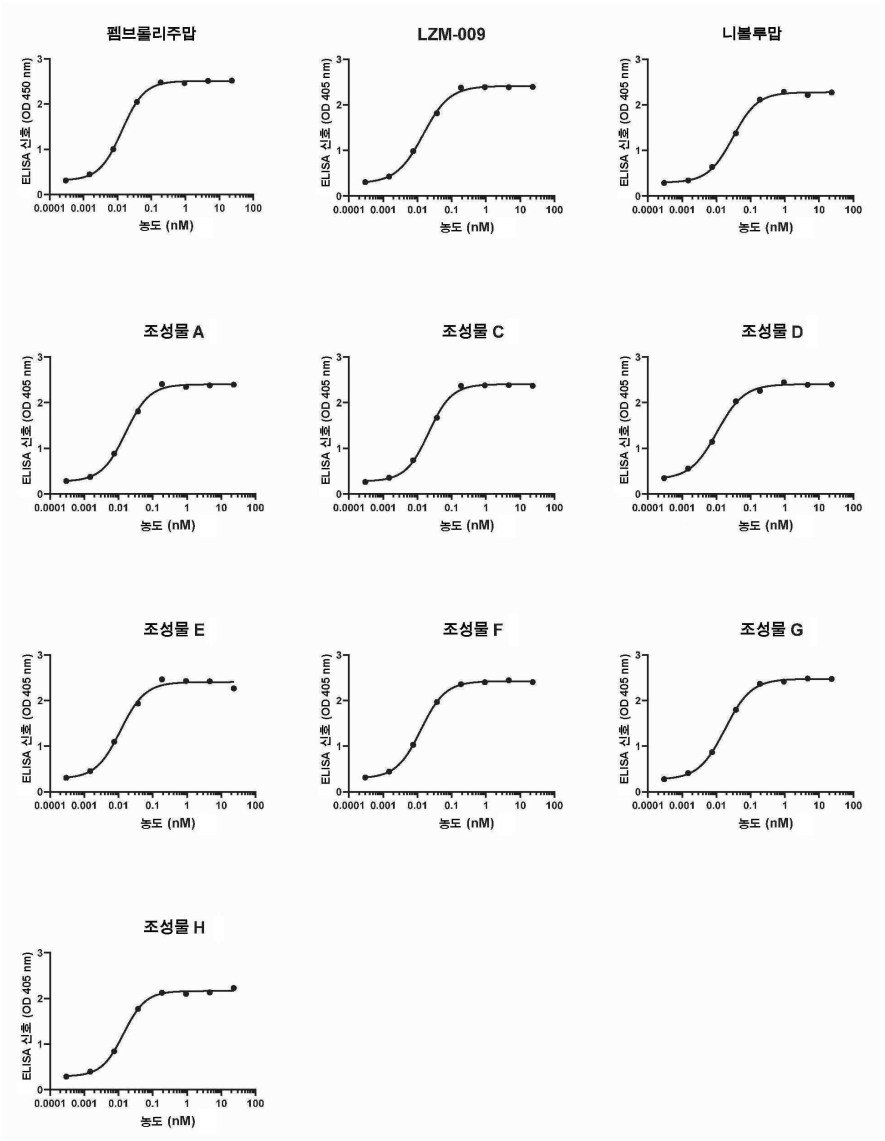
도 2d 도 2e

도 2f 도 2g

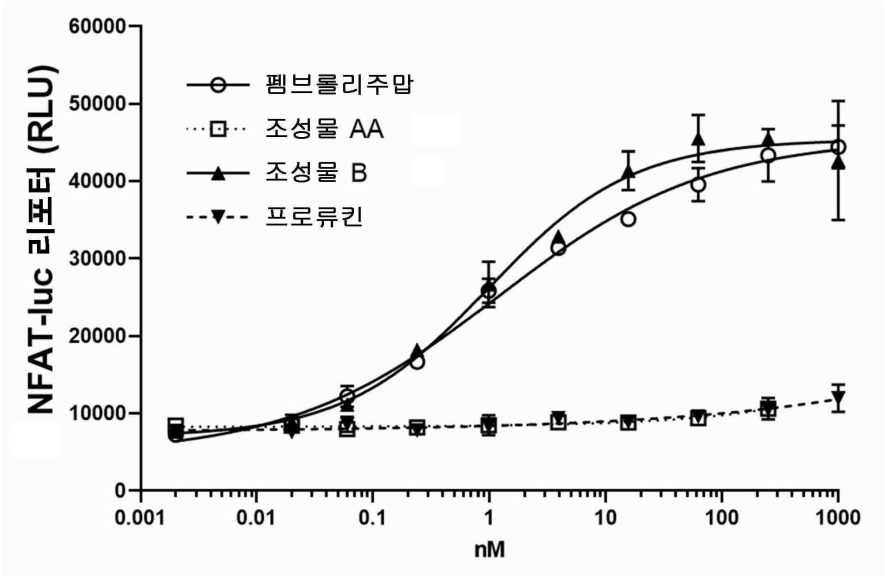
도면2h



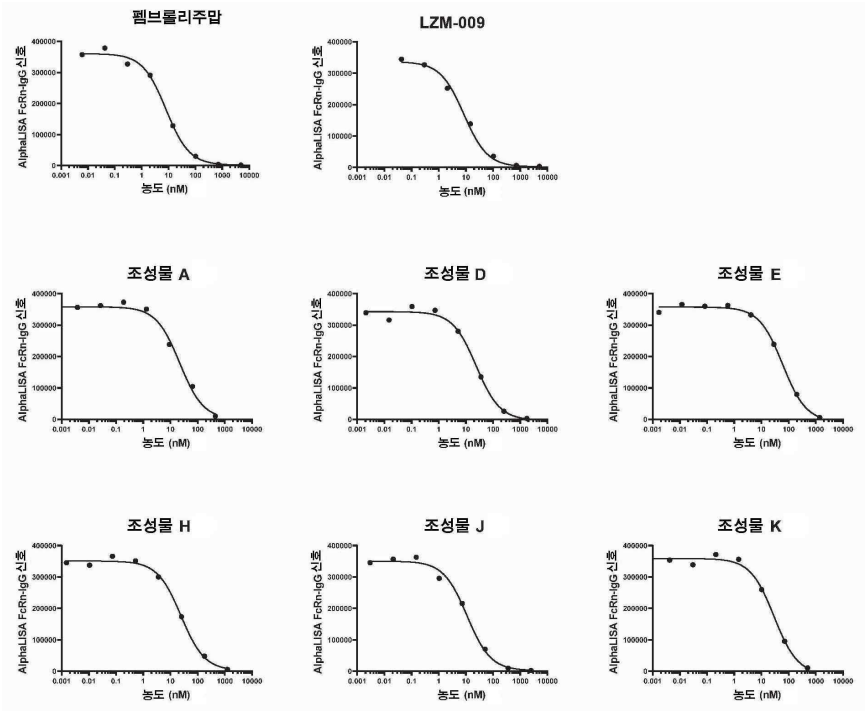
도면3


펨브롤리주맙
LZM-009
니볼루맙
조성물 A
조성물 C
조성물 D
조성물 E
조성물 F
조성물 G
조성물 H
ELISA 신호 (OD 450 nm)
ELISA 신호 (OD 405 nm)
농도 (nM)

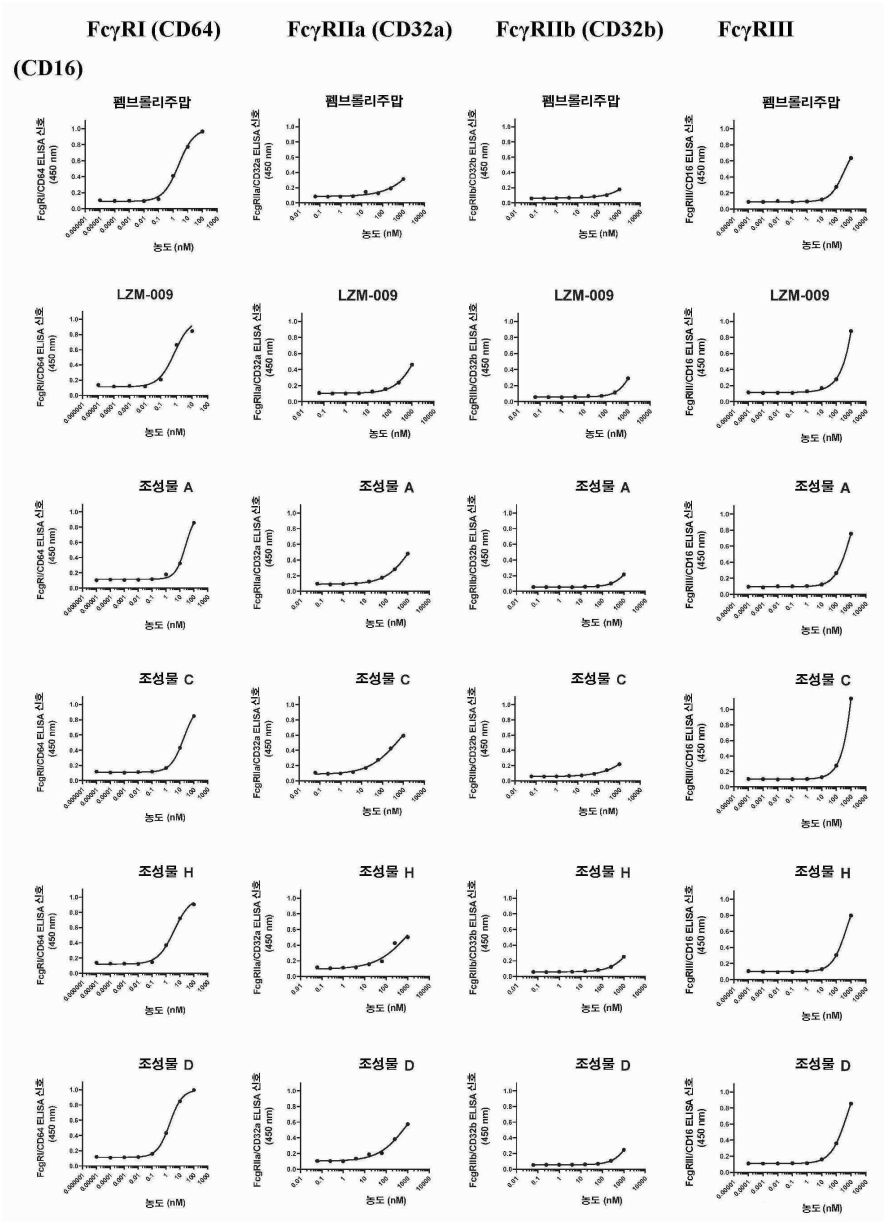
도면4


NFAT-luc 리포터 (RLU)
펨브롤리주맙
조성물 AA
조성물 B
프로류킨
nM

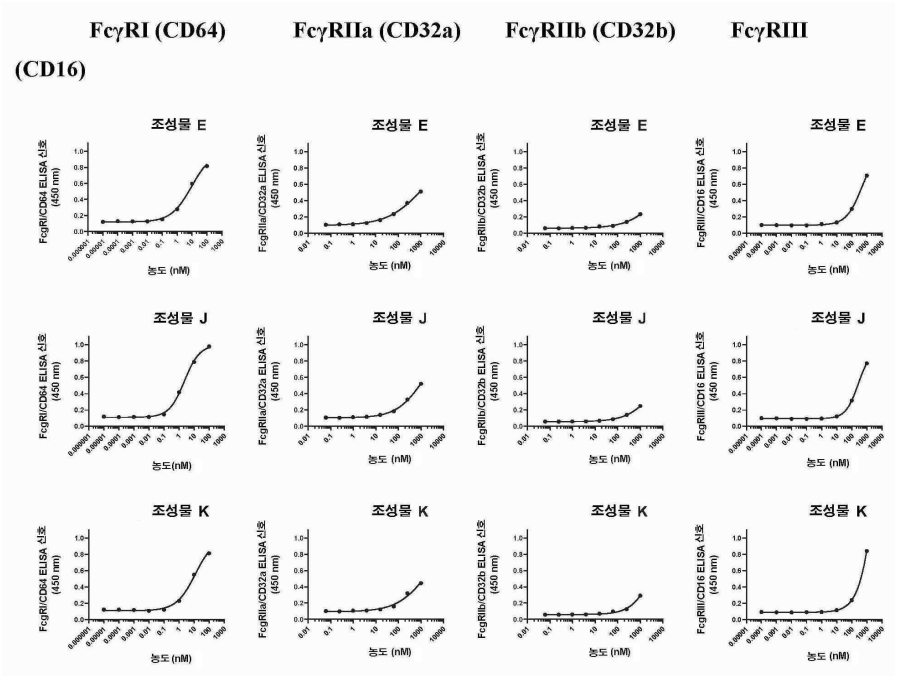
도면5


펨브롤리주맙
LZM-009
조성물 A
조성물 D
조성물 E
조성물 H
조성물 J
조성물 K
AlphaLISA FcRn-IgG 신호
농도 (nM)

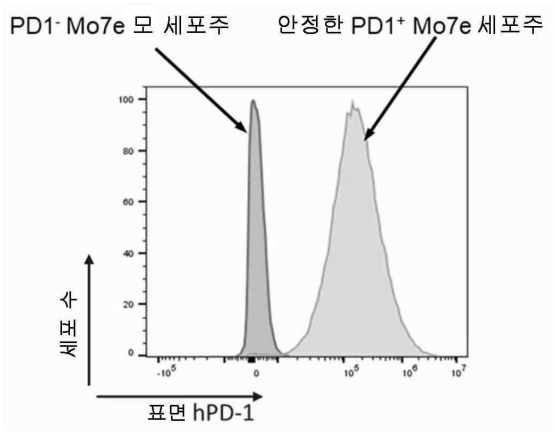
도면6a


FcγRI (CD64)
FcγRIIa (CD32a)
FcγRIIb (CD32b)
FcγRIII (CD16)
펨브롤리주맙
LZM-009
조성물 A
조성물 C
조성물 H
조성물 D
농도 (nM)

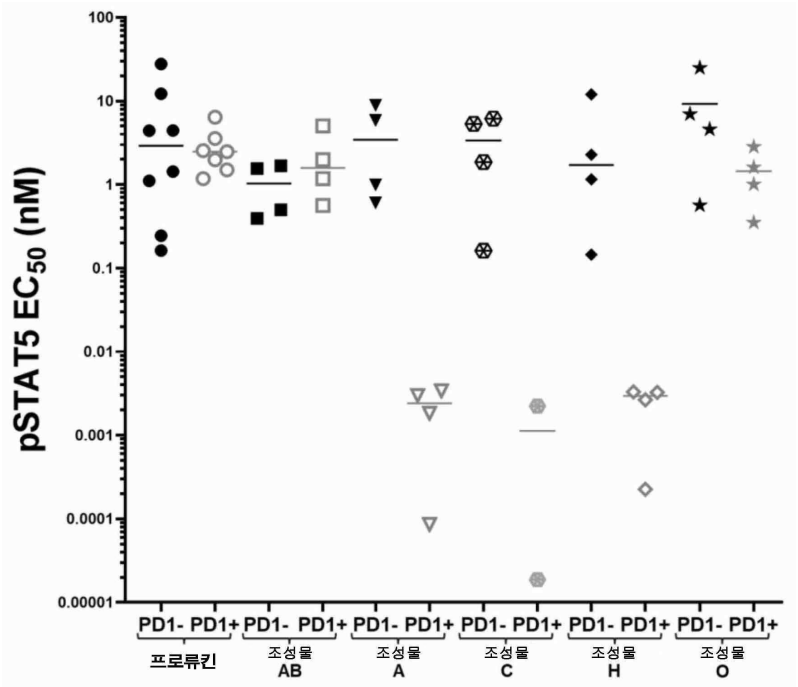
도면6b


FcγRI (CD64)
FcγRIIa (CD32a)
FcγRIIb (CD32b)
FcγRIII (CD16)
조성물 E
조성물 J
조성물 K
농도 (nM)

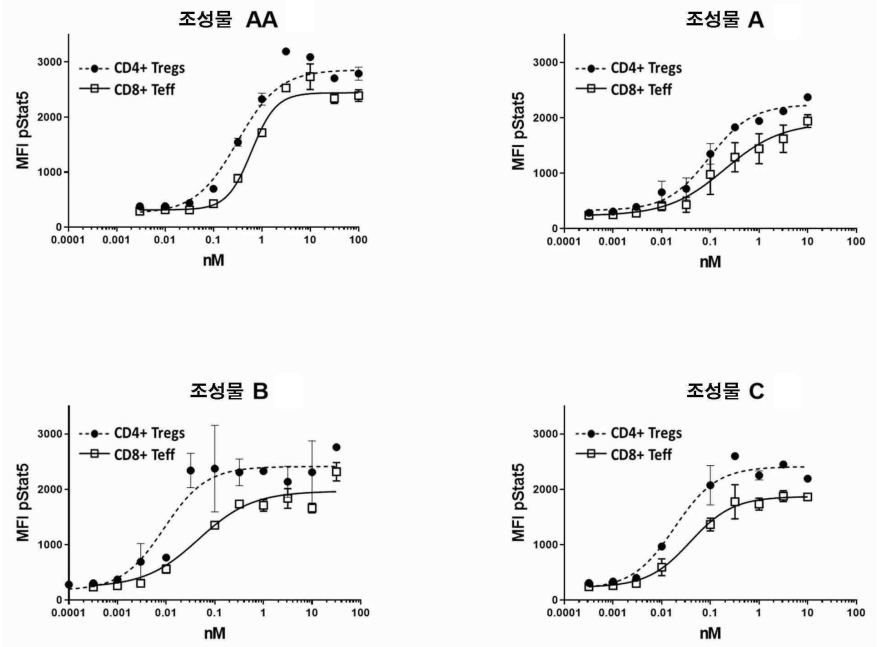
도면7a


PD1⁻ Mo7e 모 세포주
안정한 PD1⁺ Mo7e 세포주
세포 수
표면 hPD-1

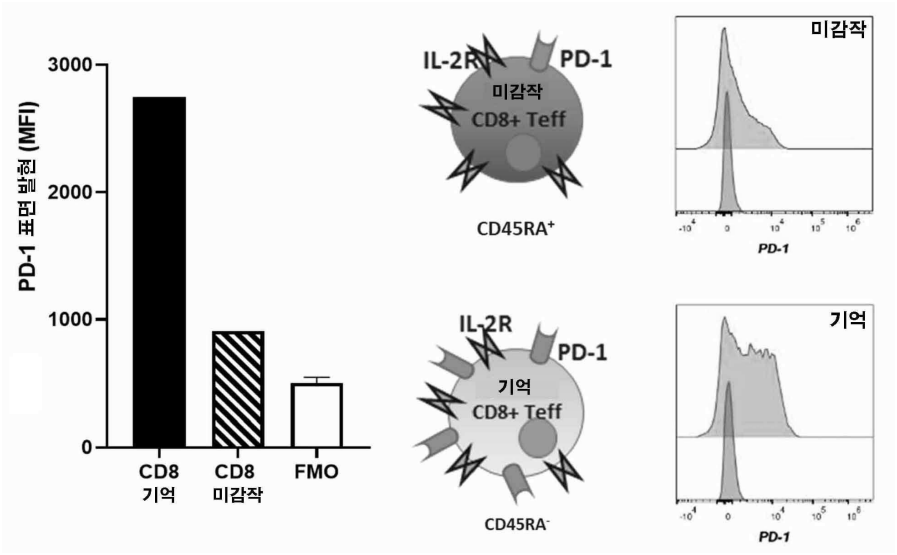
도면7b


pSTAT5 EC50 (nM)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
PD1- PD1+ PD1- PD1+ PD1- PD1+ PD1- PD1+ PD1- PD1+ PD1- PD1+
프로류킨
조성물 AB
조성물 A
조성물 C
조성물 H
조성물 O

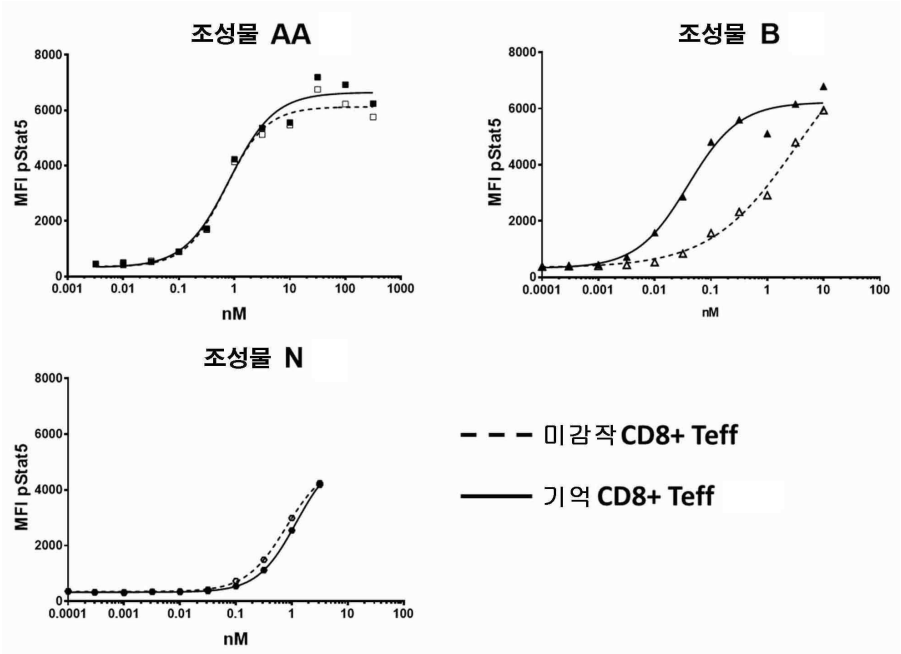
도면8


조성물 AA
조성물 A
조성물 B
조성물 C
CD4+ Tregs
CD8+ Teff
MFI pStat5
nM

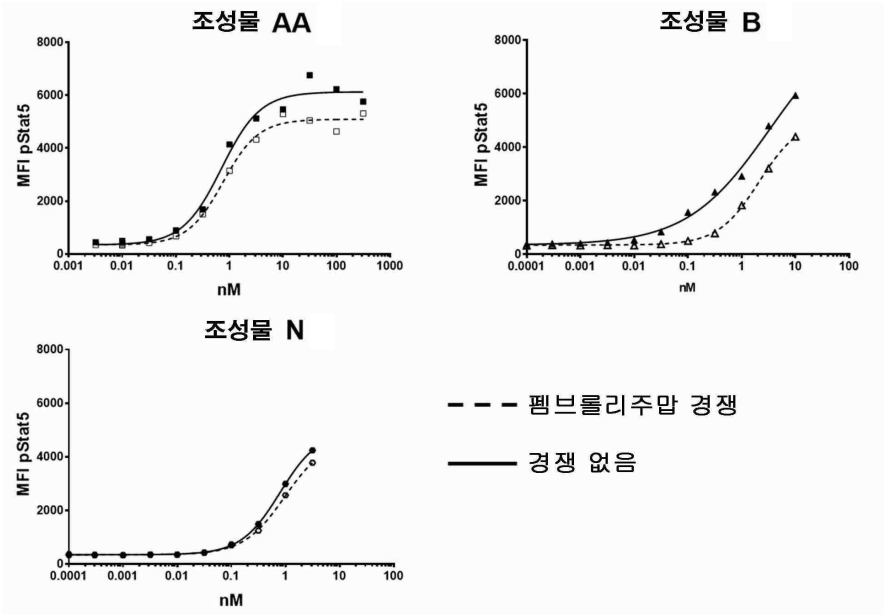
도면9a


PD-1 표면 발현 (MFI)
3000
2000
1000
0
CD8 기억
CD8 미감작
FMO
IL-2R
PD-1
미감작 CD8+ Teff
CD45RA+
미감작
PD-1
IL-2R
PD-1
기억 CD8+ Teff
CD45RA-
기억
PD-1

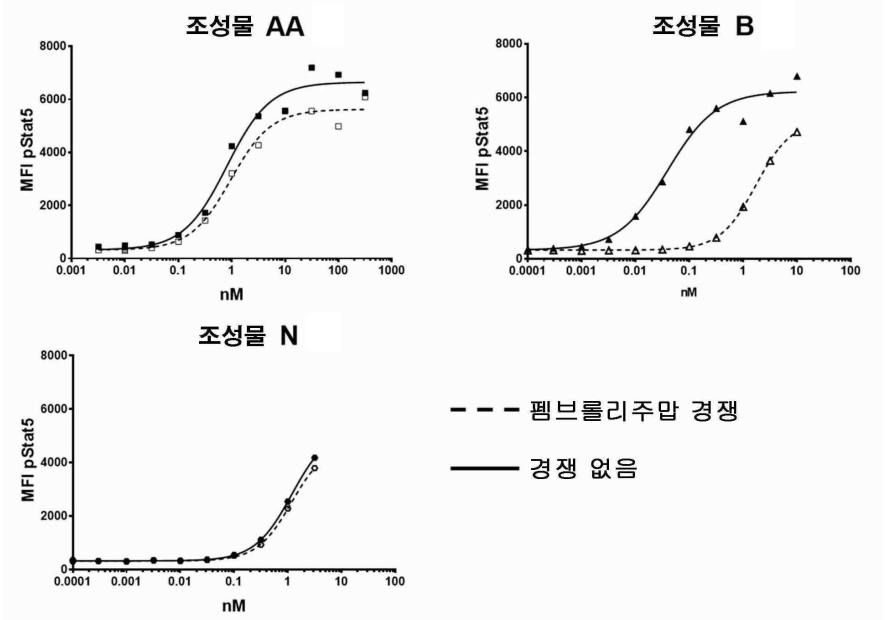
도면9b


조성물 AA
조성물 B
조성물 N
MFI pStat5
nM
미감작 CD8+ Teff
기억 CD8+ Teff

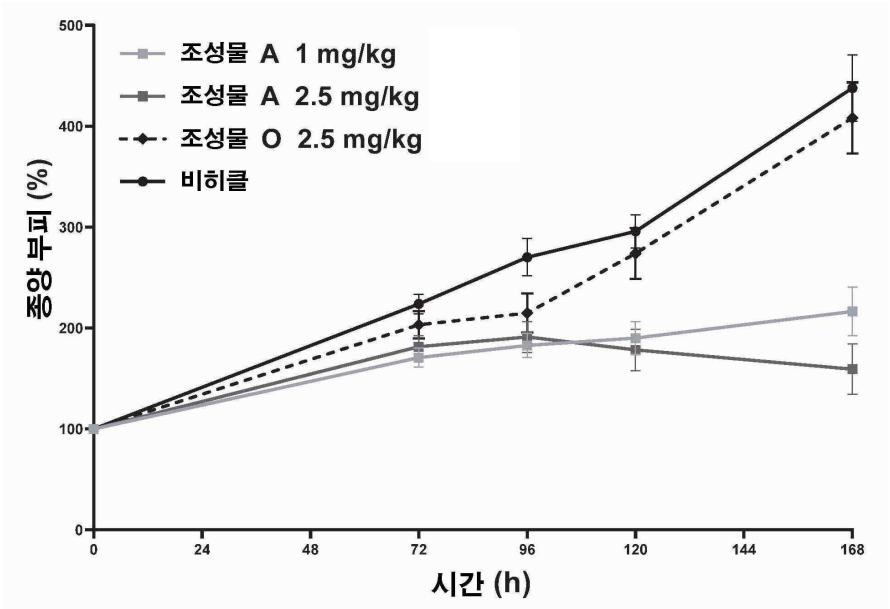
도면10a


조성물 AA
조성물 B
조성물 N
MFI pStat5
nM
펨브롤리주맙 경쟁
경쟁 없음

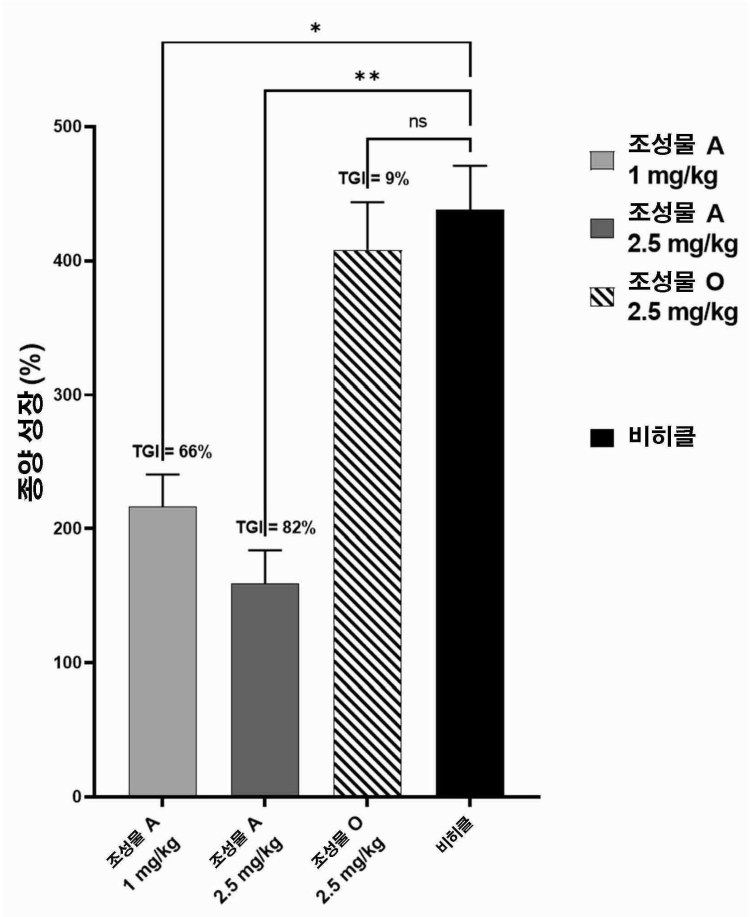
도면10b


조성물 AA
조성물 B
조성물 N
MFI pStat5
nM
펨브롤리주맙 경쟁
경쟁 없음

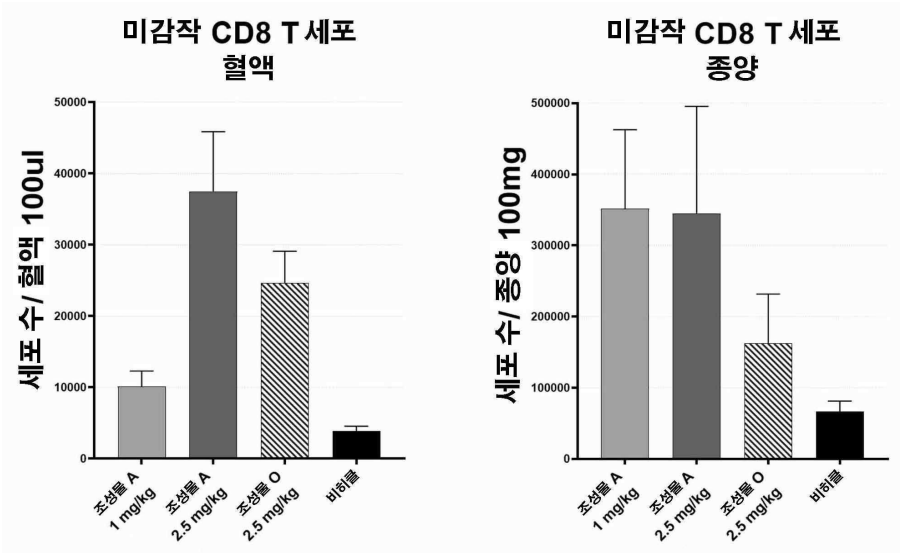
도면11a


조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클
종양 부피 (%)
시간 (h)
0
100
200
300
400
500
0
24
48
72
96
120
144
168

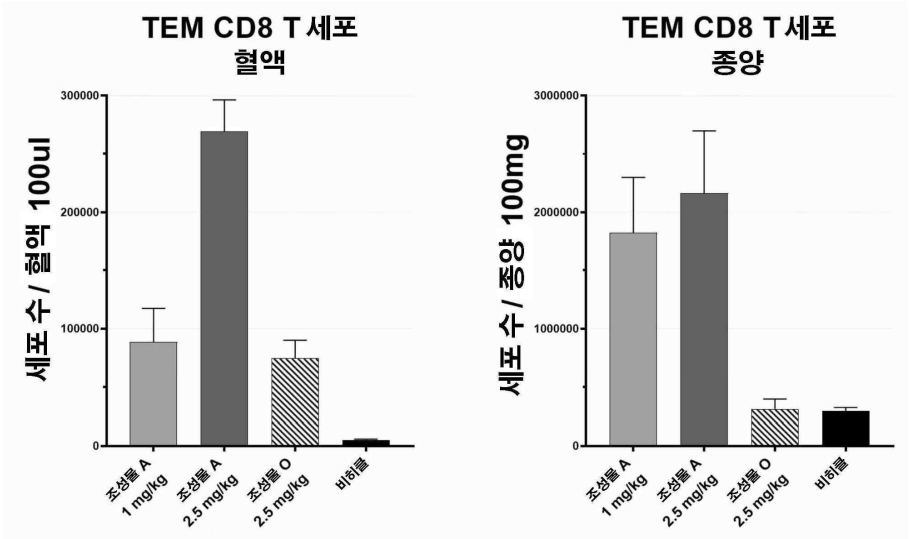
도면11b


*
**
ns
TGI = 9%
TGI = 66%
TGI = 82%
종양 성장 (%)
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클
0
100
200
300
400
500
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클

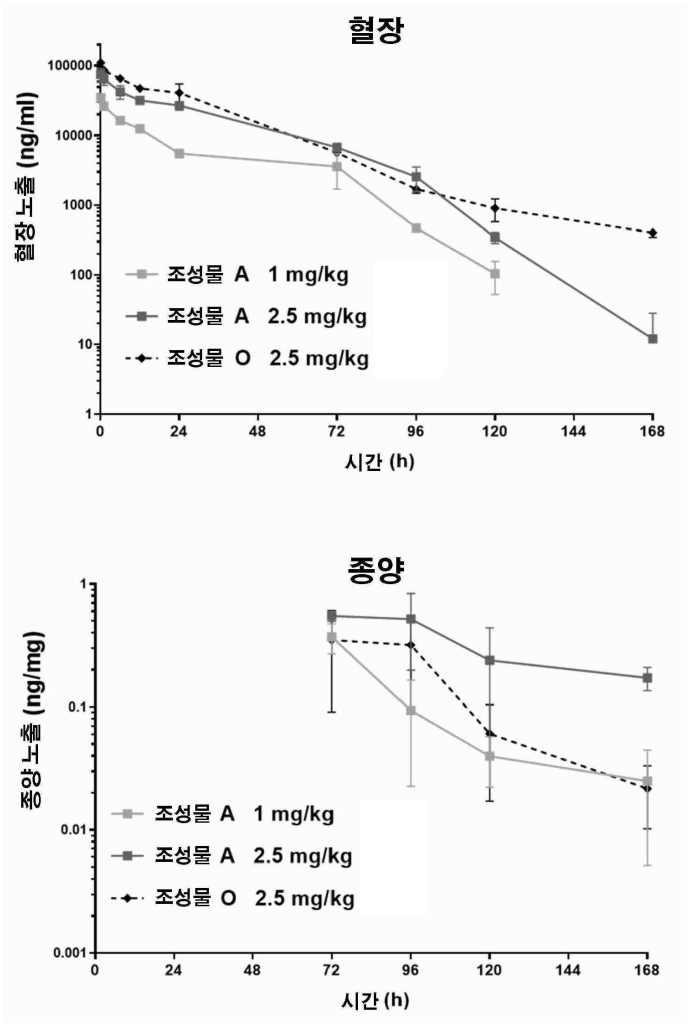
도면12a


미감작 CD8 T세포
혈액
세포 수/ 혈액 100ul
50000
40000
30000
20000
10000
0
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클
미감작 CD8 T세포
종양
세포 수/ 종양 100mg
500000
400000
300000
200000
100000
0
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클

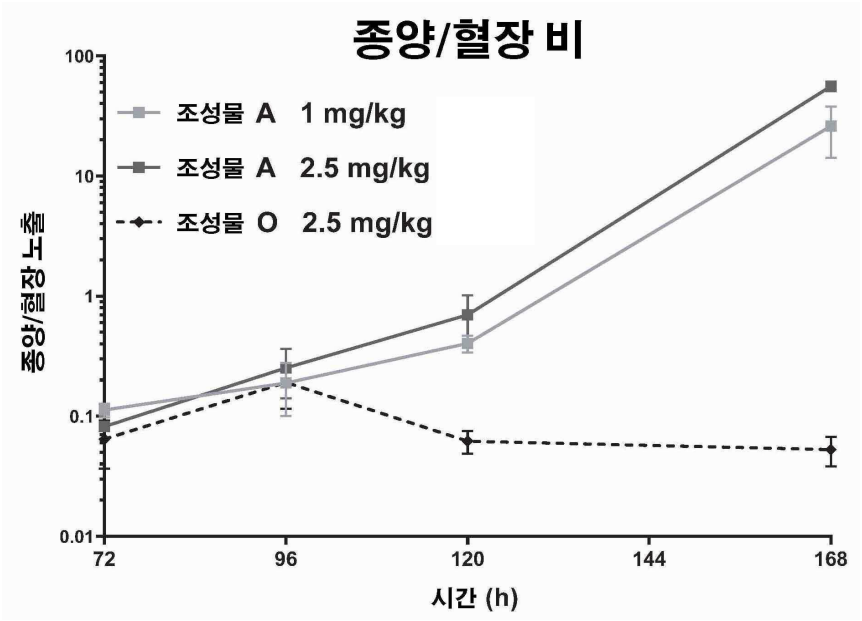
도면12b


TEM CD8 T세포
혈액
세포 수/ 혈액 100ul
300000
200000
100000
0
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클
TEM CD8 T세포
종양
세포 수/ 종양 100mg
3000000
2000000
1000000
0
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
비히클

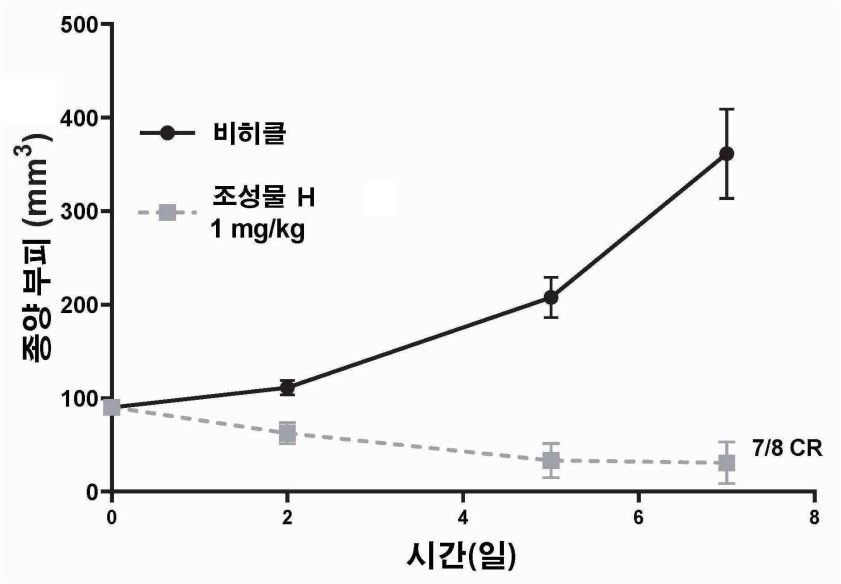
도면13a


혈장
혈장노출 (ng/ml)
100000
10000
1000
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
시간 (h)
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg
종양
종양노출 (ng/mg)
1
0.1
0.01
0.001
0
24
48
72
96
120
144
168
시간 (h)
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg

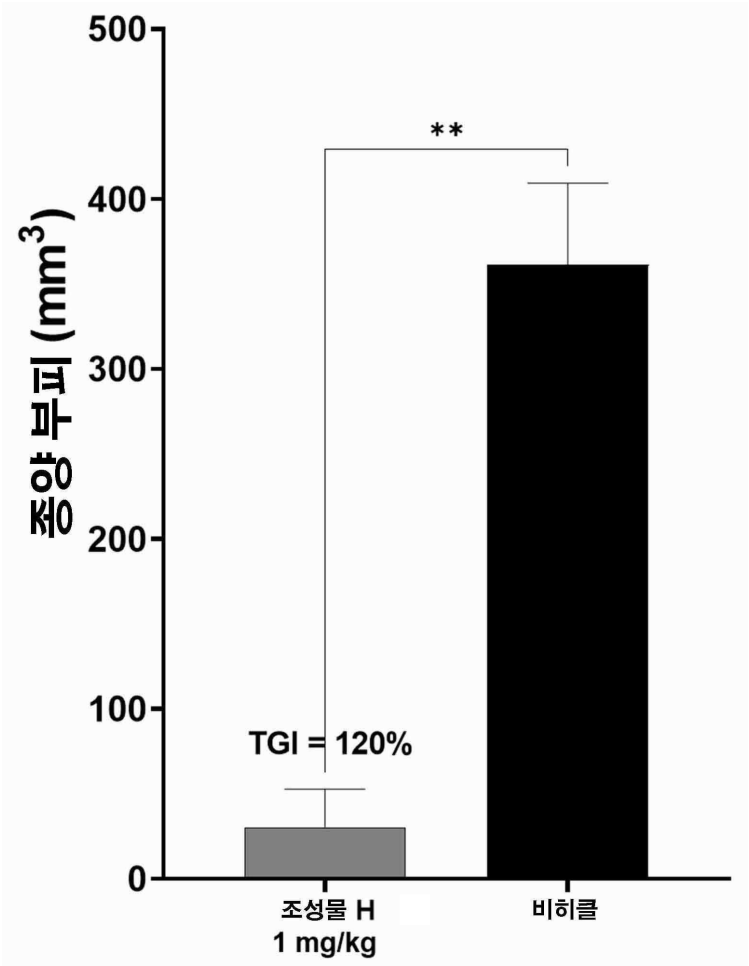
도면13b


종양/혈장 비
종양/혈장 노출
100
10
1
0.1
0.01
72
96
120
144
168
시간 (h)
조성물 A 1 mg/kg
조성물 A 2.5 mg/kg
조성물 O 2.5 mg/kg

도면14a


500
400
300
200
100
0
종양부피 (mm3)
비히클
조성물 H
1 mg/kg
7/8 CR
0
2
4
6
8
시간(일)

도면14b


500
400
300
200
100
0
종양부피 (mm3)
**
TGI = 120%
조성물 H
1 mg/kg
비히클

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.