(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023503
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7000924
(22) 출원일자(국제) 2023년06월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년01월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/065925
(87) 국제공개번호 WO 2023/242247
국제공개일자 2023년12월21일
(30) 우선권주장
22305869.4 2022년06월14일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
아블린쓰
벨기에, 9052 간드, 테크놀로지에파크-쯔비나아르드 21
사노피
프랑스 75017 파리 아브뉘 드 라 그랑 아르메 46
(72) 발명자
둘레르스, 멜리사
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
나이트, 카트린
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이윤기

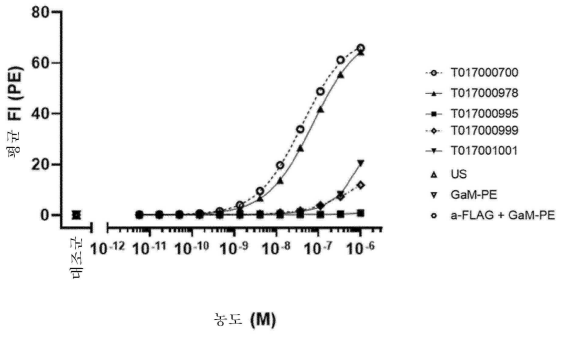
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 **T 세포 수용체를 표적화하는 면역글로불린 단일 가변 도메인**

(57) 요 약

본 기술은 T 세포 상의 인간 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인 및 T 세포 상의 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인 둘 모두에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 제공한다. 이는 또한 본 기술에 따른 ISVD 및 표적 세포 상의 항원에 결합할 수 있는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 기술은 상기 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산뿐만 아니라 이러한 ISVD 또는 폴리펩티드를 생산하는 벡터, 숙주 및 방법을 추가로 제공한다. 더욱이, 본 기술은 본 기술의 ISVD 또는 폴리펩티드를 이용하는 치료 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/303 (2013.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
로브로우크, 아넬리스
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
스텔렌스, 스테파니
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
스테펜젠, 소렌
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
판 벨레, 톰
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
판 호리크, 디아네
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내
페르헬스트, 유디트
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔.브이. 페이턴트 디파트먼트 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)으로서, 여기서 상기 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어지고, 여기서

a. CDR1의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 INFYG(서열 번호 79)이고;

b. CDR2의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 HISIGDQTDYAX$_1$SAKG(서열 번호 80)이고;

c. CDR3의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 LSRIX$_2$PYDY(서열 번호 81)이고;

여기서

- 아미노산 잔기 X$_1$은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F 및 S로부터 선택되고/되거나;

- 아미노산 잔기 X$_2$는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택되는, ISVD.

청구항 2

T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)으로서, 여기서 상기 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어지고, 여기서

a. CDR1의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 GYVHKINFYG(서열 번호 82)이고;

b. CDR2의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 HISIGDQTD(서열 번호 83)이고;

c. CDR3의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 LSRIX$_2$PYDY(서열 번호 84)이고;

여기서

- 위치 61의 아미노산 잔기(카바트에 따름)는 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F 및 S로부터 선택되고/되거나;

- 아미노산 잔기 X$_2$는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택되는, ISVD.

청구항 3

제1항에 있어서, X$_1$은 E 또는 D인, ISVD.

청구항 4

제1항에 있어서, X$_1$은 E인, ISVD.

청구항 5

제2항에 있어서, 위치 61의 아미노산 잔기(카바트에 따름)는 E 또는 D인, ISVD.

청구항 6

제2항에 있어서, 위치 61의 아미노산 잔기(카바트에 따름)는 E인, ISVD.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X$_2$는 Y, A, Q, F, S, T 또는 H인, ISVD.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X_2는 Y, Q, S 또는 T인, ISVD.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, X_2는 Y인, ISVD.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, ISVD에서 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F, T로 이루어진 군으로부터 선택되는, ISVD.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, ISVD에서 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W인, ISVD.

청구항 12

제1항에 있어서, X_1은 E이고, X_2는 Y이고, 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W인, ISVD.

청구항 13

제2항에 있어서, 위치 61의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 E이고, X_2는 Y이고, 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W인, ISVD.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 위치 1의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 E 및 D로부터 선택되는, ISVD.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 ISVD인, ISVD.

청구항 16

제15항에 있어서, 중쇄 ISVD는 V_{HH}, 인간화 V_{HH}, 낙타화 V_H, 도메인 항체, 단일 도메인 항체 및 dAb로부터 선택되는, ISVD.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 2~57 중 임의의 것의 서열과 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성 정도를 갖고, 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바람직하게는 상기 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52인, ISVD.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 32, 33 및/또는 35~57의 서열과 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성 정도를 갖고, 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바람직하게는 상기 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하는, ISVD.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 서열 번호 37 또는 서열 번호 42를 포함하거나 이로 이루어지는, ISVD.

청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하거나 이로 이루어지는, ISVD.

청구항 21

다음 서열을 포함하거나 이로 이루어진 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD):

X_0VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYA

X_1SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIX_2PYDYX_3GQGTLVTVSS(서열 번호 85),

여기서

a. X_0은 E 및 D로부터 선택되고;

b. X_1은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

c. X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되고;

d. X_3은 W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 22

제21항에 있어서, X_0은 D인, ISVD.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, X_1은 D 또는 E로 이루어진 군으로부터 선택되는, ISVD.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 있어서, X_1은 E인, ISVD.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, X_2는 Y, T, S 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택되는, ISVD.

청구항 26

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, X_2는 Y인, ISVD.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, X_3은 W인, ISVD.

청구항 28

T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 ISVD 및 표적 세포 상의 제1 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서 상기 제1 항원은 상기 TCR과 상이하고, 상기 표적 세포는 상기 T 세포와 상이하고,

여기서 상기 제1 및 제2 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어지고, 제1 ISVD는 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ISVD인, 폴리펩티드.

청구항 29

제28항에 있어서, 제1 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2~57 중 임의의 것의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바

람직하게는 제1 ISVD의 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 제1 ISVD는 서열 번호 32, 33 및/또는 35~57 중 임의의 것의 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바람직하게는 상기 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 31

제28항 또는 제29항에 있어서, 제1 ISVD는 서열 번호 37 또는 서열 번호 42를 포함하거나 이로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 32

제28항 또는 제29항에 있어서, 제1 ISVD는 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하거나 이로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포 상의 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제3 ISVD를 추가로 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 연결된 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 추가로 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 없는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 반감기를 폴리펩티드에 제공하는, 폴리펩티드.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 인간 혈청 알부민에 결합할 수 있는 ISVD인, 폴리펩티드.

청구항 36

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ISVD 또는 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 생산하는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는, 방법:

a. 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 또는 또 다른 적합한 발현 시스템에서 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 발현시키는 단계; 이어서 선택적으로

b. ISVD 또는 폴리펩티드를 단리 및/또는 정제하는 단계.

청구항 37

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ISVD 또는 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.

청구항 38

제37항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 39

제37항에 따른 핵산 또는 제38항에 따른 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 비인간 숙주 또는 숙주 세포.

청구항 40

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 ISVD 또는 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 제약 조성물인, 조성물.

청구항 42

의약으로서 사용하기 위한, 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제40항 또는 제41항에 따른 조성물.

청구항 43

증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 예방, 치료 또는 개선에 사용하기 위한, 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 제40항 또는 제41항에 따른 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 질환은 암인, 사용하기 위한 폴리펩티드 또는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **1 기술분야**

[0002] 본 기술은 T 세포 상의 인간 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인과 T 세포 상의 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인 둘 모두에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 제공한다. 이는 또한 본 기술에 따른 ISVD 및 표적 세포 상의 항원에 결합할 수 있는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 다중특이성 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 기술은 추가로 상기 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산뿐만 아니라 이러한 ISVD 또는 폴리펩티드를 생산하는 벡터, 숙주 및 방법을 제공한다. 또한, 본 기술은 본 기술에 따른 ISVD 또는 폴리펩티드를 사용하는 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] **2 배경기술**

[0004] 암은 전 세계적으로 막대한 인명 피해를 입힌다. 오늘날 그것은 심장병과 뇌졸중에 이어 전 세계적으로 두 번째로 큰 사망 원인이다. 암은 2020년에 약 1,930만 건의 새로운 사례와 1,000만 건의 암 관련 사망으로 전 세계적으로 이환율과 사망률의 주요 원인 중 하나이다. 새로운 사례의 수는 향후 수십 년 동안 더 증가할 것으로 예상된다. 인구 증가, 고령화 및 생활방식의 변화는 암 부담 증가에 기여하는 요인으로 설명되었다. 2013년 WHO는 2030년까지 암이 허혈성 심장 질환을 능가하고 전 세계적으로 가장 흔한 사망 원인이 될 것이라고 예상하였다(출처: WHO Cancer).

[0005] 전 세계적으로 암으로 인한 조기 사망 및 장애의 총 경제적 영향은 2008년에 이미 약 9,000억 달러였으며, 이는 당시 세계 국내 총생산(GDP)의 1.5%를 나타냈다. 암이 점점 흔해지면서 전체 경제적 영향도 크게 증가할 것이 확실하다. 고형 종양에 사용 가능한 치료 요법에는 전형적으로 외과적 절제, 화학요법 및 방사선요법의 조합이 포함된다. 40년의 임상 경험에서, 특히 암의 진행 단계에서 진전이 거의 이루어지지 않았다. 암과 싸우는 새로운 치료법이 간절히 기다려진다.

[0006] 항체 요법은 이제 질환, 특히 암과 싸우기 위한 의사의 무기체계에서 중요한 부분이다. 단클론 항체는 이미 수년 동안 다양한 질환에 대한 핵심 치료 접근법으로 확립되었다. 동시대에 승인된 대부분의 항체 요법은 단일특이성 단클론 항체(mAb)에 의존한다. 오늘날까지, 대부분의 mAb 표적에는 작용적 또는 길항적 접근이 필요하다. 세포-표면 항원 자체의 표적화는 세포사멸의 유도를 통해 항종양 활성을 매개할 수 있는 반면, 혈액 악성종양에 대한 대부분의 mAb-기반 활성은 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)과 같은

Fc-매개 이펙터 기능에 의존한다.

[0007] 최근에는, 면역요법이 암 연구 분야에서 빠르게 성장하는 분야로 부상했다. 면역요법은 신체의 면역 감시 시스템, 특히 T 세포를 암세포로 유도하는 것이다.

[0008] 세포독성 T 세포(CTL)는 암세포, (특히 바이러스로) 감염된 세포 또는 다른 방식으로 손상된 세포를 사멸시키는 T 림프구이다. T 림프구(또는 T 세포라고도 함)는 세포 표면 상에 T 세포 수용체(TCR) 및 CD3 수용체를 발현한다. αβTCR-CD3 복합체(또는 "TCR 복합체")는 6개의 다른 유형 I 단일-스패닝 막관통 단백질: 리간드 인식을 담당하는 TCR 이종이량체를 형성하는 TCRα 및 TCRβ 사슬, 및 비-공유적으로 결합된 CD3γ, CD3δ, CD3ε 및 ζ 사슬로 구성되며, 이는 수용체 활성화시 인산화되는 세포질 서열 모티프를 갖고 있으며, 많은 수의 신호전달 성분들을 동원한다(문헌[Call et al. 2004, Molecular Immunology 40: 1295-1305]).

[0009] 이종이량체 T 세포 수용체(TCR)의 α 및 β 사슬 둘 모두는 불변 도메인 및 가변 도메인으로 이루어진다. T 세포는 티로신 인산화된 CD3 복합체에 의해 개시된 신호 전달과 함께 자가 MHC 분자에 의해 제시되는 동족 펩티드의 TCR 인식 시 활성화되어, T 세포 증식 및 분화를 유도한다.

[0010] MHC 분자의 암세포에 의한 발현과 특정 펩티드 항원의 존재, 생성, 수송 및 표시에 의존하는 특이 T 세포 반응을 이끌어내기보다는, 보다 최근의 개발에서는 재조합 항체 기반 기술을 통해 다클론 방식으로 환자의 모든 T 세포를 관여시켜 면역요법과 항체 요법의 장점을 결합하려고 시도하였다. 이중특이성 항체는 한쪽 아암 상에 종양 인식 부분을 갖는(표적-결합 아암) 한편 분자의 다른 쪽 아암은 T 세포 항원에 대한 특이성(소위 T 세포 관여자(TCE)(종종 CD3을 표적화함)을 갖도록 조작되었다(이펙터-결합 아암). 이러한 이중특이성 항체는 악성 세포에 대한 환자의 면역 반응을 증진시키는 다중표적 분자이다. 이중특이성 항체에 의한 T 세포와 종양 세포의 공동 결합은 T 세포와 종양 세포 사이에 세포용해 시냅스를 형성하여 T 세포 활성화를 유도하고 종양 세포 살해을 가져온다.

[0011] 대부분의 T 세포 활성화 이중특이성 항체는 T 세포 상의 CD3 복합체를 표적화하는 반면, αβ T 세포 수용체의 불변 도메인을 표적화하는 일부 이중특이성 바인더는 WO 2016/180969 A1에 기술되어 있다. 그러나, 이러한 T 세포 활성화 이중특이성 항체의 주요 문제 중 하나는 사이노몰구스 T 세포 수용체와의 교차 반응성이 거의 관찰되지 않았다는 것이다.

[0012] 이중특이성 항체 작제물은 여러 형식으로 제안되었다. 예를 들어, 이중특이성 항체 형태는 2개의 항체 또는 이의 단편의 화학적 콘쥬게이션을 포함할 수 있다(문헌[Brennan M. et al. 1985, Science 229(4708): 81-83]; 문헌[Glennie M. J. et al. 1987, J Immunol 139(7): 2367-2375]).

[0013] 그러나 이러한 이중특이성 항체 형태의 단점은 고농도에서 분자량 및 점도가 높아 예를 들어 피하 투여를 어렵게 하고, 각 결합 단위가 특이적 및 고친화성 결합을 위해 2개의 가변 도메인의 상호작용을 필요로 하며, 이는 폴리펩티드 안정성 및 생산 효율에 영향을 미친다는 점을 포함한다. 이러한 이중특이성 항체 형태는 또한 저조한 생산 효율 및 낮은 역가 및/또는 경쇄의 쌍형성 오류 또는 중쇄의 쌍형성 오류와 관련된 CMC 문제를 잠재적으로 유발할 수 있다.

[0014] 현재, 단일 이중특이성 항체인 블리나투모맙(Blinatumomab)(CD19 및 CD3를 인식하는 BiTE 분자)만이 암 치료를 위해 임상에서 사용하기 위해 시판되고 있다. 이 T 세포 결합 형식은 2014년 12월 FDA의 2차 치료용으로 승인되었지만, 많은 장애물을 극복해야 했다. 블리나투모맙의 첫 번째 임상 시험은 한편으로는 신경학적 이상반응, 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 감염으로 인해 조기에 중단되었으며, 다른 한편으로는 객관적인 임상 반응 또는 강력한 생물학적 활성 징후의 부재로 인해 중단되었다. CRS는 최초의 T 세포-결합 요법에서 보고된 가장 중요한 이상반응이다.

[0015] 사이토카인 폭풍과 같은 이상반응 및 전신 부작용의 위험을 최소화하기 위해, T 세포 항원 아암 선택에 최대한 주의를 기울여야 한다. 후자는 1가 방식으로 TCR 복합체에 결합해야 하며, 표적 암세포가 없는 경우 T 세포 신호전달을 유발하지 않을 수 있다. 이들의 표적(종양 및 T 세포 항원)에 대한 이중특이성 항체의 양쪽 아암의 특이적 결합만이 세포용해성 시냅스의 형성 및 종양 세포의 후속 사멸을 유발할 수 있다.

[0016] 비인간 영장류, 예컨대 사이노몰구스 또는 레서스 원숭이는 일반적으로 효능 및 독성 연구를 포함한 전임상 연구에 가장 적합한 동물 종으로 간주된다. 비인간 영장류에서 이중특이성 T 세포 결합 항체의 독성 평가를 가능하게 하기 위해, 인간 및 비인간 영장류 TCR에 대한 항체의 우수한 종 교차-반응성이 권장된다.

[0017] 따라서, 추가적인 다중특이성 T 세포 결합 형식, 특히 CD3와 다른 T 세포 수용체를 표적화하는 다중특이성 T 세

포 결합 형식에 대한 요구가 남아 있다.

[0018] 추가로, 세포독성 반응을 유도하기에 충분한 친화도로 표적 세포 및 T 세포 모두에 결합하는 항체 작제물이 필요하다. 동시에, 이러한 작제물은 비표적 세포, 즉, 표적 항원을 발현하지 않거나 이를 낮은 수준으로만 발현하는 세포에 대해 세포독성 반응을 유도하지 않아야 한다. 이에 따라, 효능과 안전성 사이에 균형을 맞출 수 있다. 이러한 작제물이 예를 들어 미생물 숙주에서 효율적으로 생성될 수 있는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 작제물은 원치 않는 부작용(예를 들어 비표적 세포에 대한 세포 독성 활성에 의해 유발)을 나타내지 않거나 단지 최소로 나타내야 한다.

발명의 내용

[0019] **3 본 기술의 개요**

[0020] 본 발명자들은 TCR을 특이적으로 표적화하고 결합할 수 있는 신규한 T 세포 관여자(TCE) 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 발견하였다. TCE로도 지칭되는 이러한 TCR 결합 ISVD는 세포-특이적 표적에 결합할 수 있는 모이어티에 연결될 수 있다. 세포 표면 상에 상기 특이적 표적을 제시하는 암과 같은 비정상적인 세포에 의해 야기되는 병리는 T 세포에 대한 TCE ISVD의 결합을 통해 면역계에 의해 표적화될 수 있다. 결과적으로, T 세포는 상기 특이적 표적을 발현하는 종양 세포로 향하게 되고, T 세포가 TCE에 결합함으로써 T 세포 활성화가 유도된다. 일단 T 세포가 활성화되면, 효과적인 표적 세포 살해가 촉발된다.

[0021] 본 발명자들은 본 기술에 따른 TCR을 표적화하는 ISVD 및 세포-특이적 표적을 동시에 포함하는 작제물이 시험관내 표적 발현 세포의 효율적인 T 세포-매개 사멸을 초래한다는 것을 발견하였다. 또한, 이러한 작제물은 표적을 발현하지 않거나 낮은 수준으로 발현하는 세포에 대해 제한된 활성만을 나타냈다. 이는 이로운 안전성 프로파일을 나타내면서 특정 표적 세포에 대해 고도로 특이적인 T 세포-매개 세포독성 반응을 유도할 가능성을 시사한다.

[0022] 이전에 개발된 TCR 결합 ISVD를 사용한 안정성 연구에서, 본 발명자들은 ISVD의 특정 위치에서 일부 아미노산 잔기에 대한 화학적 안정성의 결여를 관찰하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 위치 61의 아스파르트산(D)에 대해 이성질체화가 발생하고 위치 99에서 트립토판(W) 산화가 발생함을 관찰하였다(카바트 넘버링). 하류 프로세싱에서 미량 수준의 전이 금속이 폴리소르베이트에 의해 촉매화되고, 이것이 트립토판 산화의 관찰을 초래하였다는 가설이 세워졌다. 본 발명자들은 TCR 결합 ISVD의 선택된 위치에서 여러 아미노산 치환을 만들었고, 이러한 해로운 효과가 감소되거나 심지어 완전히 방지될 수 있음을 관찰하였다.

[0023] 상이한 종의 TCR에 대한 강력한 결합성 및 개선된 화학적 안정성을 갖는 TCR 결합 ISVD가 본원에서 제공된다.

[0024] 따라서, 제1 양태에서, 본 기술은 T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체의 불변 도메인을 특이적으로 표적화하는 ISVD에 관한 것으로, ISVD는 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)을 포함하고,

[0025] a. CDR1의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 INFYG(서열 번호 79)이고;

[0026] b. CDR2의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 HISIGDQTDYAX$_1$SAKG(서열 번호 80)이고;

[0027] c. CDR3의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 LSRIX$_2$PYDY(서열 번호 81)이고;

[0028] 여기서,

[0029] - 아미노산 잔기 X$_1$은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택되고/되거나;

[0030] - 아미노산 잔기 X$_2$는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L, 및 I로부터 선택된다.

[0031] 본 기술의 다른 양태는 T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 ISVD에 관한 것으로, 상기 ISVD는 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)을 포함하고,

[0032] a. CDR1의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 GYVHKINFYG(서열 번호 82)이고;

[0033] b. CDR2의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 HISIGDQTD(서열 번호 83)이고;

[0034] c. CDR3의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 LSRIX_2PYDY(서열 번호 84)이고;

[0035] 여기서,

[0036] - 위치 61의 아미노산 잔기(카바트에 따름)는 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택되고/되거나;

[0037] - 아미노산 잔기 X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택된다.

[0038] 일 실시형태에서, X_1은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택된다. 일 실시형태에서, X_1은 E 또는 D로부터 선택되고, 예컨대 X_1은 E이다.

[0039] 또 다른 실시형태에서, 위치 61(카바트에 따름)은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택되고, 예컨대 위치 61(카바트에 따름)은 E 또는 D이다.

[0040] 일 실시형태에서, 위치 61(카바트에 따름)은 E이다.

[0041] 일 실시형태에서, X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택된다. 일 실시형태에서, X_2는 Y, A, Q, F, S, T 또는 H이다. 일 실시형태에서, X_2는 Y, Q, S 또는 T이다. 일 실시형태에서, X_2는 Y이다.

[0042] 일 실시형태에서, 위치 103의 ISVD의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F, T로 이루어진 군으로부터 선택되고, 예컨대 위치 103의 아미노산(카바트 넘버링)은 W이다.

[0043] 또 다른 실시형태에서, 본 기술은 X_1은 E이고, X_2는 Y이고, 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W인 ISVD; 또는 위치 61의 아미노산 잔기 (카바트 넘버링)는 E이고, X_2는 Y이고, 위치 103의 아미노산 잔기(카바트 넘버링)는 W인 ISVD를 제공한다.

[0044] 추가 실시형태에서, ISVD는 중쇄 ISVD이다. 일 실시형태에서, ISVD는 VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH, 도메인 항체, 단일 도메인 항체 및 dAb로부터 선택된다. 일 실시형태에서, ISVD는 VHH, 인간화 VHH 및 낙타화 VH로부터 선택된다. 일 실시형태에서, ISVD는 서열 번호 2 내지 57의 서열과 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성 정도를 가지며, 여기서, 서열 동일성 정도를 결정할 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시된다.

[0045] 본 기술의 추가 양태는 ISVD에 관한 것으로, 여기서, ISVD의 서열은

[0046] X_0VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAX_1SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIX_2PYDYX_3GQGTLVTVSS (서열 번호 85)이고,

[0047] a. X_0은 E 및 D로부터 선택되고;

[0048] b. X_1은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0049] c. X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0050] d. X_3은 W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0051] 일 실시형태에서, X_0은 D이다. 일 실시형태에서, X_1은 D 또는 E로부터 선택된다. 일 실시형태에서, X_1은 E이다. 일 실시형태에서, X_2는 Y, T, S 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, X_2는 Y이다. 일 실시형태에서, X_3은 W이다.

[0052] 본 기술의 또 다른 양태에서, 본 기술에 따른 ISVD는 특정 세포-표면 표적에 결합할 수 있는 모이어티를 추가로 포함하는 다중특이성 폴리펩티드의 일부이다.

[0053] 본 기술의 일부 실시형태에서, 본 기술은 따라서 제1 및 적어도 하나의 추가 ISVD를 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서, 상기 제1 ISVD는 T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합하며, 상기 적어도 하나의 추가 ISVD는 표적 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하고, 제1 ISVD는 본 기술에 따른 ISVD이다.

[0054] 이러한 실시형태에서, 제1 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2 내지 57의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%의 서열 동일성을 가질 수 있으며, 여기서, 서열 동일성 정도를 결정할 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시된다. 일 실시형태에서, 상기 제1 ISVD는 서열 번호 37, 42, 46, 50 및 52, 예컨대 서열 번호 37 또는 서열 번호 42로 이루어진 아미노산 서열의 군으로부터 선택된다.

[0055] 또 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 표적 세포 상의 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제3 ISVD를 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 본 기술의 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 연결된 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 추가로 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 없는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 반감기를 갖는 폴리펩티드를 제공한다. 예를 들어, 결합 단위는 인간 혈청 알부민과 같은 (인간) 혈청 단백질에 결합하는 ISVD일 수 있다.

[0057] 또한, 본 기술의 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 또는 이 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.

[0058] 본 기술은 또한 본 기술에 따른 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 또는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 비인간 숙주 또는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0059] 본 기술은 또한 본 기술의 ISVD 또는 폴리펩티드를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 바람직하게는 조성물은 제약 조성물이다.

[0060] 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 생성하는 방법이 추가로 제공되며, 상기 방법은 적어도 다음의 단계를 포함한다:

[0061] a. 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 또는 또 다른 적합한 발현 시스템에서 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현시키는 단계, 이어서 선택적으로,

[0062] b. ISVD 또는 폴리펩티드를 단리하고/하거나 정제하는 단계.

[0063] 또한, 본 기술은 의약으로 사용하기 위한 조성물 또는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0064] 본 기술의 일 실시형태에서, 폴리펩티드 또는 조성물은 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 및 자가면역 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다. 본 기술의 일 실시형태에서, 상기 증식성 질환은 암이다.

[0065] 본 기술은 또한, 치료를 필요로 하는 대상체에게 조성물 또는 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0066] 본 기술의 일 실시형태에서, 치료 방법은 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 또는 자가면역 질환의 치료를 위한 것이다. 일 실시형태에서, 상기 증식성 질환은 암이다.

[0067] 본 기술은 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물 또는 폴리펩티드를 추가로 제공한다. 본 기술의 일 실시형태에서, 의약은 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 또는 자가면역 질환의 치료에 사용된다.

[0068] 본 기술의 일 실시형태에서, 상기 증식성 질환은 암이다.

도면의 간단한 설명

[0069] **4 도면의 간단한 설명**

도 1은 유세포 분석법(FACS)에서 결정된 바와 같은 일차 인간 T 세포에 대한 본 기술에 따른 TCE ISVD에 의한 결합을 나타낸다.

도 2는 유세포 분석법(FACS)에서 결정된 바와 같은 일차 인간 T 세포에 대한 본 기술에 따른 TCE-CD123-ALB ISVD 작제물에 의한 결합을 나타낸다.

도 3은 30 μM HSA의 존재 하에서 10:1의 이펙터 대 표적 비를 사용한 유세포 분석 기반 인간 T 세포 매개 MOLM-13 세포 살해 분석에서의 TCE-CD123-ALB 작제물의 용량-반응 곡선을 나타낸다. 세포를 2명의 인간 공여자로부터 수득하였다. 공여자 1에 대한 결과는 도 3a, 도 3c 및 도 3e에도시된 반면, 공여자 2에 대한 결과는 도 3b, 도 3d 및 도 3f에 도시되어 있다.

도 4는 30 μM HSA의 존재 하에서 10:1의 이펙터 대 표적 비를 사용한 유세포 분석 기반 인간(도 4a) 및 사이노

(도 4b) T 세포 매개 KG-1a 세포 살해 분석에서의 TCE-CD123-ALB 작제물의 용량-반응 곡선을 나타낸다.

도 5는 30 μm HSA의 존재 하에 15:1의 이펙터 대 표적 비를 사용한 임피던스 기반 인간(도 5a, 도 5b) 및 사이노몰구스(도 5c, 도 5d) T 세포 매개 Huh-7 세포 살해 분석에서 TCE-GPC3-GPC3-ALB 작제물의 용량 반응 곡선을 나타낸다.

도 6은 ISVD 작제물 A022600424 및 A022600462 둘 모두에 대해 역상 크로마토그래피에서 RRT가 1.0 미만인 피크의 합으로 정량화된 25℃에서의 상대적 트립토판 산화의 진행을 나타낸다.

도 7은 1일 후 및 2주 후 강제 분해 조건 하에서 ISVD 작제물 A022600424 및 A022600462 둘 모두에 대해 역상 크로마토그래피에서 RRT가 1.0 미만인 피크의 합으로 정량화된 트립토판 산화의 진행을 나타낸다.

도 8은 ISVD 작제물 A022600424 및 A022600462의 펩티드 맵핑의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] **5 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0071] 본 발명자들은 ISVD T0170056G05 (WO 2016180969에 서열 번호 50으로 개시됨)의 CDR에 특정 아미노산 돌연변이 및 이들의 조합을 도입시키는 것이 인간 TCR 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 대한 개선된 결합을 초래함을 이전 연구에서 밝혀냈다. 그러나, T017000700(서열 번호 1)으로 명명된, 개발된 개선된 TCR-결합 ISVD는 이성질체화 및 트립토판 산화와 관련된 화학적 안정성 연구에서 일부 문제를 갖는 것으로 나타났다.

[0072] 결과적으로, 추가 개선 TCR 결합 ISVD에 대한 필요성이 남아 있었다.

[0073] 본 발명자들은 지금에 와서야 ISVD의 서열 내의 특정 위치에서의 특정 아미노산 돌연변이의 도입이 T0170056G05(WO 2016180969에 서열 번호 50으로 개시됨)와 관련하여 개선된 TCR 결합을 유지하면서 T017000700에서 관찰된 문제를 제거할 수 있음을 발견하였다.

[0074] 아미노산 잔기는 하기 표 B-1에 언급된 바와 같이, 표준 3-문자 또는 1-문자 아미노산 코드에 따라 본원에서 상호교환적으로 표시될 것이다.

[0075] [표 B-1] 일반적인 아미노산

1-문자 코드	3-문자 코드	명칭
A	Ala	알라닌
C	Cys	시스테인
D	Asp	아스파르트산
E	Glu	글루탐산
F	Phe	페닐알라닌
G	Gly	글리신
H	His	히스티딘
I	Ile	이소류신
K	Lys	리신
L	Leu	류신
M	Met	메티오닌
N	Asn	아스파라긴
P	Pro	프롤린
Q	Gln	글루타민
R	Arg	아르기닌
S	Ser	세린
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
W	Trp	트립토판
X	Xaa	지정되지 않음
Y	Tyr	티로신

[0076]

[0077] 아미노산 잔기가 "X" 또는 "Xaa"로 표시되는 경우, 문맥상 더 제한된 해석이 요구되지 않는 한, 아미노산 잔기가 지정되지 않음을 의미한다. 예를 들어, 설명이 아미노산 잔기(들) 중 하나(또는 그 이상)가 X로 표시되는 CDR의 아미노산 서열을 제공하는 경우, 설명은 아미노산 잔기(들)가 CDR의 특정 위치에 존재한다(할 수 있다)고 추가로 특정할 수 있다.

[0078] 5.1 면역글로불린 단일 가변 도메인

[0079] 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인"(ISVD)은 항원 결합 부위가 단일 면역글로불린 도메인에 존재하거나 이에 의해 형성되는 면역글로불린 분자를 정의한다. 이는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 "통상적인" 면역글로불린(예를 들어, 단클론 항체) 또는 이의 단편(예컨대, Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, 디-scFv)(여기서, 2개의 면역글로불린 도메인, 특히 2개의 가변 도메인이 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성함)과 구별되게 설정한다. 일반적으로, 통상적인 면역글로불린에서, 중쇄 가변 도메인(V_H)과 경쇄 가변 도메인(V_L)은 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성한다. 이 경우, V_H와 V_L 둘 모두의 상보성 결정 영역(CDR)은 항원 결합 부위에 기여할 것이며, 즉, 총 6개의 CDR이 항원 결합 부위 형성에 관여할 것이다.

[0080] 상기 정의를 고려하면, 통상적인 4쇄 항체(예컨대 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 분자; 당업계에 알려짐) 또는 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, 예컨대, 디술피드 결합 Fv 또는 scFv 단편, 또는 이러한 통상적인 4쇄 항체

로부터 유래된 디아바디(모두 당업계에 알려짐)의 항원 결합 도메인은 일반적으로 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 간주되지 않으며, 그 이유는 이러한 경우에 항원의 각 에피토프에 대한 결합이 일반적으로 하나의 (단일) 면역글로불린 도메인이 아니라 경쇄 및 중쇄 가변 도메인과 같은 한 쌍의 (회합) 면역글로불린 도메인에 의해, 즉 각 항원의 에피토프에 공동으로 결합하는 면역글로불린 도메인의 V_H-V_L 쌍에 의해 일어나기 때문이다.

[0081] 대조적으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 추가의 면역글로불린 가변 도메인과의 쌍 형성 없이 항원의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 면역글로불린 단일 가변 도메인의 결합 부위는 단일 V_H, 단일 V_{HH}, 또는 단일 V_L 도메인에 의해 형성된다.

[0082] 따라서, 단일 가변 도메인은 단일 항원 결합 단위(즉, 기능적 항원 결합 단위를 형성하기 위해 단일 항원 결합 도메인이 다른 가변 도메인과 상호작용할 필요가 없도록, 본질적으로 단일 가변 도메인으로 이루어진 기능적 항원 결합 단위)를 형성할 수 있는 한 경쇄 가변 도메인 서열(예를 들어, V_L-서열) 또는 이의 적합한 단편; 또는 중쇄 가변 도메인 서열(예를 들어, V_H-서열 또는 V_{HH} 서열) 또는 이의 적합한 단편일 수 있다.

[0083] 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)은 예를 들어 중쇄 ISVD, 예컨대 V_H, V_{HH}(낙타화 V_H 또는 인간화 V_{HH}를 포함함)일 수 있다. 바람직하게는, 단일 가변 도메인(ISVD)은 낙타화 V_H 또는 인간화 V_{HH}를 포함하는 V_{HH}이다. 중쇄 ISVD는 통상적인 4쇄 항체 또는 중쇄 항체로부터 유래될 수 있다.

[0084] 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 단일 도메인 항체(또는 단일 도메인 항체로 사용하기에 적합한 아미노산 서열), "dAb" 또는 dAb(또는 dAb로 사용하기에 적합한 아미노산 서열); 기타 단일 가변 도메인, 또는 이들 중 어느 하나의 임의의 적합한 단편일 수 있다.

[0085] 특히, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 NANOBODY® 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 포함하는 V_{HH}) 또는 이의 적합한 단편일 수 있다. NANOBODY® 및 NANOBODIES®은 Ablynx N.V.의 등록 상표이다.

[0086] V_{HH}, V_{HH} 항체 단편, 및 V_{HH} 항체로도 알려져 있는 "V_{HH} 도메인"은 본래 "중쇄 항체"(즉, "경쇄가 결여된 항체")의 항원 결합 면역글로불린 가변 도메인으로 기술되었다(문헌[Hamers-Casterman et al. 1993, Nature 363: 446-448]). 용어 "V_{HH} 도메인"은, 통상적인 4쇄 항체에 존재하는 중쇄 가변 도메인(본원에서 "V_H 도메인"으로 언급됨) 및 통상적인 4쇄 항체에 존재하는 경쇄 가변 도메인(본원에서 "V_L 도메인"으로 언급됨)으로부터 이들 가변 도메인을 구분하기 위해 선택된 것이다. V_{HH}에 대한 추가 설명은 문헌[Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302)]의 리뷰 논문을 참조한다.

[0087] 일반적으로, 면역글로불린의 생성은 실험 동물의 면역화, 하이브리도마를 생성하기 위한 면역글로불린 생성 세포의 융합 및 원하는 특이성에 대한 스크리닝을 포함한다. 대안적으로, 면역글로불린은 나이브 또는 합성 라이브러리의 스크리닝에 의해, 예를 들어, 파지 디스플레이에 의해 생성될 수 있다.

[0088] 면역글로불린 서열의 생성은 다양한 공보에서 광범위하게 기술되었고, 그 중에서, WO 94/04678, 문헌[Hamers-Casterman et al. 1993] 및 문헌[Muyldermans et al. 2001]이 예시될 수 있다. 이러한 방법에서, 낙타과는 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 표적 항원으로 면역화된다. 상기 면역화로부터 수득된 VHH의 레퍼토리는 표적 항원에 결합하는 VHH에 대해 추가로 스크리닝된다.

[0089] 이러한 경우에, 면역글로불린의 생성은 면역화 및/또는 스크리닝을 위해 정제된 항원을 필요로 한다. 항원은 천연 공급원에서, 또는 재조합 생산 과정에서 정제될 수 있다.

[0090] 면역글로불린 서열에 대한 면역화 및/또는 스크리닝은 이러한 항원의 펩티드 단편을 사용하여 수행될 수 있다.

[0091] 본 기술은 마우스, 래트, 토끼, 당나귀, 인간 및 낙타과 면역글로불린 서열을 비롯한 상이한 기원의 면역글로불린 서열을 사용할 수 있다. 본 기술은 또한 완전한 인간, 인간화, 또는 키메라 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 기술은 낙타과 면역글로불린 서열 및 인간화 낙타과 면역글로불린 서열, 또는 낙타화 도메인 항체, 예를 들어, Ward 등에 기재된 낙타화 dAb를 포함한다(예를 들어 WO 94/04678 및 문헌[Davies and Riechmann (1994 and 1996)] 참조). 또한, 본 기술은 또한 융합된 면역글로불린 서열, 예를 들어, 다가 및/또는 다중특이성 작제물 형성(하나 이상의 V_{HH} 도메인을 함유하는 다가 및 다중특이성 폴리펩티드 및 이의 제조에 대해서는 문헌[Conrath

et al. 2001, J. Biol. Chem. 276 (10): 7346-7350] 및 예를 들어, WO 96/34103 및 WO 99/23221을 또한 참조) 및 태그 또는 기타 기능적 모이어티를 포함하는 면역글로불린 서열, 예를 들어, 본 기술의 면역글로불린 서열에서 유래할 수 있는 독소, 표지, 방사성 화학물질 등을 사용한다.

[0092] "인간화 V_{HH}"는 자연 발생 V_{HH} 도메인의 아미노산 서열에 상응하지만 "인간화"된, 즉 (위에 나타난 바와 같이) 상기 자연 발생 V_{HH} 서열의 아미노산 서열(특히 프레임워크 서열)에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 인간으로부터의 통상적인 4쇄 항체로부터의 V_H 도메인의 상응하는 위치(들)에 존재하는 아미노산 잔기 중 하나 이상에 의해 대체함으로써 인간화된 아미노산 서열을 포함한다. 이는 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 이는 예를 들어 본원의 추가 설명 및 선행 기술(예를 들어, WO 2008/020079)에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 즉, 이러한 인간화 V_{HH}는 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방식으로 수득될 수 있고, 따라서 자연 발생 VHH 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 출발 물질로서 사용하여 수득된 폴리펩티드에 엄격하게 제한되지 않는다는 점에 유의해야 한다.

[0093] "낙타화 V_H"는 자연 발생 V_H 도메인의 아미노산 서열에 상응하지만 "낙타화"된, 즉 통상적인 4쇄 항체로부터의 자연 발생 V_H 도메인의 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기를 중쇄 항체의 V_{HH} 도메인의 상응하는 위치(들)에 존재하는 아미노산 잔기 중 하나 이상에 의해 대체함으로써 낙타화된 아미노산 서열을 포함한다. 이는 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 이는 예를 들어 본원의 추가 설명 및 선행 기술(예를 들어, WO 2008/020079)에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 "낙타화" 치환은 바람직하게는, V_H-V_L 계면에서 형성하고/하거나 존재하는 아미노산 위치에, 및/또는 본원에 정의된 바와 같은 소위 Camelidae 홀마크(hallmark) 잔기에 삽입된다(예를 들어 WO 94/04678 및 Davies and Riechmann(1994 및 1996) 참조, 상기). 바람직하게는, 낙타화 V_H를 생성 또는 설계하기 위한 출발 물질 또는 출발점으로 사용되는 V_H 서열은 바람직하게는 포유동물로부터의 V_H 서열, 보다 바람직하게는 V_H3 서열과 같은 인간의 V_H 서열이다. 그러나 이러한 낙타화 V_H는 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방식으로 수득될 수 있고, 따라서 자연 발생 V_H 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 출발 물질로서 사용하여 수득된 폴리펩티드에 엄격하게 제한되지 않는다는 점에 유의해야 한다.

[0094] 면역글로불린 단일 가변 도메인 서열의 바람직한 구조는 당업계 및 본원에서 각각 "프레임워크 영역 1"("FR1"); "프레임워크 영역 2"("FR2"); "프레임워크 영역 3"("FR3"); 및 "프레임워크 영역 4"("FR4")로 지칭되는 4개의 프레임워크 영역("FR")을 포함하는 것으로 간주될 수 있고, 프레임워크 영역은 당업계 및 본원에서 각각 "상보성 결정 영역 1"("CDR1"); "상보성 결정 영역 2"("CDR2"); 및 "상보성 결정 영역 3"("CDR3")으로 지칭되는 3개의 상보성 결정 영역("CDR")에 의해 중단된다.

[0095] WO 08/020079의 58페이지 및 59페이지의 단락 q)에 추가로 기재된 바와 같이, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 잔기는 Riechmann and Muyldermans, 2000의 논문에서 낙타과의 VHH 도메인에 적용되는 바와 같이, 카바트 등이 제공한 V_H 도메인에 대한 일반 넘버링에 따라 넘버링될 수 있다 ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)(문헌[J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195]; 예를 들어 본 공보의 도 2 참조). V_H 도메인 및 V_{HH} 도메인에 대해 당업계에 잘 알려진 바와 같이 각각의 CDR에 있는 아미노산 잔기의 총 수는 다양할 수 있으며, 카바트 넘버링에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총 수와 일치하지 않을 수 있다(즉, 카바트 넘버링에 따른 하나 이상의 위치가 실제 서열에서 점유되지 않을 수 있거나, 실제 서열이 카바트 넘버링에 의해 허용되는 수보다 더 많은 아미노산 잔기를 포함할 수 있음). 이것은 일반적으로 카바트에 따른 넘버링이 실제 서열에서 아미노산 잔기의 실제 넘버링과 일치하거나 일치하지 않을 수 있음을 의미한다. V_H 도메인 및 V_{HH} 도메인에서 아미노산 잔기의 총 수는 일반적으로 110 내지 120, 종종 112 내지 115의 범위일 것이다. 그러나 더 작고 더 긴 서열이 또한 본 명세서에 기재된 목적에 적합할 수 있음을 주목해야 한다.

[0096] 본 출원에서, 달리 지시되지 않는 한, CDR 서열은 카바트에 따라 결정되었다(문헌[Martin 2010, *In*: Kontermann and Dübel (eds.), Antibody Engineering Vol. 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Chapter 3, pp. 33-51]). 이 방법에 따르면, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR1은 위치 1~30의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1은 위치 31~35의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR2는 위치 36~49의 아미노산을 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR2는 위치 50~65의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR3은 위치 66~94의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불

린 단일 가변 도메인의 CDR3은 위치 95~102의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR4는 위치 103~113의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0097] CDR 영역의 결정은 또한 상이한 방법에 따라 수행될 수 있다. 본 출원에서, CDR 서열은 또한 다음의 문헌에 기재된 바와 같은 AbM 정의에 따라 결정되었다(문헌[Martin 2010 (*In:* Kontermann and Dübel (Eds.) 2010, Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Chapter 3, pp. 33-51]). 본 방법에 따르면, FR1은 위치 1-25의 아미노산 잔기를 포함하고, CDR1은 위치 26-35의 아미노산 잔기를 포함하고, FR2는 위치 36-49의 아미노산 잔기를 포함하고, CDR2는 위치 50-58의 아미노산 잔기를 포함하고, FR3은 위치 59-94의 아미노산 잔기를 포함하고, CDR3은 위치 95-102의 아미노산 잔기를 포함하고, FR4는 위치 103-113의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0098] 이러한 면역글로불린 서열에서, 프레임워크 서열은 임의의 적합한 프레임워크 서열일 수 있고, 적합한 프레임워크 서열의 예는 예를 들어 표준 핸드북 및 추가 개시내용 및 본원에 언급된 선행 기술에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다.

[0099] 프레임워크 서열은 바람직하게는 (예를 들어, 인간화 또는 낙타화에 의해) 면역글로불린 프레임워크 서열로부터 유래된 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 프레임워크 서열(의 적합한 조합)이다. 예를 들어, 프레임워크 서열은 경쇄 가변 도메인(예를 들어, V_L-서열) 및/또는 중쇄 가변 도메인(예를 들어, V_H-서열 또는 V_{HH} 서열)으로부터 유래된 프레임워크 서열일 수 있다. 특히 바람직한 일 양태에서, 프레임워크 서열은 V_{HH}-서열로부터 유래된 프레임워크 서열(여기서 상기 프레임워크 서열은 선택적으로 부분적으로 또는 완전히 인간화될 수 있음)이거나 낙타화된 통상적인 V_H 서열(본원에 정의된 바와 같음)이다.

[0100] 특히, 본 기술에 사용된 ISVD 서열에 존재하는 프레임워크 서열은 (본원에 정의된 바와 같은) 홀마크 잔기 중 하나 이상을 함유할 수 있으며, 따라서, ISVD 서열은 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 비롯한 V_{HH}이다. 이러한 프레임워크 서열(의 적합한 조합)의 일부 바람직하지만 비제한적인 예는 본원의 추가 개시내용으로부터 명백해질 것이다.

[0101] 다시, 면역글로불린 서열에 대해 본원에 일반적으로 기재된 바와 같이, 하나 이상의 프레임워크 서열(예를 들어, 이들 CDR 및 프레임워크 서열과 동일한 순서로 단편이 유래된 전체 크기 면역글로불린 서열에서 발생할 수 있음)에 의해 적합하게 플랭킹되고/되거나 이를 통해 연결된 하나 이상의 CDR 서열을 함유하는 단편과 같은, 임의의 전술한 것의 적합한 단편(또는 단편의 조합)을 사용하는 것도 가능하다.

[0102] 그러나 본 기술은 ISVD 서열(또는 이를 발현하는 데 사용된 뉴클레오티드 서열)의 기원이나 ISVD 서열 또는 뉴클레오티드 서열이 생성되거나 수득되는(또는 생성되었거나 수득된) 방식에 한정되지 않음을 유의해야 한다. 따라서, ISVD 서열은 (임의의 적합한 종으로부터) 자연 발생 서열 또는 합성 또는 반합성 서열일 수 있다. 특정, 그러나 비제한적인 양태에서, ISVD 서열은 (임의의 적합한 종으로부터의) 자연 발생 서열 또는 합성 또는 반합성 서열이고, 이는 (본원에 정의된 바와 같은) "인간화" 면역글로불린 서열(예를 들어, 부분 또는 완전 인간화된 마우스 또는 토끼 면역글로불린 서열, 특히 부분 또는 완전 인간화 V_{HH} 서열), (본원에 정의된 바와 같은) "낙타화" 면역글로불린 서열뿐만 아니라, 친화도 성숙(예를 들어, 합성, 무작위 또는 자연 발생 면역글로불린 서열로부터 시작), CDR 그래프팅(grafting), 베니어링(veneering), 상이한 면역글로불린 서열로부터 유래된 단편 조합, 중첩 프라이머를 사용한 PCR 어셈블리 및 당업자에게 잘 알려진 면역글로불린 서열을 조작하기 위한 유사한 기술; 또는 임의의 전술한 것의 임의의 적합한 조합과 같은 기술에 의해 수득한 면역글로불린 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0103] 마찬가지로, 뉴클레오티드 서열은 자연 발생 뉴클레오티드 서열 또는 합성 또는 반합성 서열일 수 있고, 예를 들어 적합한 자연 발생 주형(예를 들어, 세포로부터 단리된 DNA 또는 RNA)으로부터 PCR에 의해 단리된 서열, 라이브러리(특히, 발현 라이브러리)로부터 단리된 뉴클레오티드 서열, (미스매치 PCR과 같이 그 자체로 알려진 임의의 적합한 기술을 사용하여) 자연 발생 뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 도입함으로써 제조된 뉴클레오티드 서열, 중첩 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 제조된 뉴클레오티드 서열, 또는 그 자체로 알려진 DNA 합성 기술을 사용하여 제조된 뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0104] 전술한 바와 같이, ISVD는 ISVD 또는 이의 적합한 단편일 수 있다. ISVD에 대한 일반적인 설명은 아래의 추가 설명 및 본원에서 인용된 선행 기술을 참고한다. 그러나 이와 관련하여, 본 명세서와 선행 기술은 소위 "V_H3 부

류"의 ISVD(즉, V_H3 부류의 인간 생식선 서열과 높은 정도의 서열 상동성을 갖는 ISVD, 예컨대, DP-47, DP-51 또는 DP-29)를 주로 설명하였음에 유의해야 한다. 그러나 가장 넓은 의미에서, 본 기술은 일반적으로 임의의 유형의 ISVD를 사용할 수 있으며, 예를 들어 WO 2007/118670에 기재된 바와 같은, 예를 들어 소위 "V_H4 부류"에 속하는 ISVD(즉, V_H4 부류의 인간 생식선 서열과 높은 정도의 서열 상동성을 갖는 ISVD, 예컨대, DP-78)도 사용함에 유의해야 한다.

[0105] 일반적으로 ISVD(특히 (부분) 인간화 V_{HH} 서열 및 낙타화 V_{HH} 서열을 포함하는 V_{HH} 서열)는 (다시 본원에서 추가로 설명되는 바와 같이) 하나 이상의 프레임워크 서열의 하나 이상의 (본원에 기재된 바와 같은) "홀마크 잔기"의 존재를 특징으로 할 수 있다. 따라서, 일반적으로, ISVD는 다음과 같은 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열로 정의될 수 있다:

[0106] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0107] 여기서 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내고, 여기서 홀마크 잔기 중 하나 이상은 본원에 추가로 정의된 바와 같다.

[0108] 특히, ISVD는 다음과 같은 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열일 수 있다:

[0109] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0110] 여기서 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내고, 여기서 프레임워크 서열은 본원에 추가로 정의된 바와 같다.

[0111] 보다 구체적으로, ISVD는 다음과 같은 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열일 수 있다:

[0112] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0113] 여기서 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내며, 여기서:

[0114] 카바트 넘버링에 따른 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108에서의 아미노산 잔기 중 하나 이상은 하기 표 A-0에 언급된 홀마크 잔기로부터 선택된다.

[0115] [표 A-0] ISVD에서의 홀마크 잔기

위치	인간 V_H3	홀마크 잔기
11	L, V; 주로 L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 바람직하게는 L
37	V, I, F; 일반적으로 V	$F^{(1)}$, Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 바람직하게는 $F^{(1)}$ 또는 Y
$44^{(8)}$	G	$E^{(3)}$, $Q^{(3)}$, $G^{(2)}$, D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 바람직하게는 $G^{(2)}$, $E^{(3)}$, 또는 $Q^{(3)}$;가장 바람직하게는 $G^{(2)}$ 또는 $Q^{(3)}$.
$45^{(8)}$	L	$L^{(2)}$, $R^{(3)}$, P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 바람직하게는 $L^{(2)}$ 또는 $R^{(3)}$
$47^{(8)}$	W, Y	$F^{(1)}$, $L^{(1)}$, 또는 $W^{(2)}$ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 바람직하게는 $W^{(2)}$, $L^{(1)}$, 또는 $F^{(1)}$
83	R 또는 K; 일반적으로 R	R, $K^{(5)}$, T, $E^{(5)}$, Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 바람직하게는 K 또는 R; 가장 바람직하게는 K
84	A, T, D; 주로 A	$P^{(5)}$, S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 바람직하게는 P
103	W	$W^{(4)}$, $R^{(6)}$, G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, $P^{(6)}$, E, C; 바람직하게는 W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; 바람직하게는 G
108	L, M, 또는 T; 주로 L	Q, $L^{(7)}$, R, P, E, K, S, T, M, A, H; 바람직하게는 Q 또는 $L^{(7)}$

주의:

(1) 전부 그런 것은 아니나 특히, 위치 43~46 에서 KERE 또는 KQRE 와 조합됨.

(2) 일반적으로 위치 44~47 에서의 GLEW 와 같음.

(3) 일반적으로 위치 43~46 에서의 KERE 또는 KQRE, 예를 들어 위치 43~47 에서의 KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW 또는 KQREG 와 같음. 대안적으로, TERE(예를 들어,

[0116]

TEREL), TQRE(예를 들어 TQREL), KECE(예를 들어 KECEL 또는 KECER), KQCE(예를 들어 KQCEL), RERE(예를 들어 REREG), RQRE(예를 들어 RQREL, RQREF 또는 RQREW), QERE(예를 들어 QEREG), QQRE(예를 들어 QQREW, QQREL 또는 QQREF), KGRE(예를 들어 KGREG), KDRE(예를 들어 KDREV)와 같은 서열도 가능함. 일부 다른 가능하지만 덜 바람직한 서열에는 예를 들어 DECKL 및 NVCEL 이 포함됨.

(4) 위치 44~47 에 GLEW 가 있고 위치 43~46 에 KERE 또는 KQRE 가 있음.

(5) 종종 자연 발생 V_{HH} 도메인의 위치 83~84 에 KP 또는 EP 가 있음.

(6) 전부 그런 것은 아니나 특히, 위치 44~47 에서 GLEW 와 조합됨.

(7) 단, 위치 44~47 이 GLEW 인 경우, 위치 108 은 103 의 W 도 포함하는 (비-인간화) V_{HH} 서열에서 항상 Q 임.

(8) GLEW 군은 또한 위치 44~47 의 GLEW 유사 서열, 예를 들어 GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER 및 ELEW 를 포함.

[0117]

[0118] 본 기술은 특히 TCR의 불변 도메인에 결합할 수 있는 ISVD를 사용한다. 본 기술의 맥락에서, 특정 표적 분자에 "결합"하는 것은 항체 및 이들의 각각의 항원의 맥락에서 이해되는 바와 같이 당업계에서 통상적인 의미를 갖는다.

[0119] 따라서 본 기술에 사용되는 ISVD의 표적 분자는 TCR의 불변 도메인이다.

[0120] TCR에 대한 결합은 예를 들어 TCR알파 서브유닛 및/또는 TCR베타 서브유닛에 결합함으로써 달성될 수 있다. 한 예로는 포유동물 TCR이다. 인간 TCR이 바람직하지만, 다른 종으로부터의 버전, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 말, 돼지, 사이노몰구스 원숭이(본원에서 "사이노"로도 지칭됨)와 같은 비인간 영장류, 또는 라마 또는 알파카와 같은 낙타과로부터의 TCR이 본 기술에 적합하다.

[0121] 인간 및 사이노 기원의 TCR-α/β 불변 도메인의 서열은 표 A-1에 제공되어 있다(각각 인간 및 사이노 기원으로부터의 TCR α의 불변 도메인의 경우 서열 번호 106 및 108; 각각 인간 및 사이노 기원으로부터의 TCR β의 불변 도메인의 경우 서열 번호 107 및 109). UniProt 또는 Genbank 파일 식별자로 표현되는 이러한 각 서열의 기원은 표 A-1에 상기 언급한 각 서열에 대해 열거되어 있다. 인하우스 시퀀싱은 원래 레서스 기원에서 유래된 아미노산 서열이 사이노 기원에서 유래된 아미노산 서열과 동일함을 확인했다.

[0122] 일 실시형태에서, ISVD는 인간 T 세포 수용체 α(TCR-α)(서열 번호 106)의 불변 도메인 및/또는 인간 T 세포 수용체 β(TCR-β)(서열 번호 107)의 불변 도메인, 또는 이의 다형성 변이체 또는 이소형에 특이적으로 결합한다.

[0123] 일 실시형태에서, ISVD는 인간 및 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합한다. 일 실시형태에서, 비인간 영장류 TCR은 마카크 또는 레서스 TCR이다. 일 실시형태에서, 마카크 또는 레서스 TCR은 서열 번호 108의 TCR-α의 불변 도메인 및/또는 서열 번호 109의 TCR-β의 불변 도메인, 또는 이의 다형성 변이체 또는 이소형을 포함한다.

[0124] 이소형은 모두 당업계에 공지된 바와 같은 대안적 프로모터 사용, 대안적 스플라이싱, 대안적 개시 및 리보솜 프레임시프트와 같은 단일 생물학적 사건 또는 생물학적 사건의 조합에 의해 동일한 유전자로부터 생성될 수 있는 대안적 단백질 서열이다.

[0125] [표 A-1] TCR과 관련된 아미노산 서열 ("ID"는 본원에서 사용되는 주어진 서열 번호를 나타냄)

ID	명칭	아미노산 서열
106	인간 TCR 알파 불변 도메인 (P01848로부터 유래됨)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRL WSS
107	인간 TCR 베타 불변 도메인 (P01850으로부터 유래됨)	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
108	레서스 TCR 알파 (AEA41863)	MLLLLVLVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVSVSEGVPVLLRCNYSSS FSPYLFWYVQYPNQGLQLLLKYTSGTTLVKGINGFEAEFKKSETSFH LTKASAHVSDAAEYFCALARGALVFGKGTRLSVIPNIQNPDPAVYQ LRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSM

[0126]

		DFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPGTESVCDANLV EKSFETDMNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
109	레서스 TCR 베타 (AEA41864)	MGFWTLCCVSFCILVAKHTDAGVIQLPRHEVTEMGKEVTLRCEPIS GHSSLFWYRQTMMRGLEFLIYFNNKSPIDDSGMPKDRFSATMPD ASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASTPGQGREKLFFGSGTQLSVLEDLK KVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYCLSSRLRVSATFWHNPRNHF RCQVQFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEVWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALMLMAMVKRKDF
110	인간 TCR-지퍼: 알파 사슬	MNMRPVTSSVLVLLLMLRRSNGQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCN SSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARK DSSLHITAAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKSVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCSSA DLVPRGSTTAPSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQK LISEEDL
111	인간 TCR-지퍼: 베타 사슬	MSNTVLADSAWGITLLSWVTVFLLGTSSADGGITQSPKYLFRKEG QNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDI AEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGT RLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYSLSSRLRVSATF WQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR ADCSSADLVPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKEL AQTGHHHHHHHHHH
112	사이노 TCR-지퍼: 알파 사슬 (AEA41865로부터 유래됨)	MLLITSVLVLWMQLSQVNGQQIMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSS TTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVKSGEVKKQKRLIFQFGEAKKNS SLHITATQTTDVGTYFCATTGVNNLFFGTGTRLTVLPYIQNPDPAV YQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRS MDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSCSSADL

[0127]

		VPRGSTTAPSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQKLISEEDL
113	사이노 TCR-지퍼: 베타 사슬 (AEA41866 및 AEA41868로부터 유래됨)	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHDYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGSTEKGEVPDGYNVTRSNTEDFPLRLESAAPSQTSVYFCASSYWTGRSYEQYFGPGTRLTVIEDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADCSSADLVPRGSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQTGHHHHHHHHH
114	인간 TCR 알파 불변 도메인 (P01848로부터 유래됨)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC
115	인간 TCR 베타 불변 도메인 (P01850으로부터 유래됨)	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC
116	사이노몰구스 TCR-알파 불변 도메인 (AEA41865로부터 유래됨)	PYIQNPDPAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSC
117	사이노몰구스 TCR-베타 불변 도메인 (AEA41868로부터 유래됨)	EDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADC

[0128]

[0129] 따라서, 제1 양태에서 본 기술은 T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 ISVD에 관한 것으로, 상기 ISVD는 본질적으로 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

[0130] a. CDR1의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 INFYG(서열 번호 79)이고;

[0131] b. CDR2의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 HISIGDQTDYAX_1SAKG(서열 번호 80)이고;

[0132] c. CDR3의 아미노산 서열(카바트에 따름)은 LSRIX_2PYDY(서열 번호 81)이고;

[0133] 여기서,

[0134] - 아미노산 잔기 X_1은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택되고/되거나;

[0135] - 아미노산 잔기 X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택된다.

[0136] ISVD 서열은 또한 다음과 같이 CDR에 대한 AbM 정의를 사용하여 표시될 수 있다. ISVD는 T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하며, 상기 ISVD는 본질적으로 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

[0137] a. CDR1의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 GYVHKINFYG(서열 번호 82)이고;

[0138] b. CDR2의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 HISIGDQTD(서열 번호 83)이고;

[0139] c. CDR3의 아미노산 서열(AbM에 따름)은 LSRIX_2PYDY(서열 번호 84)이고;

[0140] 여기서,

[0141] - 위치 61의 아미노산 잔기(카바트에 따름)는 E, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로부터 선택되고/되거나;

[0142] - 아미노산 잔기 X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로부터 선택된다.

[0143] 본 발명자들은 본 기술에 따른 CDR을 갖는 ISVD가 강력한 TCR 결합 능력을 갖고, 관련 위치 61 및 99(카바트 넘버링)에서 각각 이성질체화 또는 트립토판 산화를 갖지 않는다는 것을 발견하였다. 이는 해당 분자가 T 세포에 관여하는 데 효과적일 뿐만 아니라 화학적으로 안정하다는 것을 의미한다.

[0144] 본 기술의 일 실시형태에서, 인간 TCR에 특이적으로 결합하는 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 85% 초과, 예컨대 90% 초과, 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타낼 수 있으며, 여기서 CDR은 본원에 정의된 바와 같다.

[0145] 추가 실시형태에서, 인간 TCR에 특이적으로 결합하는 ISVD의 아미노산 서열은 85% 초과, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 상기 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52, 예컨대 서열 번호 37 또는 서열 번호 42를 포함한다.

[0146] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 인간 TCR에 특이적으로 결합하는 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 85% 초과, 예컨대 90% 초과, 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타낼 수 있으며, 여기서 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 목적으로, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시된다.

[0147] 추가 실시형태에서, 인간 TCR에 특이적으로 결합하는 ISVD의 아미노산 서열은 85% 초과, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 나타낼 수 있으며, 여기서 서열 동일성 정도를 결정하기 위해, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시된다. 바람직하게는, 상기 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52, 예컨대 서열 번호 37 또는 서열 번호 42를 포함한다.

[0148] ISVD가 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 85% 초과, 예컨대 90% 초과, 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타내는 경우, ISVD는 표 A-4에 기재된 ISVD 중 하나와 비교하여 인간 TCR에 대해 바람직하게는 적어도 절반의 결합 친화도, 더욱 바람직하게는 적어도 동일한 결합 친화도를 나타내며, 여기서, 결합 친화도는 동일한 방법, 예컨대 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 측정된다.

[0149] 추가로, ISVD가 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 85% 초과, 예를 들어 90% 초과, 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타내는 경우, ISVD는 표 A-4에 기재된 ISVD 중 하나와 비교하여 적어도 절반의 T 세포 매개 표적 세포 살해 효력, 보다 바람직하게는 적어도 동일한 T 세포 매개 표적 세포 살해 효력을 나타내며, 여기서 T 세포 매개 표적 세포 살해는 동일한 방법, 예컨대 유세포 분석 기반 T 세포 매개 세포 살해 분석 또는 임피던스 기반 T 세포 매개 살해 분석을 사용하여 측정된다.

[0150] 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열 사이의 "*서열 동일성*"의 백분율은 [*제2 아미노산 서열의 상응하는 위치에서의 아미노산 잔기와 동일한 제1 아미노산 서열의 아미노산 잔기의 수*]를 [*제1 아미노산 서열의 아미노산 잔기의 총 수*]로 나누고 [*100%*]를 곱하여 계산할 수 있으며, - 제1 아미노산 서열과 비교하여 - 제2 아미노산 서열의 아미노산 잔기의 각 결실, 삽입, 치환 또는 부가는 단일 아미노산 잔기(즉, 단일 위치)에서의 차이로 간주된다.

[0151] 통상적으로, 본원의 위에서 개략적으로 설명된 계산 방법에 따라 2개의 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성"의 백분율을 결정하기 위하여, 가장 많은 수의 아미노산 잔기를 가진 아미노산 서열을 "제1" 아미노산 서열로 취할 것이고, 다른 아미노산 서열을 "제2" 아미노산 서열로 취할 것이다.

[0152] 본원에서 사용되는 "아미노산 차이"는 기준 서열과 비교하여 단일 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 또는 치환을 지칭하고, 바람직하게는 치환이다.

[0153] 본 기술의 일 실시형태에서, 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 이러한 보존적 치환은 바람직하게는 다음의 군 (a) 내지 (e) 내의 하나의 아미노산이 동일한 군의 또 다른 아미노산 잔기로 대체되는 치환이다: (a) 작은 지방족의, 비극성 또는 약한 극성의 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro, 및 Gly; (b) 극성의, 음으로 하전된 잔기 및 이들의 (하전되지 않은) 아미드: Asp, Asn, Glu, 및 Gln; (c) 극성의, 양으로 하전된 잔기: His, Arg, 및 Lys; (d) 큰 지방족의, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val, 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr, 및 Trp.

[0154] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 보존적 치환은 다음과 같다: Ala에서 Gly 또는 Ser으로; Arg에서 Lys으로; Asn에서 Gln 또는 His으로; Asp에서 Glu으로; Cys에서 Ser으로; Gln에서 Asn으로; Glu에서 Asp으로; Gly에서 Ala 또는 Pro으로; His에서 Asn 또는 Gln로; Ile에서 Leu 또는 Val으로; Leu에서 Ile 또는 Val로; Lys에서 Arg, Gln 또는 Glu으로; Met에서 Leu, Tyr 또는 Ile으로; Phe에서 Met, Leu 또는 Tyr으로; Ser에서 Thr으로; Thr에서 Ser으로; Trp에서 Tyr으로; Tyr에서 Trp으로; 및/또는 Phe에서 Val, Ile 또는 Leu으로 치환됨.

[0155] 본 기술의 일 실시형태에서, ISVD의 전체 아미노산 서열은 서열 번호 85로 표시되며, 이는

[0156] X_0VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAX_1SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRI X_2PYDYX_3GQGTLVTVSS이고, 여기서

[0157] a. X_0은 E 및 D로부터 선택되고;

[0158] b. X_1은 E, D, N, P, K, R, I, T, H, V, A, Y, L, Q, F, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0159] c. X_2는 Y, A, P, D, Q, E, R, F, S, G, T, H, V, K, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0160] d. X_3은 W, R, A, E, Y, L, H, I, Q, V, K, S, G, P, F 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0161] 본 기술의 일 실시형태에서, X_0은 D이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 Y, T, S 또는 Q 중 임의의 것이고/이거나 X_3은 W이다.

[0162] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, X_0은 E이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 Y, T, S 또는 Q 중 임의의 것이고/이거나 X_3은 W이다.

[0163] 본 기술의 일 실시형태에서, X_0은 E이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 T이고/이거나 X_3은 W이다.

[0164] 본 기술의 추가 실시형태에서, X_0은 D이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 T이고/이거나 X_3은 W이다.

[0165] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, X_0은 E이고/이거나 X_1은 E이고/이거나, X_2는 S이고/이거나, X_3은 W이다.

[0166] 본 기술의 일 실시형태에서, X_0은 D이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 S이고/이거나 X_3은 W이다.

[0167] 본 기술의 일 실시형태에서, X_0은 E이고/이거나 X_1은 E이고/이거나, X_2는 Q이고/이거나, X_3은 W이다.

[0168] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, X_0은 D이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 Q이고/이거나 X_3은 W이다.

[0169] 본 기술의 추가 실시형태에서, X_0은 E이고/이거나 X_1은 E이고/이거나, X_2는 Y이고/이거나, X_3은 W이다.

[0170] 본 기술의 일 실시형태에서, X_0은 D이고/이거나 X_1은 E이고/이거나 X_2는 Y이고/이거나 X_3은 W이다.

[0171] 본 발명자들은 서열의 제1 위치(카바트 넘버링)에 있는 아미노산을 E에서 D로 치환하면 피로글루타메이트 형성을 방지할 수 있는 반면 ISVD의 효능은 영향을 받지 않는다는 것을 발견하였다.

[0172] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 본 기술에 따른 ISVD는 서열 번호 37, 42, 46, 50 및 52 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는다.

[0173] 본 기술의 추가 실시형태에서, ISVD는 서열 번호 37 또는 서열 번호 42의 아미노산 서열을 갖는다.

[0174] 본 발명자들은 위치 61에 E가 있고 위치 99에 Y, A, S 또는 H가 있는(카바트 넘버링) 본 기술에 따른 ISVD가 기준 ISVD TO17000700과 비교하여 유사하거나 더 높은 용융 온도(Tm), 더 높은 응집 개시 온도(Tagg) 및 올리고머 분율 감소를 가짐을 관찰하였다. 61번 위치에 E가 있고 99번 위치에 Q 또는 T가 있는 ISVD의 경우(카바트 넘버

링), 더 높은 Tagg 및 유사하거나 감소된 올리고머 분율(Δ% 올리고)을 유지하거나 가지면서 Tm의 유의한 감소가 없었다.

[0175] 이와 같이, 일 실시형태에서, 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 90% 초과, 예컨대 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타내는 본 기술에 따른 ISVD는 적어도 71℃, 적어도 72℃, 바람직하게는 적어도 72.5℃, 더욱 바람직하게는 적어도 73℃의 용융 온도(Tm)를 갖는다.

[0176] 또 다른 실시형태에서, 본 기술에 따른 ISVD 또는 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 90% 초과, 예컨대 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타내는 ISVD는 적어도 67℃, 적어도 68℃, 적어도 69℃, 적어도 71℃, 바람직하게는 적어도 72℃, 더욱 바람직하게는 적어도 73℃의 응집 개시 온도(Tagg)를 갖는다.

[0177] 또 다른 추가 실시형태에서, 본 기술에 따른 ISVD 또는 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것과 90% 초과, 예컨대 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 나타내는 ISVD는 0.5% 미만, 바람직하게는 0.4% 미만, 더욱 바람직하게는 0.3% 미만, 훨씬 더 바람직하게는 0.2% 미만, 또는 심지어 0.1% 미만의 올리고머화 분율(Δ% 올리고)을 갖는다.

[0178] 생성된 ISVD의 목록은 표 A-4에서 찾을 수 있다. 또한, 생성된 ISVD의 CDR 서열의 조합은 표 A-5에서 찾을 수 있다.

[0179] 본 기술의 일 실시형태에서, TCE ISVD는 표 A-5에 제시된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열로부터 선택되는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 갖는다.

[0180] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, TCE ISVD는 표 A-5의 동일한 행에 제시된 CDR 서열의 조합으로부터 선택되는 CDR1, CRD2 및 CDR3 서열을 갖는다.

[0181] **5.2 다중특이성 폴리펩티드**

[0182] 본 발명자들은 ISVD T0170056G05 (WO 2016180969에 서열 번호 50으로 개시됨)의 CDR에 특정 아미노산 돌연변이 및 이들의 조합을 도입시키는 것이 인간 TCR 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 대한 개선된 결합을 초래함을 밝혀냈다. ISVD의 서열 내의 특정 위치에서의 추가 아미노산 돌연변이는 이성질체화 및 트립토판 산화를 최소화하거나 또는 심지어 방지함으로써 ISVD의 화학적 안정성을 추가로 개선할 수 있다.

[0183] 따라서, 본 기술의 양태에서, T 세포 상에 존재하는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 ISVD 및 표적 세포 상의 제1 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함하는 폴리펩티드가 제공되며, 여기서, 상기 제1 항원은 상기 TCR과 상이하고, 상기 표적 세포는 상기 T 세포와 상이하며, 상기 제1 및 제2 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어지고, 제1 ISVD는 본 기술에 따른 ISVD이다.

[0184] 이 다중특이성 폴리펩티드에서, CDR 영역은 본원에 정의된 바와 같다(항목 5.1 참조). 본 발명자들은 본 기술에 따른 CDR을 갖는 제1 ISVD를 포함하는 폴리펩티드가 강력한 TCR 결합 능력을 갖고, 관련 위치 61 및 99(카바트 넘버링)에서 각각 이성질체화 또는 트립토판 산화를 갖지 않는다는 것을 발견하였다.

[0185] 일 실시형태에서, 제1 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지며, 여기서 CDR 영역의 서열은 본원에 정의된 바와 같고, 바람직하게는 제1 ISVD의 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함한다.

[0186] 일 실시형태에서, 제1 ISVD의 아미노산 서열은 서열 번호 2 내지 57 중 임의의 것의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지며, 여기서 서열 동일성 정도를 결정하기 위해, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바람직하게는 제1 ISVD의 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함한다.

[0187] 또 다른 실시형태에서, 제1 ISVD는 서열 번호 32, 33 및/또는 35 내지 57 중 임의의 것의 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지며, 여기서 CDR 영역의 서열은 본원에 정의된 바와 같고, 바람직하게는 이 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함한다.

[0188] 또 다른 실시형태에서, 제1 ISVD는 서열 번호 32, 33 및/또는 35 내지 57 중 임의의 것과 적어도 80%, 바람직하

게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 가지며, 여기서 서열 동일성 정도를 결정하기 위해, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고, 바람직하게는 이 서열은 서열 번호 37, 서열 번호 42, 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함한다.

[0189] 추가 실시형태에서, 제1 ISVD는 서열 번호 37 또는 서열 번호 42를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0190] 또 다른 실시형태에서, 제1 ISVD는 서열 번호 46, 서열 번호 50 또는 서열 번호 52를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0191] 본원에 추가로 제공된 실시예에 나타낸 바와 같이, T017000700(서열 번호 1)의 위치 61 및 99에서의 특정 아미노산 잔기의 치환은 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 대한 ISVD의 친화도에 영향을 미치지 않았지만, 생성된 변이체는 이전에 개발된 T017000700(서열 번호 1)과 비교하여 더 양호한 화학적 안정성을 가졌다. T017000978(서열 번호 37) 및 T017000991(서열 번호 42)은 특히 강력하고 안정적인 것으로 밝혀졌다. 또한, T017000995(서열 번호 46), T017000999(서열 번호 50) 및 T017001001(서열 번호 52)은 TCR에 대해 더 낮은 친화도를 나타냈지만 세포 살해에서 높은 효력을 유지하였으며, 이는 이들이 더 양호한 생체분포를 가질 수 있고, 따라서 더욱 표적-특이적인 효과를 가질 가능성이 있음을 시사한다.

[0192] 본 기술의 일 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 이중특이성이지만, 또한 예를 들어 삼중특이성, 사중특이성, 오중특이성 등일 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 적어도 2가이지만, 예를 들어 3가, 4가, 5가, 6가 등일 수도 있다.

[0193] 용어들 "*이중특이성*", "*삼중특이성*", "*사중특이성*", "*오중특이성*", 등은 모두 용어 "*다중특이성*"에 해당하며, 각각 2, 3, 4, 5개 등의 다른 표적 분자들에 대한 결합을 나타낸다.

[0194] 용어들 "*2가*", "*3가*", "*4가*", "*5가*", "*6가*" 등은 모두 용어 "*다가*"에 해당하며, ISVD와 같이 각각 2, 3, 4, 5, 6개 등의 결합 단위/빌딩 블록의 존재를 나타낸다.

[0195] 예를 들어, 폴리펩티드는 2개의 ISVD를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드와 같은 이중특이성-2가일 수 있으며, 여기서 하나의 ISVD는 T 세포 상의 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합하고, 하나의 ISVD는 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합하며, TCR 및 표적 항원은 바람직하게는 인간이다.

[0196] 폴리펩티드는 또한 3개의 ISVD를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드와 같은 이중특이성-3가일 수 있으며, 여기서 2개의 ISVD는 동일한 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합하고 하나의 ISVD는 T 세포 상의 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합한다.

[0197] 폴리펩티드는 또한 3개의 ISVD를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드와 같은 이중특이성-3가일 수 있으며, 여기서 2개의 ISVD는 동일한 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합하고 하나의 ISVD는 T 세포 상의 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합한다.

[0198] 또다른 예에서, T 세포 상의 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 하나의 ISVD 및 표적 세포 상의 제1 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 ISVD 다음의, 삼중특이성-3가 폴리펩티드는 인간 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 하나의 ISVD를 포함한다.

[0199] 다중특이성-다가 폴리펩티드의 추가 예는 본원의 개시내용에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다.

[0200] 이러한 폴리펩티드는 예를 들어 2개의 ISVD가 표적 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 경우 동시에 이중파라토프성(biparatopic)일 수 있다.

[0201] 용어 "이중파라토프성"은 동일한 표적 분자의 2개의 상이한 부분(예를 들어 에피토프)에 대한 결합을 지칭한다.

[0202] 본원에 기술된 상기 다중특이성-다가 폴리펩티드의 성분, 바람직하게는 ISVD는 펩티드 링커와 같은 하나 이상의 적합한 링커에 의해 서로 연결될 수 있다.

[0203] 2개 이상의 (폴리)펩티드를 연결하기 위한 링커의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0204] 펩티드 링커의 자주 사용되는 부류 중 하나는 "Gly-Ser" 또는 "GS" 링커로 알려져 있다. 이들은 본질적으로 글리신(G) 및 세린(S) 잔기로 이루어지고, 일반적으로 GGGGS(서열 번호 86) 모티프와 같은 펩티드 모티프의 하나 이상의 반복부를 포함하는 링커이다(예를 들어, 식 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$(식 중, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상일 수 있음)을 나타냄). 이러한 GS 링커의 일부 자주 사용되는 예는 9GS 링커(GGGGSGGGS, 서열 번

호 87), 15GS 링커(n=3), 및 35GS 링커(n=7)이다. 예를 들어 문헌[Chen et al. 2013 (Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10): 1357-1369)] 및 문헌[Klein et al. 2014 (Protein Eng. Des. Sel. 27 (10): 325-330)]을 참조한다. 본원에 개시된 폴리펩티드에서, 폴리펩티드의 성분을 서로 연결하기 위해 5GS 및 9GS 링커를 사용하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 10개 미만의 아미노산의 링커가 TCR에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 ISVD를 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 ISVD에 연결하기 위해 사용된다.

[0205] 적합한 링커의 예는 하기 표 A-2에 제공되어 있다.

[0206] **[표 A-2] 링커 서열 ("ID"는 본원에서 사용되는 서열 번호를 지칭함)**

명칭	ID	아미노산 서열
3A 링커	136	AAA
5GS 링커	86	GGGGS
7GS 링커	137	SGGSGGS
8GS 링커	138	GGGGSGGS
9GS 링커	87	GGGGSGGGS
10GS 링커	139	GGGGSGGGGS
15GS 링커	140	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS 링커	141	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS 링커	142	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS 링커	143	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS 링커	144	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS 링커	145	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS 링커	146	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
G1 힌지	147	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1 힌지	148	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
라마 상부 긴 힌지 영역	149	EPKTPKPQPAAA
G3 힌지	150	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

[0207]

[0208] 따라서, 일 실시형태에서, 폴리펩티드는 본 기술에 따른 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 ISVD 및 5GS 및/또는 9GS 링커에 의해 연결된 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함한다.

[0209] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 본 기술에 따른 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 ISVD 및 9GS 링커에 의해 연결된 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 ISVD를 포함한다.

[0210] 본 발명자들은 이러한 구성이 T 세포-매개 세포독성 반응을 유발하는 폴리펩티드의 효율을 증가시킬 수 있다는 놀라운 발견을 하였다.

[0211] 표적 세포 상의 ISVD 결합 TCR 및 ISVD 결합 제1 항원이 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드에서 임의의 순서로 위치될 수 있다는 것이 이해될 것이다(실시예 섹션에서도 입증됨).

[0212] 따라서, 폴리펩티드가 폴리펩티드의 N 말단에서 시작하는 순서로 다음을 포함하거나 이로 이루어진 것은 본 기술의 일 실시형태이다: TCR에 특이적으로 결합하는 제1 ISVD, 세포-표면 특이적 표적 항원에 특이적으로 결합하는 제2 ISVD, 및 본원에 정의된 바와 같은 증가된 반감기를 갖는 폴리펩티드를 제공하는 선택적 결합 단위. 일 실시형태에서, ISVD들은 9GS 링커에 의해 연결된다. 반감기가 증가된 폴리펩티드에 제공하는 결합 단위는 바람

직하게는 ISVD로, 바람직하게는 혈청 알부민에 결합한다.

[0213] 폴리펩티드의 이러한 구성은 암 치료와 관련하여 강한 효력을 제공할 수 있다.

[0214] 다시 한 번, 표적 세포 상의 추가 항원에 결합하거나, 또다른 표적에 결합하는 추가 ISVD와 같은 다른 결합 단위/빌딩 블록이 폴리펩티드에 존재할 수 있음을 배제하지 않는다. 또한, ISVD와 같은 다른 결합 단위/빌딩 블록이 그 사이에 배치될 가능성을 배제하지 않는다. 예를 들어, 하기에 추가로 기술된 바와 같이(특히, 하기 섹션 5.4 "(생체내) 반감기 연장" 참조), 폴리펩티드는 예를 들어 "제1 ISVD" 및 "제2 ISVD" 사이에 심지어 위치될 수 있는 인간 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 또 다른 ISVD를 추가로 포함할 수 있다.

[0215] 본 기술의 폴리펩티드의 제2 ISVD는 표적 세포, 바람직하게는 암 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 본원에서 지칭되는 "표적 세포"는 그의 표면에 특정 항원을 제시하는 세포이다. 일 실시형태에서, "표적 세포"는 암 세포이다.

[0216] 막(형질막 또는 인지질 이중층이라고도 함)은 세포의 외부 경계인 세포질을 둘러싸고 있으며, 즉, 막은 세포의 표면이다. 이 막은 세포를 그의 주변 환경으로부터 분리하고 보호하는 역할을 하며, 대부분 인지질 이중층으로 만들어진다. 이 막 안에는 채널, 펌프 및 세포 수용체와 같은 다양한 단백질 분자가 내장되어 있다. 막은 유동적이기 때문에, 단백질 분자가 막 내에서 이동할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 세포 상의 항원"은 세포 표면에 발현되는 분자를 의미한다. 대부분의 경우, 이 분자는 이 분자의 적어도 일부가 3차 형태로 세포 외부에서 접근할 수 있도록 세포의 원형질막 내부 또는 위에 위치할 것이다. 원형질막에 위치하는 세포 표면 분자의 비제한적 예는 친수성 및 소수성 영역을 그의 삼차 형태로 포함하는 막관통 단백질이다. 여기서, 적어도 하나의 소수성 영역은 세포 표면 분자가 세포의 소수성 원형질막에 내포되거나 삽입되도록 하는 반면, 친수성 영역은 각각 원형질막의 양쪽에서 세포질 및 세포외 공간으로 확장된다.

[0217] 상기 항원은 세포 상의 임의의 표적, 예를 들어 종양 항원일 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항원은 상기 표적 세포, 예를 들어 암 세포에 대해 특이적이며, 예컨대 상기 암 세포 상의 종양 항원 또는 종양 관련 항원(TAA)이다.

[0218] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양 항원"은 종양 세포에 제시되는 항원으로 이해될 수 있다. 이러한 항원은 종종 분자의 막관통 및 세포질 부분과 결합되는 세포외 부분과 함께 세포 표면에 제시될 수 있다. 이러한 항원은 때때로 종양 세포에 의해서만 제시될 수 있으며 정상 또는 건강한 세포에 의해서는 제시되지 않는다. 종양 항원은 종양 세포에서만 독점적으로 발현될 수 있거나, 정상 세포와 비교하여 종양 특이적 돌연변이를 나타낼 수 있다. 이 경우, 이들을 종양-특이적 항원이라고 한다. 그러나, 이것은 일반적으로 그렇지 않다. 보다 일반적인 항원은 종양 세포와 정상 세포에 의해 제시되는 항원이며, "종양-관련 항원(TAA)"이라고 한다. 이러한 종양-관련 항원은 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 과발현될 수 있거나, 정상 조직과 비교하여 종양 조직의 덜 조밀한 구조로 인해 종양 세포에서 항체 결합에 더 잘 접근할 수 있다. TAA는 바람직하게는 특정 종양의 세포에서 발현되지만 바람직하게는 정상 세포에서는 발현되지 않는 항원이다. 종종, TAA는 유기체 발달의 특정 시점(예컨대 태아 발달 중)에서만 세포에서 정상적으로 발현되고 현재 발달 시점에서 유기체에서 부적절하게 발현되는 항원이거나, 항원을 발현하는 기관의 정상 조직 또는 세포에서는 발현되지 않는 항원이다.

[0219] 일 실시형태에서, 표적 세포 상의 상기 제1 항원은 종양 관련 항원(TAA)이다.

[0220] 일 실시형태에서, 표적 세포 상의 상기 제1 항원은 정상 세포보다 암세포에 더 풍부하게 존재한다. 표적 세포 상의 항원은 바람직하게는 종양 관련 항원(TAA)이다.

[0221] 일 실시형태에서, 표적 세포 상의 상기 제1 항원은 종양 항원, 바람직하게는 종양 특이적 항원(TAA)이다.

[0222] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 CD123 또는 글리피칸-3에 특이적으로 결합하는 제2 ISVD를 포함한다.

[0223] 추가 실시형태에서, 본 기술에 따른 폴리펩티드는 표적 세포 상의 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제3 ISVD를 추가로 포함한다.

[0224] 본 기술의 폴리펩티드가 결합하는 표적 세포는 특히 포유동물 세포, 바람직하게는 영장류 세포, 더욱 더 바람직하게는 인간 세포에 관한 것이다. 표적 세포는 바람직하게는 예를 들어 암 세포와 같은 과증식성 세포이다.

[0225] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 혈청의 기존의 항체에 의해 감소된 결합을 나타낸다. 이를 위해, 본 기술의 일 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나의 ISVD(및 바람직하게는 폴리

펩티드의 C-말단 단부에 있는 ISVD), 그러나 바람직하게는 각각의 ISVD에서 아미노산 위치 11에 발린(V) 및 아미노산 위치 89(카바트 넘버링에 따름)에 류신(L)을 포함한다.

[0226] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 C 말단 ISVD의 C 말단에서 단일 알라닌(A) 연장과 같은 1 내지 5개의 (바람직하게는 자연 발생) 아미노산의 연장을 나타낸다. ISVD의 C-말단은 일반적으로 VTVSS(서열 번호 88)이다.

[0227] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나의 ISVD에서 위치 110(카바트 넘버링에 따름)에서 리신(K) 또는 글루타민(Q)을 나타낸다.

[0228] 본 기술의 또 다른 실시형태에서, ISVD는 적어도 하나의 ISVD에서의 위치 112(카바트 넘버링에 따름)에서 리신(K) 또는 글루타민(Q)을 나타낸다. 이러한 실시형태에서, ISVD의 C 말단은 VKVSS(서열 번호 89), VQVSS(서열 번호 90), VTVKS(서열 번호 91), VTVQS(서열 번호 92), VKVKS(서열 번호 93), VKVQS(서열 번호 94), VQVKS(서열 번호 95), 또는 VQVQS(서열 번호 96)이고, 이에 따라, 단일 알라닌 첨가 후, 폴리펩티드의 C-말단은 예를 들어 서열 VTVSSA(서열 번호 97), VKVSSA(서열 번호 98), VQVSSA(서열 번호 99), VTVKSA(서열 번호 100), VTVQSA(서열 번호 101), VKVKSA(서열 번호 102), VKVQSA(서열 번호 103), VQVKSA(서열 번호 104), 또는 VQVQSA(서열 번호 105), 바람직하게는 VTVSSA를 나타낸다.

[0229] 본 기술의 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 ISVD에서 아미노산 위치 11의 발린(V) 및 아미노산 위치 89(카바트 넘버링에 따름)의 류신(L), 선택적으로 적어도 하나의 ISVD에서 위치 110(카바트 넘버링에 따름)의 리신(K) 또는 글루타민(Q)을 포함하고, C 말단 ISVD의 C 말단에 단일 알라닌(A) 연장과 같은 1 내지 5개의 (바람직하게는 자연 발생) 아미노산의 연장을 포함한다(따라서, 폴리펩티드의 C 말단은 예를 들어, 서열 VTVSSA, VKVSSA, 또는 VQVSSA, 바람직하게는 VTVSSA로 이루어짐). 이와 관련한 추가 정보는 예를 들어 WO2012/175741 및 WO2015/173325 참조.

[0230] 상기 및 본원의 추가 설명으로부터 명백해지는 바와 같이, 본 기술의 ISVD는 본원에 기술된 바와 같은 화합물 또는 작제물(예컨대, 제한 없이, 본원에 기술된 본 기술의 2가/3가/4가/다가 및 이중/삼중/사중/다중특이성 폴리펩티드)을 형성하기 위해, 예를 들어, 이들을 다른 그룹, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위와 적절하게 조합함으로써, 본 기술의 폴리펩티드를 형성하기 위한 "빌딩 블록"으로 사용될 수 있으며, 이는 한 분자 내에서 하나 이상의 원하는 특성 또는 생물학적 기능을 조합시킨다. 다수의 ISVD를 갖는 폴리펩티드는 본원에서 "작제물" 또는 "ISVD 형식"으로도 언급된다.

[0231] ### 5.3 특이성

[0232] "*특이성*", "*특이적으로 결합하는*" 또는 "*특이적 결합*"이라는 용어는 ISVD와 같은 특정 결합 단위가 충분히 높은 친화도로 결합할 수 있는 동일한 유기체로부터 항원과 같은 상이한 표적 분자의 수를 지칭한다(아래 참조). "*특이성*", "*특이적으로 결합하는*" 또는 "*특이적 결합*"은 본원에서 "*선택성*", "*선택적으로 결합하는*" 또는 "*선택적 결합*"과 상호 교환적으로 사용된다. ISVD와 같은 결합 단위는 바람직하게는 지정된 표적에 특이적으로 결합한다.

[0233] 결합 단위의 특이성/선택성은 친화도에 따라 결정될 수 있다. 친화도는 분자의 상호 작용의 강도 또는 안정성을 나타낸다. 친화도는 통상적으로 몰/L(또는 M) 단위로 표현되는 K_D 또는 해리 상수로 제공된다. 또한, 친화도는, $1/K_D$와 같으며 (몰/L)$^{-1}$(또는 M^{-1}) 단위로 표현되는 결합 상수 K_A로 나타낼 수 있다.

[0234] 친화도는 모이어티와 표적 분자의 결합 부위 사이의 결합 강도에 대한 척도이다: K_D 값이 낮을수록 표적 분자와 표적 모이어티 사이의 결합 강도가 더 강해짐.

[0235] 일반적으로, 본 기술에서 사용되는 결합 단위(예를 들어, ISVD)는 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰/L 이하, 바람직하게는 10^{-7} 내지 10^{-12} 몰/L 이하, 보다 바람직하게는 10^{-8} 내지 10^{-12} 몰/L 이하의 해리 상수(K_D)(즉, 10^{5} 내지 10^{12} 리터/몰 이상, 바람직하게는 10^{7} 내지 10^{12} 리터/몰 이상, 보다 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{12} 리터/몰 이상의 결합 상수(K_A))로 이들의 표적과 결합할 것이다.

[0236] 10^{-4} 몰/리터보다 큰 임의의 K_D 값(또는 10^{4} 리터/몰보다 낮은 임의의 K_A 값)은 일반적으로 비특이적 결합을 나타

내는 것으로 간주된다.

[0237] 항원에 대한 면역글로불린 서열의 결합과 같은 생물학적 상호작용에 대한 K_D는, 일반적으로 10^{-5} 몰/리터(10000 nM 또는 10 μM) 내지 10^{-12} 몰/리터(0.001 nM 또는 1 pM) 이하의 범위에서 특이적인 것으로 간주된다.

[0238] 따라서, 특이적/선택적 결합은 - 동일한 측정 방법, 예를 들어, SPR을 사용하여 - 결합 단위(또는 이를 포함하는 폴리펩티드)가 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰/L 이하의 K_D 값으로 TCR에 결합하고 10^{-4} 몰/L 초과의 K_D 값으로 관련 표적에 결합함을 의미할 수 있다.

[0239] 따라서, ISVD는 서열 번호 1의 아미노산으로 이루어진 ISVD와 비교하여 인간 TCR에 대해 바람직하게는 적어도 절반의 결합 친화도, 보다 바람직하게는 적어도 동일한 결합 친화도를 나타내며, 결합 친화도는 동일한 방법, 예컨대 SPR을 사용하여 측정된다.

[0240] 특정 종으로부터의 특정 표적에 대한 특이적 결합은 결합 단위가 또한 상이한 종으로부터의 유사한 표적에 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 배제하지 않는다. 예를 들어, 인간 TCR에 대한 특이적 결합은 결합 단위(또는 이를 포함하는 폴리펩티드)가 사이노몰구스 원숭이로부터의 TCR에도 특이적으로 결합할 수 있음을 배제하지 않는다.

[0241] ISVD가 다른 ISVD와 비교하여 "인간 및 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 있어서 향상된 교차 반응성"을 보인다고 언급되는 경우, 이는 상기 ISVD에 대해 인간 TCR 및 비인간 영장류 TCR에 대한 결합 활성의 비율(예컨대 K_D 또는 k_{off}로 나타냄)이 동일한 분석에서 다른 ISVD에 대해 계산된 동일한 비율보다 낮다는 것을 의미한다.

[0242] 인간 및 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 있어서의 우수한 교차 반응성은 비인간 영장류에서 수행된 전임상 연구에서 다중특이성 T 세포 관여 폴리펩티드의 독성 평가를 가능케 한다.

[0243] 지정된 표적에 대한 결합 단위의 특이적 결합은 예를 들어, 스캐차드 분석 및/또는 경쟁 결합 분석, 예를 들어 방사선 면역측정법(RIA), 효소 면역분석법(EIA) 및 샌드위치 경쟁 분석법, 및 당업계에서 그 자체로 알려진 이들의 다양한 변이형; 및 본원에서 언급된 기타 기술을 비롯한, 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방법에서 측정될 수 있다.

[0244] 해리 상수는 당업자에게 명백하듯이 실제 또는 겉보기 해리 상수일 수 있다. 해리 상수를 측정하는 방법은 당업자에게 명확할 것이며, 예를 들어 하기에서 언급되는 기술을 포함한다. 이와 관련하여, 10^{-4} 몰/리터 또는 10^{-3} 몰/리터 초과(예를 들어, 10^{-2} 몰/리터)의 해리 상수를 측정하는 것은 가능하지 않을 수 있음이 명백할 것이다. 선택적으로, 또한 당업자에게 명확하듯이, (실제 또는 겉보기) 해리 상수는 관계식 [$K_D = 1/K_A$]에 의해 (실제 또는 겉보기) 결합 상수(K_A)를 기초로 하여 계산될 수 있다.

[0245] 두 분자 사이의 분자 상호 작용의 친화도는 그 자체로 알려진 상이한 기술, 예를 들어 잘 알려진 표면 플라즈몬 공명(SPR) 바이오센서 기술을 통해 측정될 수 있다(예를 들어 문헌[Ober et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559] 참조). 본원에서 사용된 용어 "표면 플라즈몬 공명"은 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도의 변화를 검출함으로써 실시간 생물특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 지칭하며, 여기서 하나의 분자가 바이오센서 칩에 고정되어 있고 다른 분자는 k_{on}, k_{off} 측정값 및 따라서 K_D (또는 K_A) 값을 산출하는 흐름 조건에서 고정된 분자 위로 통과된다. 이는 예를 들어 잘 알려진 BIAcore® 시스템(GE Healthcare 산하 BIAcore International AB, Uppsala, Sweden 및 Piscataway, NJ)을 사용하여 수행될 수 있다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Jonsson et al. (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26)], 문헌[Jonsson et al. (1991, Biotechniques 11: 620-627)], 문헌[Johnsson et al. (1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131)], 및 문헌[Johnnson et al. (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277]을 참조한다.

[0246] 생체 분자 상호 작용의 친화도를 측정하기 위한 또 다른 잘 알려진 바이오 센서 기술은 생물층 간섭계(bio-layer interferometry, BLI)이다(예를 들어, 문헌[Abdiche et al. 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217] 참조). 본원에서 사용되는 용어 "생물층 간섭계" 또는 "BLI"는 두 표면: 내부 참조층(참조 빔) 및 바이오센서 팁 상의 고정된 단백질 층(신호 빔)으로부터 반사된 빛의 간섭 패턴을 분석하는 무표지 광학 기술을 지칭한다. 바이오센서의 팁에 결합된 분자 수의 변화는 간섭 패턴의 이동을 유발하며, 이는 파장 이동(nm)으로 보고되며, 그 규모는 바이오센서 팁 표면에 결합된 분자 수의 직접적인 척도이다. 상호 작용을 실시간으로 측정할 수 있으므

로 결합 및 해리 속도와 친화도를 결정할 수 있다. BLI는 예를 들어 잘 알려진 Octet® 시스템(ForteBio, a division of Pall Life Sciences, Menlo Park, USA)을 사용하여 수행될 수 있다.

[0247] 대안적으로, 친화도는 동역학 배제 분석(KinExA)(예를 들어 문헌[Drake et al. 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43] 참조). 본원에서 사용되는 용어 "KinExA"는 변형되지 않은 분자의 진정한 평형 결합 친화도 및 동역학을 측정하기 위한 용액 기반 방법을 지칭한다. 항체/항원 복합체의 평형 용액이 항원(또는 항체)으로 미리 코팅된 비드가 있는 컬럼 위로 통과되어, 유리 항체(또는 항원)가 코팅된 분자에 결합하도록 한다. 이렇게 포획된 항체(또는 항원)의 검출은 항체(또는 항원)에 결합하는 형광 표지된 단백질로 달성된다.

[0248] GYROLAB® 면역분석 시스템은 자동화된 생물분석 및 신속한 샘플 턴어라운드를 위한 플랫폼을 제공한다(문헌[Fraley et al. 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

[0249] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^5 $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 TCR에 대한 결합에 대한 온-레이트 상수(k_{on})를 갖는다.

[0250] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 적어도 약 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^5 $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택되는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{on}을 갖는다.

[0251] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 및 최대 약 10^{-4} s^{-1}로 이루어진 군으로부터 선택되는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{off}를 갖는다.

[0252] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 및 최대 약 10^{-4} s^{-1}로 이루어진 군으로부터 선택되는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{off}를 갖는다.

[0253] 위치 99에 Y, F, H, K, L 또는 R을 갖는 ISVD는 위치 99에 상이한 아미노산을 갖는 ISVD와 비교하여 특히 유리한 k_{off}를 나타냈다. 이와 같이, 일 실시형태에서, ISVD는 위치 99에서 Y, F, H, K, L 또는 R을 갖는다. 일 실시형태에서, ISVD는 위치 99에서 Y, F, H, 또는 R을 갖는다.

[0254] 위치 103(카바트 넘버링)에서 W, A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V 또는 Y를 갖는 ISVD는 위치 103에서 다른 아미노산을 갖는 ISVD와 비교하여 특히 유리한 koff를 나타냈다. 이와 같이, 일 실시형태에서, ISVD는 위치 103에서 W, A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V 또는 Y를 갖는다. 일 실시형태에서, ISVD는 위치 103에서 W, A, E, F, H, I, K, L, Q, S, T 또는 V를 갖는다.

[0255] 위치 61(카바트 넘버링)에서 A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V 또는 Y를 갖는 ISVD는 위치 61에서 D를 갖는 기준 TCE ISVD만큼 양호한 k_{off}를 나타냈다. 상기 기준 ISVD에서 D61에서 이성질체화가 관찰되었기 때문에, 위치 61에서 상이한 아미노산을 갖는 적어도 유사한 오프 속도를 갖는 ISVD를 수득할 필요가 있었다. 따라서, 일 실시형태에서, ISVD는 위치 61에서 A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V 또는 Y를 가지며, 바람직하게는 ISVD는 위치 61에서 E를 갖는다.

[0256] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 최대 약 10^{-8} M, 및 최대 약 10^{-9} M로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 TCR에 대한 결합에 대한 친화도(K_D)를 갖는다.

[0257] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, 최대 약 10^{-5} M, 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 및 최대 약 10^{-8} M로 이루어진 군으로부터 선택되는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 K_D를 갖는다.

[0258] 일부 실시형태에서, 본 기술의 TCR 결합 ISVD는 서열 번호 1과 비교하여 동일하거나 더 낮은 오프-레이트 상수

(k_{off})로 인간 TCR에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 서열 번호 1의 ISVD와 비교하여 동일하거나 더 낮은 k_{off}로 비인간 영장류 TCR에 결합한다. 일부 실시형태에서, 본 기술의 TCR 결합 ISVD는 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)와 비교하여 동일하거나 더 낮은 오프-레이트 상수(k_{off})로 인간 TCR에 결합한다.

[0259] 일부 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 ISVD ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)와 비교하여 동일하거나 더 낮은 k_{off}로 비인간 영장류 TCR에 결합한다. 오프-레이트(k_{off})는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일 실시형태에서, 오프-레이트(k_{off})는 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된다(바람직하게는 25° C에서).

[0260] 본 발명자들은 기준 ISVD T017000700(서열 번호 1)과 동일하거나 더 높은 친화도(K_D)를 갖는 본 기술에 따른 ISVD도 세포 살해 분석에서 테스트할 때 상기 기준 ISVD와 유사하거나 더 높은 효력을 가짐을 발견하였다.

[0261] 놀랍게도, 본 발명자들은 인간 TCR에 대한 결합에 대해 기준 ISVD T017000700(서열 번호 1)보다 40배 넘게 더 낮은 친화도(K_D)를 갖지만 세포 살해 분석에서 높은 효능을 유지한 본 기술의 ISVD의 하위세트를 발견하였다. 위치 61에 E를 갖고 위치 99에 Q, S 또는 T를 갖는 이들 특정 ISVD(카바트 넘버링)는 더 양호한 생체분포를 갖는 생물치료제의 생성에서 흥미로운 기회를 제시한다.

[0262] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에 서열 번호 50으로 개시됨)와 비교하여 인간 및 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대해 개선된 교차 반응성을 갖는다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 인간 TCR에 대한 결합에 대한 k_{off}의 5배 범위 내에 있는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{off}를 갖는다.

[0263] 또 다른 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25° C에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 경우 서열 번호 1과 비교하여 동일하거나 더 낮은 K_D로 인간 TCR에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25° C에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 경우 서열 번호 1과 비교하여 동일하거나 더 낮은 K_D로 비인간 영장류 TCR에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25° C에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 경우 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)와 비교하여 동일하거나 더 낮은 K_D로 인간 TCR에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25° C에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정할 경우 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)와 비교하여 동일하거나 더 낮은 K_D로 비인간 영장류 TCR에 결합한다.

[0264] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 측정된 바와 같이, (i) 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 최대 약 10^{-8} M, 최대 약 10^{-8} M, 및 최대 약 10^{-9} M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 TCR에 대한 결합 친화도(K_D) 및 (ii) 최대 약 10^{-5} M, 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 및 최대 약 10^{-8} M으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 K_D를 갖는다.

[0265] 일 실시형태에서, 본 기술의 ISVD는 개선된 교차 반응성을 나타내며, 즉, 인간 및 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 결합 활성의 비(예를 들어, K_D 또는 K_{off}로 표현됨)는 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)에 대한 상기 비와 비교하여 더 낮고, 상기 K_D 또는 K_{OFF}는 바람직하게는 25° C에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는, 바람직하게는 SPR에 의해 결정된다.

[0266] 예를 들어, 본 기술의 ISVD는 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)에 대한 인간-사이노몰구스 교차 반응성의 차이와 비교하여 K_D를 기반으로 하는 인간-사이노몰구스 교차 반응성의 차이가 더 낮음을 나타낸다. 바람직하게는, K_D는 바람직하게는 25℃에서 바람직하게는 ProteOn XPR36 기기에서 수행되는,

SPR에 의해 측정된다.

[0267] **5.4 *(생체내)* 반감기 연장**

[0268] 본 기술에 따른 폴리펩티드는 이상에서 개시된 바와 같이, 선택적으로 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 연결된 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 없는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 (생체내) 반감기를 갖는 폴리펩티드를 제공한다. 생체내 반감기 연장은 예를 들어, 폴리펩티드가 투여 후 인간 대상체와 같은 포유동물에서 반감기가 증가됨을 나타낸다. 반감기는 예를 들어 t1/2베타로 표현할 수 있다.

[0269] 기, 잔기, 모이어티, 또는 결합 단위의 유형은 일반적으로 제한되지 않으며, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 분자, 혈청 단백질 또는 이의 단편, 혈청 단백질에 결합할 수 있는 결합 단위, Fc 부분 및 혈청 단백질에 결합할 수 있는 소형 단백질 또는 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0270] 보다 구체적으로, 반감기가 증가된 폴리펩티드를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티, 또는 결합 단위는 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민 또는 IgG와 같은 혈청 면역글로불린에 결합할 수 있는 결합 단위로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간 혈청 알부민에 결합할 수 있는 결합 단위이다. 결합 단위는 바람직하게는 ISVD이다.

[0271] 예를 들어, WO 04/041865는 상기 단백질의 반감기를 증가시키기 위해 다른 단백질(예를 들어, 목적하는 표적에 결합하는 하나 이상의 다른 나노바디)에 연결될 수 있는 혈청 알부민(특히 인간 혈청 알부민)에 결합하는 ISVD를 기재하고 있다.

[0272] 국제출원 WO 06/122787은 (인간) 혈청 알부민에 대한 다수의 ISVD를 기재하고 있다. 이러한 ISVD에는 Alb-1(WO 06/122787의 서열 번호 52)로 불리는 ISVD 및 Alb-8(WO 06/122787의 서열 번호 62)과 같은 이의 인간화 변이체가 포함된다. 즉, 이들은 치료 단백질 및 폴리펩티드 및 기타 치료제 또는 모이어티의 반감기를 연장하는 데 사용될 수 있다.

[0273] 또한, WO2012/175400은 Alb-23으로 지칭되는 Alb-1의 추가 개선된 버전을 기재하고 있다.

[0274] 본 기술의 일 실시형태에서, 폴리펩티드는 Alb-1, Alb-3, Alb-4, Alb-5, Alb-6, Alb-7, Alb-8, Alb-9, Alb-10 및 Alb-23, 바람직하게는 Alb-8 또는 Alb-23 또는 WO2012/175400의 페이지 7~9에 제시된 바와 같은 이의 변이체 및 WO2012/175741, WO2015/173325, WO2017/080850, WO2017/085172, WO2018/104444, WO2018/134235, WO2018/134234에 기재된 알부민 결합제로부터 선택된 혈청 알부민 결합 모이어티를 포함한다.

[0275] 또 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 표 A-3으로부터 선택된 혈청 알부민 결합 모이어티를 포함한다.

[0276] [표 A-3] 혈청 알부민 결합 ISVD 서열 ("ID"는 본원에서 사용되는 서열번호를 지칭함)

명칭	ID	아미노산 서열
Alb8	118	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
Alb8-A	119	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA
Alb23	120	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG TLVTVSS
Alb23-A	121	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG TLVTVSSA
Alb83	122	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
Alb83-A	123	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA
Alb132	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS
Alb132-A	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA

[0277]

Alb73	126	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVKVSS
Alb73-A	127	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVKVSSA
Alb82	128	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
Alb82-A	129	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA
Alb199	130	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVKVSS
Alb199-A	131	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVKVSSA
Alb23002	132	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS
Alb223	133	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA
Alb216	134	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVKVSS
Alb216-A	135	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVKVSSA

[0278]

[0279] 인간 혈청 알부민에 대한 이러한 ISVD 결합이 C-말단 위치에서 일어나는 경우, 이것은 C-말단 알라닌(A) 또는 글리신(G) 연장(바람직하게는 A)을 나타낼 수 있다. 본 기술의 일부 실시형태에서, 인간 혈청 알부민에 대한 ISVD 결합은 C-말단 위치 이외의 다른 위치에서 일어난다(즉, 해당 폴리펩티드의 C-말단 ISVD가 아님).

[0280] **5.5 핵산 분자**

[0281] 또한, 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자가 제공된다.

[0282] "핵산 분자"("핵산"과 상호교환적으로 사용됨)는 뉴클레오티드 서열을 형성하기 위해 포스페이트 백본을 통해 서로 연결된 뉴클레오티드 단량체의 사슬이다. 핵산은 예를 들어, 폴리펩티드의 발현 및/또는 생성을 위해, 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 형질전환/형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 생성 목적에 적합한 숙주 또는 숙주 세포는 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주 또는 임의의 적합한 진균, 원핵, 또는 진핵 유기체일 수 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 (비인간) 숙주 또는 숙주 세포도 본 기술에 포함된다.

[0283] 핵산은 예를 들어 DNA, RNA, 또는 이들의 하이브리드일 수 있고, 또한 PNA와 같은 (예를 들어, 화학적으로) 변

형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이는 단일 또는 이중 가닥일 수 있으며, 바람직하게는 이중 가닥 DNA의 형태이다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 게놈 DNA 또는 cDNA일 수 있다.

[0284] 핵산은 그 자체로 알려진 방식으로 제조 또는 수득될 수 있고/있거나 적합한 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 자연 발생 (폴리)펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열 변이를 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 제공하기 위해 예를 들어 부위-지정 돌연변이유발을 수행할 수 있다. 또한, 당업자에게 명백한 바와 같이, 핵산을 제조하기 위해 표적화 모이어티를 코딩하는 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열 및 예를 들어 하나 이상의 링커를 코딩하는 핵산과 같은 여러 뉴클레오티드 서열이 적합한 방식으로 함께 연결될 수 있다.

[0285] 핵산을 생성하는 기술은 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어 자동화된 DNA 합성; 부위-지정 돌연변이유발; 2개 이상의 자연 발생 및/또는 합성 서열(또는 이의 2개 이상의 부분)의 결합, 절단된 발현 생성물의 발현을 유도하는 돌연변이의 도입; 하나 이상의 제한 부위의 도입(예를 들어, 적합한 제한 효소를 사용하여 쉽게 소화 및/또는 결찰될 수 있는 카세트 및/또는 영역을 생성하기 위해) 및/또는 하나 이상의 "미스매치된" 프라이머를 사용하는 PCR 반응에 의한 돌연변이의 도입을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0286] **5.6 벡터**

[0287] 또한, 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터가 제공된다.

[0288] 본원에서 사용되는 "벡터"는 유전 물질을 세포 내로 운반하기에 적합한 비히클이다. 벡터는 플라스미드 또는 mRNA와 같은 네이키드 핵산, 또는 리포솜 또는 바이러스 벡터와 같은 더 큰 구조에 내장된 핵산을 포함한다.

[0289] 벡터는 일반적으로 예를 들어 하나 이상의 적합한 프로모터(들), 인핸서(들), 터미네이터(들) 등과 같은 하나 이상의 조절 요소에 선택적으로 연결된 적어도 하나의 핵산을 포함한다. 벡터는 바람직하게는 발현 벡터, 즉 적합한 조건 하에서, 예를 들어, 벡터가 (예를 들어, 인간) 세포에 도입되는 경우, 코딩된 폴리펩티드 또는 작제물를 발현하기에 적합한 벡터이다. DNA 기반 벡터의 경우, 이는 일반적으로 전사(예를 들어, 프로모터 및 polyA 신호) 및 번역(예를 들어, Kozak 서열)을 위한 요소의 존재를 포함한다.

[0290] 바람직하게는, 벡터에서, 상기 적어도 하나의 핵산 및 상기 조절 요소는 서로 "작동 가능하게 연결"되어 있으며, 이는 일반적으로 이들이 서로 기능적 관계에 있음을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 및/또는 발현을 개시 또는 다르게는 제어/조절할 수 있는 경우 상기 프로모터는 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결"된 것으로 간주된다(상기 코딩 서열은 상기 프로모터의 "제어 하"에 있다고 이해되어야 한다). 일반적으로, 2개의 뉴클레오티드 서열이 작동 가능하게 연결되어 있을 때, 이들은 동일한 방향으로 있을 것이고 일반적으로 동일한 해독 프레임에도 있을 것이다. 이들은 또한 일반적으로 본질적으로 연속적일 것이지만, 이는 필요하지 않을 수도 있다.

[0291] 바람직하게는, 벡터의 임의의 조절 요소는 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 의도된 생물학적 기능을 제공할 수 있도록 하는 것이다.

[0292] 예를 들어, 프로모터, 인핸서 또는 터미네이터는 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 "작동가능"해야 하며, 이는 예를 들어 상기 프로모터가 이들이 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 코딩 서열의 전사 및/또는 발현을 개시하거나 달리 제어/조절할 수 있어야 함을 의미한다.

[0293] **5.7 조성물**

[0294] 본 기술은 또한 본원에 개시된 바와 같이 적어도 하나의 ISVD 또는 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 분자 또는 이러한 핵산 분자를 포함하는 적어도 하나의 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 조성물은 제약 조성물일 수 있다. 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제 및/또는 보조제를 추가로 포함할 수 있고, 선택적으로 하나 이상의 추가의 약학적으로 활성인 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다.

[0295] **5.8 숙주 유기체**

[0296] 본 기술은 또한 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및/또는 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에 관한 것이다.

[0297] 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체는 당업자에게 명백하고, 예를 들어 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주 또는 임의의 적합한 진균, 원핵, 또는 진핵 유기체이다. 특정 예에는 HEK293 세포, CHO 세포,

에스케리치아 콜리(Escherichia coli) 또는 *피치아 파스토리스(Pichia pastoris)*가 포함된다. 가장 바람직한 숙주는 *피치아 파스토리스*이다.

[0298] **5.9 ISVD 및 폴리펩티드의 방법 및 용도**

[0299] 본 기술은 또한 본원에 개시된 바와 같은 ISVD 또는 폴리펩티드를 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 형질전환/형질감염시키는 단계, 숙주에서 ISVD 또는 폴리펩티드를 발현시키는 단계(이어서 임의로 하나 이상의 단리 및/또는 정제 단계)를 포함할 수 있다. 구체적으로, 이러한 방법은 다음과 같은 단계를 포함할 수 있다:

[0300] a) 적합한 숙주 세포 또는 (비인간) 숙주 유기체에서 또는 또 다른 적합한 발현 시스템에서 본 기술에 따른 ISVD 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 발현시키는 단계; 이어서 선택적으로

[0301] b) 폴리펩티드를 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0302] 생성 목적에 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체는 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주 또는 임의의 적합한 진균, 원핵, 또는 진핵 유기체일 수 있다. 특정 예에는 HEK293 세포, CHO 세포, *에스케리치아 콜리(Escherichia coli)* 또는 *피치아 파스토리스(Pichia pastoris)*가 포함된다. 가장 바람직한 숙주는 *피치아 파스토리스*이다.

[0303] 전형적으로, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 표적 세포에 대한 고친화성 항원 인식과 T 세포 활성화를 결합하여, T 세포의 자연적 특이성과 독립적인 활성화를 초래한다. 본 기술의 폴리펩티드의 제1 ISVD는 이펙터 세포, 바람직하게는 상기 이펙터 세포의 TCR, 및 더욱 바람직하게는 TCR의 불변 도메인에 대해 높은 친화성을 갖거나/특이적으로 결합한다.

[0304] 이펙터 세포는 TCR 복합체를 포함하는 세포, 바람직하게는 면역 세포, 예컨대 T 세포, 바람직하게는 CD4+ T-헬퍼 세포 (CD4 세포, T-헬퍼 세포 또는 T4 세포로도 알려짐), 보다 바람직하게는 세포독성 T 세포 (TC 세포, CTL 또는 CD8+ T 세포로도 알려짐) 또는 자연 살해 T 세포 (NKT 세포)이다. 일부 실시형태에서, 세포는 생체내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 세포는 시험관내에 존재한다. 본 기술의 이펙터 세포는 특히 포유동물 세포, 바람직하게는 영장류 세포, 더욱 더 바람직하게는 인간 세포에 관한 것이다.

[0305] 본원에 사용된 바와 같은 "T 세포 활성화"는 예컨대: 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현, 및 재지향된 표적 세포 용해로부터 선택되는, T 세포, 예를 들어 세포독성 T 세포의 하나 이상의 세포 반응(들)을 지칭한다. 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. T 세포 활성화를 측정하기 위한 적합한 분석은 본원에, 예를 들어 WO 99/54440 또는 문헌 [Schlereth et al. 2005 (Cancer Immunol. Immunother. 20: 1-12)]에 기술된 바와 같이, 당업계에 알려져 있거나, 또는 실시예 또는 하기에 예시된 바와 같다.

[0306] 일 실시형태에서, 본 기술은 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드에 관한 것으로, 여기서 상기 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도한다. 바람직하게는, 본 기술의 폴리펩티드는 상기 제2 및/또는 추가 ISVD가 표적 세포 상의 항원에 결합될 때만 T 세포 활성화를 유도한다.

[0307] 일 실시형태에서, 본 기술은 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드에 관한 것으로, 여기서 상기 T 세포 활성화는 표적 세포 상의 상기 제1 항원에 결합된 상기 폴리펩티드를 T 세포에 제시하는 것에 의존한다.

[0308] 본 기술의 폴리펩티드에 의한 T 세포 활성화는 CD69, CD25 및 다양한 세포 부착 분자들의 상향조절, 사이토카인 (예를 들어, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-2, IL-4 및 IL-10)의 드 노보 발현 및/또는 방출, 그랜자임 및 퍼포린 발현의 상향조절, 및/또는 세포 증식, 막 수포화(blebbing), 프로카스파제 3 및/또는 7의 활성화, 핵 DNA의 단편화 및/또는 카스파제 기질 폴리(ADPribose) 폴리머라제의 절단에 의해 모니터링될 수 있다. 바람직하게는, 다중특이성-다가 폴리펩티드에 의한 표적 세포의 재지시된 용해는 T 세포 수용체 특이성, MHC 클래스 I 및/또는 β2 마이크로글로불린의 존재, 및/또는 임의의 동시-자극 자극과 무관하다.

[0309] 일 실시형태에서, 본 기술은 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 T 세포 활성화는 MHC 인식과 독립적이다.

[0310] 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 이전에 자극되지 않은 말초 다클론성 $CD8^+$- 및 $CD4^+$-양성 T 세포를 사용하여 시험관내에서 재지시된 용해를 나타낸다. 본 기술의 폴리펩티드에 의한 T 세포의 동원을 통해 표적 세포의 재지시된 용해는 세포용해 시냅스 형성 및 퍼포린 및 그랜자임의 전달을 포함한다. T 세포에 의한 세포 용해

가 예를 들어 문헌[Atkinson and Bleackley 1995 (Crit. Rev. Immunol 15(3-4): 359-384)]에 기술되어 있다. 바람직하게는, 결합된 T 세포는 일련의 표적 세포 용해가 가능하고, 펩티드 항원 프로세싱 및 제시 또는 클론 T 세포 분화를 방해하는 면역 탈출 메카니즘에 의해 영향을 받지 않는다(예를 들어, WO 2007/042261 참조). 시험관내에서, 재지시된 용해는 낮은 피코몰 농도에서 관찰되며, 이는 T 세포를 유발하기 위해 표적 세포에 결합할 필요가 있는 매우 적은 수의 본 기술의 폴리펩티드를 시사한다. 따라서, 본 기술은 강력한 폴리펩티드에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 표적 세포, 예를 들어 암 세포의 사멸, 예컨대 공극 형성에서 T 세포를 자극하고 세포독성 T 세포 과립의 프로-아폽토시스 성분 전달을 매개한다.

[0311] 일 실시형태에서, 본 기술은 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포의 하나 이상의 세포 반응을 유발하고, 상기 세포 반응은 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현 및 재지향된 표적 세포 용해로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0312] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "효력"은 폴리펩티드 또는 ISVD와 같은 작용제의 생물학적 활성의 척도이다. 작용제의 효력은 예를 들어 실험 섹션에 기술된 바와 같은, 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 세포 배양 기반 효력 분석은 종종 작용제에 의해 유도된 생리학적 반응을 측정하고 비교적 짧은 시간 내에 결과를 생성할 수 있기 때문에 생물학적 활성을 결정하는 데 바람직한 형식이다. 당업계에 모두 잘 알려져 있는, 증식 분석, 세포독성 분석, 세포 살해 분석, 리포터 유전자 분석, 세포 표면 수용체 결합 분석, 및 기능적으로 필수적인 단백질 또는 다른 신호 분자(예컨대 인산화 단백질, 효소, 사이토카인, cAMP 등)의 유도/억제를 측정하는 분석, Ramos B 세포 결실 모델, T 세포 매개 종양 세포 살해 분석(예를 들어, 아래 실시예 섹션에 제시된 바와 같음)을 포함한, 생성물의 작용 메카니즘에 기반한 다양한 유형의 세포 기반 분석이 사용될 수 있다.

[0313] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 및 사이노 T 세포 매개 사멸 분석 모두에서, 제1 ISVD가 T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)로 대체된 동일한 형식과 비교하여 개선된 효력 및 효능을 나타냈다.

[0314] (본 기술의 폴리펩티드의) "효능"은 포화 폴리펩티드 농도에서 효과 자체의 최대 강도를 측정한다. 효능은 본 기술의 폴리펩티드에 의해 달성될 수 있는 최대 반응을 나타낸다. 이는 원하는 (치료) 효과를 생성하는 폴리펩티드의 능력을 지칭한다.

[0315] 따라서, 일 실시형태에서, 본 기술은 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드에 관한 것이며, 여기서 상기 T 세포 활성화는 표적 세포의 확산을 지연 또는 최소화하고, 표적 세포의 성장 및/또는 증식을 억제 또는 지연시키고/시키거나, 표적 세포를 사멸시키는 것(예를 들어, 장애 및/또는 증상의 퇴행 유발)과 같은 상기 표적 세포의 활성 억제를, 약 10% 초과, 예컨대 20%, 30%, 또는 40%, 또는 심지어 50% 초과, 예컨대 60% 초과, 예컨대 70%, 80% 또는 심지어 90% 초과, 예컨대 100% 유발한다. 특정 실시형태에서, 상기 T 세포 활성화는 표적 세포의 용해를 약 10% 초과, 예컨대 20%, 30%, 또는 40%, 또는 심지어 50% 초과, 예컨대 60% 초과로 유발한다.

[0316] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 T 세포가 최대 약 10^{-9} M, 최대 약 10^{-10} M 및 최대 약 10^{-11} M로 이루어진 군으로부터 선택된 EC50 값을 갖는 표적 세포를 용해하도록 하고, 상기 EC50 값은 T 세포 매개 사멸 분석에서 측정된 값이다. 예를 들어, EC50은 실시예 8 또는 9에 제시된 바와 같은 유세포 분석 기반 분석에서, 또는 실시예 10에 제시된 바와 같은 임피던스 기반 세포독성 분석에서 결정된다.

[0317] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 비인간 영장류 T 세포가 최대 약 10^{-9} M, 및 최대 약 10^{-10} M 및 최대 약 10^{-11} M로 이루어진 군으로부터 선택된 EC50 값으로 표적 세포를 용해하도록 하고, 상기 EC50 값은 T 세포 매개 살해 분석에서 결정된 바와 같다. 예를 들어, EC50은 실시예 8 또는 9에 제시된 바와 같은 유세포 분석 기반 분석에서, 또는 실시예 10에 제시된 바와 같은 임피던스 기반 세포독성 분석에서 결정된다.

[0318] 위치 61에 E 및 위치 99에 Y 또는 S를 갖는 본 기술에 따른 TCR 결합 ISVD를 갖는 다중특이성-다가 폴리펩티드는 유세포 분석 기반 T 세포 매개 살해 분석에서 특히 높은 효능을 나타내었다. 따라서, 일 실시형태에서, 다중특이성-다가 폴리펩티드는 위치 61에 E 및 위치 99에 Y 또는 S를 갖는 TCR 결합 ISVD를 포함한다. 일 실시형태

에서, 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 T 세포가 최대 약 5.10^{-10} M, 최대 약 10^{-10} M, 예컨대 5.10^{-11} M의 EC50 값으로 표적 세포를 용해하도록 하며, 상기 EC50 값은 유세포 분석 기반 T 세포 매개 살해 검정 또는 임피던스 기반 T 세포 매개 살해 검정에서 결정된 바와 같다. 일 실시형태에서, 다중특이성-다가 폴리펩티드는 위치 61에 E 및 위치 99에 Y, Q, T 또는 S를 갖는 TCR 결합 ISVD를 포함하고, 인간 T 세포가 최대 약 5.10^{-10} M, 최대 약 10^{-10} M, 예컨대 최대 5.10^{-11} M의 EC50으로 표적 세포를 용해하도록 하며, 상기 EC50 값은 유세포 분석 기반 T 세포 매개 살해 분석 또는 임피던스 기반 T 세포 매개 살해 분석에서 결정된 바와 같다.

[0319] 일 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 및/또는 비인간 영장류 T 세포를 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드와 비교하여 개선된(더 낮은) EC50 값으로 표적 세포를 용해하도록 활성화할 수 있다.

[0320] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 인간 T 세포를 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50으로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드의 EC50 값보다 개선된(더 낮은) EC50 값으로 표적 세포를 용해하도록 하며, 상기 EC50 값은 T 세포 매개 살해 검정에서 측정된 바와 같다. 예를 들어, EC50은 실시예 섹션에 명시된 바와 같이 결정된다.

[0321] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 비인간 영장류 T 세포가 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드의 EC50 값보다 개선된(더 낮은) EC50 값으로 표적 세포를 용해하도록 하며, 상기 EC50 값은 T 세포 매개 사멸 검정에서 측정된 바와 같다. 예를 들어, EC50은 실시예 섹션에 명시된 바와 같이 결정된다.

[0322] 일 실시형태에서, 본 기술의 제1 ISVD를 포함하는 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드, 즉, 제1 ISVD 및 ISVD로서 T0170056G05의 CDR 서열을 갖는 폴리펩티드와 비교하여 인간 및/또는 비인간 영장류 TCR의 불변 도메인에 대한 개선된 결합을 나타낸다.

[0323] 본 기술의 ISVD의 결합 특성은 아래에서 보다 상세히 논의된다(섹션 5.3; "특이성").

[0324] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 TCR에 대한 결합에 대한 온-레이트 상수(k_{on})를 갖는다.

[0325] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^{6} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{on}을 갖는다.

[0326] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 및 최대 약 10^{-4} s^{-1}로이루어진 군으로부터 선택된 인간 TCR에 대한 결합에 대한 오프-레이트 상수 (k_{off})를 갖는다.

[0327] 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이성-다가 폴리펩티드는 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 및 최대 약 10^{-4} s^{-1}로 이루어진 군으로부터 선택된 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 k_{off}를 갖는다.

[0328] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 최대 약 10^{-5} M, 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 최대 약10^{-8} M, 및 최대 약 10^{-9} M로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 TCR에 대한 결합에 대한 친화도(K_D)를 갖는다.

[0329] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 최대 약 10^{-5} M, 최대 약 10^{-6} M, 최대 약 10^{-7} M, 및 최대 약 10^{-8} M로 이루어진 군으로부터 선택된 비인간 영장류 TCR에 대한 결합에 대한 K_D를 갖는다.

[0330] 일 실시형태에서, k_{on}, k_{off}, 또는 K_D는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된다. 예를 들어, k_{on}, k_{off}, 또는 K_D는 실시예 섹션에 명시된 바와 같이 결정된다.

[0331] 또다른 실시형태에서, k_{on}, k_{off}, 또는 K_D는 생물층 간섭측정법(BLI)에 의해 측정된다.

[0332] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드의 K_D보다 개선된(더 낮은) K_D로 인간 TCR에 결합한다.

[0333] 일 실시형태에서, 본 기술의 다중특이성-다가 폴리펩티드는 제1 ISVD가 ISVD T0170056G05(WO 2016180969에서 서열 번호 50로 개시됨)로 대체된 동일한 폴리펩티드의 K_D보다 개선된(더 낮은) K_D로 비인간 영장류 TCR에 결합한다.

[0334] 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물(바람직하게는 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 조성물)은 의약으로서 유용하다.

[0335] 따라서, 본 기술은 의약으로서 사용하기 위한, 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0336] 또한, 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 예방, 치료 또는 개선에 사용하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0337] 또한, 암의 치료에 사용하기 위한, 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0338] 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위한 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은 제약 활성량의 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0339] 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위한 방법이 추가로 제공되며, 상기 방법은 제약 활성량의 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0340] 추가로, 암을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 제약 활성량의 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0341] 의약의 제조에 있어서의, 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물의 용도가 추가로 제공된다.

[0342] 증식성 질환, 염증성 질환, 감염성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위한 의약의 제조에 있어서의, 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물의 용도가 또한 제공된다.

[0343] 바람직하게는 암을 치료하기 위한, 제약 조성물의 제조에 있어서의, 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물의 용도가 추가로 제공된다.

[0344] 본 기술의 맥락에서 언급되는 "대상체"는 임의의 동물, 바람직하게는 포유동물일 수 있다. 포유동물 중에서 인간과 비인간 포유동물 사이에 구별이 이루어질 수 있다. 비인간 동물은 예를 들어 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이), 가축(예를 들어, 소, 말, 양, 염소, 또는 돼지), 또는 연구 목적 및/또는 항체 생성을 위해 일반적으로 사용되는 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 말, 돼지, 비인간 영장류, 예컨대 사이노몰구스 원숭이, 또는 낙타과, 예컨대 라마 또는 알파카)일 수 있다.

[0345] 예방 및/또는 치료 목적의 맥락에서, 대상체는 임의의 동물, 보다 구체적으로 임의의 포유동물일 수 있지만, 바람직하게는 인간 대상체이다.

[0346] 본원에 사용된 바와 같이, 치료법(들)을 대상체에게 투여하는 맥락에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 과증식성 세포 장애, 예를 들어, 암의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선, 및/또는

하나 이상의 치료법(하나 이상의 예방 또는 치료제의 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않음)의 투여로 인한 하나 이상의 증상의 완화를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 치료법/치료법들을 대상체에게 투여하는 것과 맥락에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 과증식성 세포 장애, 예를 들어, 암의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선을 지칭하며, 대조군(예를 들어, 음성 대조군, 예컨대 포스페이트 완충 염수)과 비교하여 암 세포를 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 100% 감소시키는 것을 지칭한다. 다른 실시형태에서, 치료법, 또는 치료법들을 대상체에게 투여하는 맥락에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 과증식성 세포 장애, 예를 들어, 암의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선을 지칭하며, 암에 걸린 대상체의 암 세포 수의 변화 없음, 입원 시간 감소, 사망률 감소 또는 생존 시간 증가를 지칭한다.

[0347] 물질(폴리펩티드, 핵산 분자 및 벡터 포함) 또는 조성물은 임의의 적합한 투여 경로, 예를 들어 소화관내(예를 들어, 경구 또는 직장) 또는 비경구(예를 들어, 피부, 설하, 협측, 비강, 관절내, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경피, 또는 경점막) 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 근육내, 피하, 또는 피내 투여와 같은 비경구 투여가 바람직하다. 가장 바람직한 것은 피하 투여이다.

[0348] 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터, 또는 ISVD 또는 폴리펩티드, 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 조성물의 유효량은 의도된 치료 결과를 제공하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0349] 하나 이상의 용량이 투여될 수 있다. 하나 초과의 용량이 투여되는 경우, 용량은 폴리펩티드, 조성물, 핵산 분자 또는 벡터의 효과를 최대화하기 위해 적절한 간격으로 투여될 수 있다.

[0350] **[표 A-4] ISVD의 서열**

[0351]

명칭	서열 번호	61	99	103	서열
T017000700	1	D	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000937	2	N	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYANSAKGRFTISRDESK

					NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000938	3	P	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAPSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000939	4	K	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAKSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000940	5	R	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYARSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000941	6	I	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAISAKGRFTISRDESKN TVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGTL VTVSS
T017000942	7	T	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYATSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000943	8	H	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAHSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000944	9	V	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000945	10	E	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK

[0352]

[0353]

					NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000946	11	A	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAASAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000947	12	Y	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAYSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000948	13	L	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYALSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000949	14	Q	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000950	15	F	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAFSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000951	16	S	W	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYASSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGT LVTVSS
T017000952	17	D	W	R	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYRGQGTL VTVSS
T017000953	18	D	W	A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK

					NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYAGQGTL VTVSS
T017000954	19	D	W	E	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYEGQGTL VTVSS
T017000955	20	D	W	Y	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYYGQGTL VTVSS
T017000956	21	D	W	L	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYLGQGTL VTVSS
T017000957	22	D	W	H	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYHGQGTL VTVSS
T017000958	23	D	W	I	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYIGQGTL VTVSS
T017000959	24	D	W	Q	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYQGQGT LVTVSS
T017000960	25	D	W	V	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYVGQGTL VTVSS
T017000961	26	D	W	K	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK

[0354]

					NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYKGQGTL VTVSS
T017000962	27	D	W	S	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYSGQGTL VTVSS
T017000963	28	D	W	G	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYGGQGTL VTVSS
T017000964	29	D	W	P	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYPGQGTL VTVSS
T017000965	30	D	W	F	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYFGQGTL VTVSS
T017000966	31	D	W	T	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYTGQGTL VTVSS
T017000967	32	D	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000974	33	E	Y	W	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGW YRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDES KNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGT LVTVSS
T017000975	34	D	W	W	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGW YRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDES

[0355]

					KNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQG TLVTVSS
T017000976	35	R	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYARSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000977	36	V	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000978	37	E	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000979	38	A	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAASAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000980	39	Q	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000981	40	S	Y	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYASSAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGTL VTVSS
T017000982	41	E	Y	Y	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYYGQGTLV TVSS
T017000991	42	E	Y	W	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGW YRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDES

[0356]

					KNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIYPYDYWGQGT LVTVSS
T017000992	43	E	A	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIAPYDYWGQGTL VTVSS
T017000993	44	E	P	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIPPYDYWGQGTL VTVSS
T017000994	45	E	D	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIDPYDYWGQGTL VTVSS
T017000995	46	E	Q	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPYDYWGQGT LVTVSS
T017000996	47	E	E	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIEPYDYWGQGTL VTVSS
T017000997	48	E	R	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIRPYDYWGQGTL VTVSS
T017000998	49	E	F	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIFPYDYWGQGTL VTVSS
T017000999	50	E	S	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK

[0357]

					NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRISPYDYWGQGTL VTVSS
T017001000	51	E	G	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIGPYDYWGQGTL VTVSS
T017001001	52	E	T	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRITPYDYWGQGTL VTVSS
T017001002	53	E	H	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIHPYDYWGQGTL VTVSS
T017001003	54	E	V	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIVPYDYWGQGTL VTVSS
T017001004	55	E	K	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIKPYDYWGQGTL VTVSS
T017001005	56	E	L	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRILPYDYWGQGTL VTVSS
T017001006	57	E	I	W	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWY RQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESK NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIIPYDYWGQGTL VTVSS

[0358]

[0359] [표 A-5] ISVD 변이체의 CDR 영역의 서열 (카바트 정의에 따름)

TCE ISVD	CDR1		CDR2		CDR3	
서열 번호	서열 번호	서열	서열 번호	서열	서열 번호	서열
1	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
2	79	INFYG	152	HISIGDQTDYANSAKG	167	LSRIWPYDY
3	79	INFYG	153	HISIGDQTDYAPSAKG	167	LSRIWPYDY
4	79	INFYG	154	HISIGDQTDYAKSAKG	167	LSRIWPYDY
5	79	INFYG	155	HISIGDQTDYARSAKG	167	LSRIWPYDY
6	79	INFYG	156	HISIGDQTDYAISAKG	167	LSRIWPYDY
7	79	INFYG	157	HISIGDQTDYATSAKG	167	LSRIWPYDY
8	79	INFYG	158	HISIGDQTDYAHSAKG	167	LSRIWPYDY
9	79	INFYG	159	HISIGDQTDYAVSAKG	167	LSRIWPYDY
10	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	167	LSRIWPYDY
11	79	INFYG	161	HISIGDQTDYAASAKG	167	LSRIWPYDY
12	79	INFYG	162	HISIGDQTDYAYSAKG	167	LSRIWPYDY
13	79	INFYG	163	HISIGDQTDYALSAKG	167	LSRIWPYDY
14	79	INFYG	164	HISIGDQTDYAQSAKG	167	LSRIWPYDY
15	79	INFYG	165	HISIGDQTDYAFSAKG	167	LSRIWPYDY
16	79	INFYG	166	HISIGDQTDYASSAKG	167	LSRIWPYDY
17	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
18	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
19	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
20	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
21	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
22	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
23	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
24	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
25	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY

[0360]

26	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
27	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
28	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
29	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
30	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
31	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
32	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	168	LSRIYPYDY
33	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	168	LSRIYPYDY
34	79	INFYG	151	HISIGDQTDYADSAKG	167	LSRIWPYDY
35	79	INFYG	155	HISIGDQTDYARSAKG	168	LSRIYPYDY
36	79	INFYG	159	HISIGDQTDYAVSAKG	168	LSRIYPYDY
37	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	168	LSRIYPYDY
38	79	INFYG	161	HISIGDQTDYAASAKG	168	LSRIYPYDY
39	79	INFYG	164	HISIGDQTDYAQSAKG	168	LSRIYPYDY
40	79	INFYG	166	HISIGDQTDYASSAKG	168	LSRIYPYDY
41	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	168	LSRIYPYDY
42	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	168	LSRIYPYDY
43	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	169	LSRIAPYDY
44	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	170	LSRIPPYDY
45	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	171	LSRIDPYDY
46	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	172	LSRIQPYDY
47	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	173	LSRIEPYDY
48	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	174	LSRIRPYDY
49	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	175	LSRIFPYDY
50	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	176	LSRISPYDY
51	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	177	LSRIGPYDY
52	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	178	LSRITPYDY
53	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	177	LSRIHPYDY
54	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	178	LSRIVPYDY

[0361]

55	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	179	LSRIKPYDY
56	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	180	LSRILPYDY
57	79	INFYG	160	HISIGDQTDYAESAKG	181	LSRIIPYDY

[0362]

[0363] 달리 나타내거나 정의하지 않는 한, 사용된 모든 용어는 당업계에서 통상적인 의미를 가지며, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press), F. Ausubel et al. (1987, Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York), Lewin (1985, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), Old et al. (1981, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2nd Ed.) University of California Press, Berkeley, CA), Roitt et al. (2001, Immunology

(6th Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh), Roitt et al. (2001, Roitt's Essential Immunology (10th Ed.) Blackwell Publishing, UK), and Janeway et al. (2005, Immunobiology (6th Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York)과 같은 표준 핸드북, 뿐만 아니라 본원에 인용된 일반적인 배경 기술을 참조한다.

[0364] 달리 지시되지 않는 한, 구체적으로 상세하게 기술되지 않은 모든 방법, 단계, 기술 및 조작은 당업자에게 분명한 바와 같이, 그 자체로 공지된 방법으로 수행될 수 있으며 수행되었다. 예를 들어, 본원에 언급된 표준 안내서 및 일반적인 배경기술 및 그 안에 인용된 추가의 참고문헌, 및 예를 들어 다음의 리뷰(Presta (2006, Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56), Levin and Weiss (2006, Mol. Biosyst. 2(1): 49-57), Irving et al. (2001, J. Immunol. Methods 248(1-2): 31-45), Schmitz et al. (2000, Placenta 21 Suppl. A: S106-12), Gonzales et al. (2005, Tumor Biol. 26(1): 31-43)를 참조하며, 이는 면역글로불린과 같은 단백질의 특이성 및 기타 원하는 특성을 개선하기 위한 친화도 성숙 및 기타 기술과 같은 단백질 조작 기술을 기술한다.

[0365] 본원에서 사용되는 용어 "서열"은 (예를 들어 "면역글로불린 서열", "항체 서열", "가변 도메인 서열", "VHH 서열" 또는 "단백질 서열"과 같은 용어에서) 문맥에서 더 제한된 해석을 요구하지 않는 한, 일반적으로 해당 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 핵산 또는 뉴클레오티드 서열을 모두 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0366] "아미노산 서열"은 문맥에 따라 단일 아미노산 또는 2개 이상의 아미노산의 비분지 서열을 의미하는 것으로 해석된다. 뉴클레오티드 서열은 3개 이상의 뉴클레오티드의 비분지 서열을 의미하는 것으로 해석된다.

[0367] 아미노산은 자연 발생 단백질에서 일반적으로 발견되는 L-아미노산이며, 표 B-1에 열거되어 있다. D-아미노산을 함유하는 아미노산 서열은 이 정의에 포함되지 않는다. 번역 후 변형된 아미노산을 함유하는 임의의 아미노산 서열은 변형된 위치와 함께 표 B-1에 표시된 기호를 사용하여 초기에 번역된 아미노산 서열로 기술될 수 있으며; 예를 들어, 히드록실화 또는 글리코실화, 그러나 이러한 변형은 아미노산 서열에 명시적으로 표시되지 않아야 한다. 서열 변형 결합, 가교 및 말단 캡, 비-펩티딜 결합 등으로 발현될 수 있는 임의의 펩티드 또는 단백질이 이 정의에 포함된다.

[0368] 용어 "단백질", "펩티드", "단백질/펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서 전반에 걸쳐 상호교환적으로 사용되며, 각각은 본 명세서의 목적을 위해 동일한 의미를 갖는다. 각 용어는 2개 이상의 아미노산의 선형 사슬로 이루어진 유기 화합물을 지칭한다. 화합물은 10개 이상의 아미노산; 25개 이상의 아미노산; 50개 이상의 아미노산; 100개 이상의 아미노산, 200개 이상의 아미노산, 심지어 300개 이상의 아미노산을 가질 수 있다. 당업자는 폴리펩티드와 단백질을 구별하는 아미노산의 수에 대한 당해 분야에서 인식된 컷오프 포인트가 없지만 폴리펩티드가 일반적으로 단백질보다 더 적은 아미노산을 포함하고; 폴리펩티드가 화학적 합성 또는 재조합 방법으로 제조될 수 있고; 단백질이 일반적으로 당업계에 공지된 재조합 방법에 의해 시험관내 또는 생체내에서 제조된다는 것을 이해할 것이다.

[0369] 문맥상 달리 명확하게 요구되지 않는 한, 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 "포함하다", "포함하는" 등의 단어는 배타적이거나 총망라한 의미가 아니라 포괄적인 의미로 해석되어야 하며; 즉, "포함하지만 이에 제한되지는 않는다"는 의미이다.

[0370] 예를 들어, 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 각각 또다른 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드를 "포함" 하거나, 또는 또다른 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드로 "본질적으로 이루어지는" 경우, 이는 후자의 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 각각 첫번째 언급된 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드에 통합되었다는 것을 의미할 수 있지만, 더 일반적으로 이것은 일반적으로 첫 번째 언급된 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 각각 그의 서열 내에 각각 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 스트레치를 포함하고, 첫 번째 언급된 서열이 (예를 들어 본원에 기재된 임의의 적합한 방법에 의해) 실제로 생성되거나 획득된 방법에 관계없이 각각 후자의 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 가짐을 의미한다. 비제한적인 예로서, 본 기술의 폴리펩티드가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다고 하는 경우, 이는 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인 서열이 본 기술의 폴리펩티드의 서열에 통합되었음을 의미할 수 있지만, 더 일반적으로 이것은 일반적으로 본 기술의 폴리펩티드가 어떻게 생성 또는 획득되었는지에 관계없이 본 발명의 폴리펩티드가 그의 서열 내에 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열을 함유한다는 것을 의미한다. 또한, 핵산 또는 뉴클레오티드 서열이 또다른 뉴클레오티드 서열을 포함한다고 하는 경우, 처음 언급된 핵산 또는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게는 발현 생성물(예를 들어, 폴리펩티드)로 발현될 때, 후자의 뉴클레오티드 서열로 암호화되는 아미노산 서열은 상기 발현 생성물의 일부를 형

성하도록 한다(즉, 후자의 뉴클레오티드 서열은 처음 언급한 것과 동일한 리딩 프레임, 더 큰 핵산 또는 뉴클레오티드 서열임).

[0371] 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 “본질적으로 이루어진다”고 할 경우, 상기 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 면역글로불린 단일 가변 도메인과 정확하게 동일하거나, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노 말단, 카르복시 말단 또는 아미노 말단과 카르복시 말단 모두에 부가된 제한된 수의 아미노산 잔기, 예컨대 1~20개의 아미노산 잔기, 예를 들어 1~10개의 아미노산 잔기 및 바람직하게는 1~6개의 아미노산 잔기, 예컨대 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 상응함을 의미한다. "이루어지는"이 사용되는 경우, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 면역글로불린 단일 가변 도메인과 정확하게 동일함을 의미한다.

[0372] 본원에서 사용되는 단수형("a", "an", 및 "the")은 문맥에서 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시어를 포함함을 주지해야 한다. 따라서, 예를 들어, "시약"에 대한 지칭은 한 가지 이상의 이러한 상이한 시약을 포함하고, "방법"에 대한 지칭은, 변형될 수 있거나 본원에서 기술된 방법을 대체할 수 있는 당업자에게 공지된 균등한 단계 및 방법에 대한 지칭을 포함한다.

[0373] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소에 선행하는 용어 "적어도"는 그 계열의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 통상적인 실험을 이용하여 본원에서 기술된 본 기술의 구체적인 실시형태에 대한 여러 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물을 본 기술에 포함시키고자 한다.

[0374] 본원에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "및", "또는" 및 "상기 용어로 연결된 요소의 전부 또는 임의의 기타 조합"의 의미를 포함한다.

[0375] 본원에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 15% 이내, 더욱 바람직하게는 10% 이내, 가장 바람직하게는 5% 이내를 의미한다.

[0376] ## 6 실시예

[0377] ### 6.1 실시예 1: T 세포 결합(TCE) ISVD의 생성 및 오프-레이트 결정

[0378] 변이체의 생성

[0379] ISVD T017000700(서열 번호1)의 위치 61, 99, 및 103(카바트 넘버링)의 아미노산을 치환하여 상이한 변이체들을 생성하였으며, 이는 기능 및 전반적인 발달성을 유지하지만 위치 61에서 이성질체화가 감소되거나 전혀 없었고, 부위 99 및/또는 103(카바트 넘버링)에서 산화가 감소되거나 전혀 없었다.

[0380] ISVD T017000700 및 생성된 변이체 ISVD는 상기 표 A-4에 제시되어 있다. 모든 ISVD를 추가 실험에서 분석될 수 있도록 FLAG-HIS-태그(FLAG3-HIS6, 서열 번호 77)로 표지하였다.

[0381] 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 오프-레이트 결정

[0382] TCE ISVD 변이체에 의한 TCRαβ에 대한 결합을 ProteOn XPR36 기기(BioRad Laboratories, Inc.) 또는 SPR-32 기기(Bruker Daltonics SPR)에서 SPR 기반 분석에 의해 재조합 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 해리 속도 상수(kd)를 결정함으로써 평가하였다.

[0383] *ProteOn XPR36에서의 설정*

[0384] 인간 TCRαβ-지퍼 단백질(huTCR(2XN9)-지퍼, 자체 생산)에 대한 미정제 추출물 1가 TCE-FLAG3-HIS6 ISVD 작제물의 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)(Bio-rad Laboratories, Inc., ProteOn XPR36)에 의해 조사하였다. 표적을 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 GLC 센서 칩(짧은 매트릭스, 정상 용량)에 고정시켰다. ISVD 작제물의 미정제 추출물을 1:10 희석으로 (이중으로) 주사하여 결합 파라미터를 평가하였다. 각 ISVD를 120초 동안 주사하고, 해리를 600초 동안 평가하였다.

[0385] 참조 분석물 레인 및 블랭크 완충제 주입을 차감하여 데이터를 이중 참조하였다. ProteOn Manager 3.1.0(Bio-rad Laboratories, Inc., 버전 3.1.0.6)을 사용하여 Langmuir 1:1 상호작용 모델을 적용하여 각 상호작용에 대한 오프-레이트 상수(kd)를 계산하였다.

[0386] *SPR-32에서의 설정*

[0387] 인간 TCRαβ-지퍼 단백질(huTCR(2XN9)-지퍼, 자체 생산)에 대한 미정제 추출물 1가 TCE-FLAG3-HIS6 ISVD 작제물의 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)(Bruker Daltonics SPR, SPR-32)에 의해 조사하였다. 표적을 표준 아민

커플링 화학을 사용하여 고용량 아민(HCA) 센서 칩에 고정시켰다. ISVD 작제물의 미정제 추출물을 1:10 희석으로 주사하여 결합 파라미터를 평가하였다. 각 ISVD를 120초 동안 주사하고, 해리를 600초 동안 평가하였다.

[0388] 참조 스폿 및 블랭크 완충제 주사를 차감하여 데이터를 이중 참조하였다. SPR-32 분석기 소프트웨어(Bruker Daltonics SPR, 버전 3.2.0.19)를 사용하여 Langmuir 1:1 상호작용 모델을 적용하여 각 상호작용에 대한 오프-레이트 상수(kd)를 계산하였다.

[0389] 측정 결과는 표 1 내지 표 3에서 볼 수 있다.

[0390] **[표 1] 인간 TCR-지퍼 단백질에 대한 위치 61(카바트 넘버링)에서의 TCE ISVD 변이체 및 참조 TCE ISVD 작제물의 SPR 기반 오프-레이트 결정**

				인간 TCRαβ-지퍼	
ISVD ID	Res 61	Res 99	Res 103	kd (1/s)	참조 대비 kd 비
T017000946	A	W	W	3.8E-04	1.0
T017000945	E	W	W	3.6E-04	1.0
T017000950	F	W	W	3.5E-04	0.9
T017000943	H	W	W	3.3E-04	0.9
T017000941	I	W	W	3.4E-04	0.9
T017000939	K	W	W	3.5E-04	1.0
T017000948	L	W	W	3.3E-04	0.9
T017000937	N	W	W	3.3E-04	0.9
T017000938	P	W	W	3.6E-04	1.0
T017000949	Q	W	W	3.8E-04	1.0
T017000940	R	W	W	3.8E-04	1.0
T017000951	S	W	W	3.9E-04	1.0
T017000942	T	W	W	3.4E-04	0.9
T017000944	V	W	W	3.8E-04	1.0
T017000947	Y	W	W	3.5E-04	0.9
T017000700 (참조)	D	W	W	3.7E-04	1.0

[0391]

[0392] 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, SPR 기반 오프-레이트 결정에 의해 평가된 바와 같이, 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 위치 61(카바트 넘버링)에서의 치환을 갖는 TCE ISVD 변이체의 결합은 테스트된 모든 작제물, 즉, 위치 61에 아미노산 잔기 A, E, F, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, Y를 갖는 작제물에 대해 참조(T017000700)와 매우 유사한 수준에서 유지된다.

[0393] **[표 2] 인간 TCR-지퍼 단백질에 대한 E로 고정된 위치 99 및 위치 61(카바트 넘버링)에서의 TCE ISVD 변이체, 및 참조 TCE ISVD 작제물의 SPR 기반 오프-레이트 결정**

				인간 TCRαβ-지퍼	
ISVD ID	**Res 61**	**Res 99**	**Res 103**	**kd (1/s)**	참조 대비 **kd** 비
T01700978	E	Y	W	4.3E-04	1.4
T017000992	E	A	W	7.0E-03	23
T017000994	E	D	W	7.6E-03	24
T017000996	E	E	W	1.1E-02	37
T017000998	E	F	W	6.8E-04	2
T017001000	E	G	W	3.1E-03	10
T017001002	E	H	W	1.0E-03	3
T017001006	E	I	W	1.5E-02	49
T017001004	E	K	W	2.5E-03	8
T017001005	E	L	W	2.3E-03	8
T017000993	E	P	W	3.4E-02	109
T017000995	E	Q	W	1.9E-02	61
T017000997	E	R	W	1.9E-03	6
T017000999	E	S	W	3.8E-03	12
T017001001	E	T	W	4.2E-03	14
T017001003	E	V	W	6.3E-03	20
T017000700 (참조)	D	W	W	3.1E-04	1.0

[0394]

[0395] 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 위치 99(카바트 넘버링)에서의 치환을 갖는 TCE ISVD 변이체의 결합을 잔기 61이 글루탐산(E)으로 고정된 작제물에서 테스트하였다. SPR 기반 오프-레이트 결정에서, 테스트된 모든 변이체, 즉, 위치 99에 잔기 Y, A, D, E, F, G, H, I, K, L, P, Q, R, S, T, V를 갖는 변이체는 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 검출가능한 결합 수준을 유지하였지만, 참조 T017000700과 비교할 경우 최대 대략 100배 더 빠른 오프-레이트 범위를 가졌다.

[0396] **[표 3] 인간 TCR-지퍼 단백질에 대한 위치 103(카바트 넘버링)에서의 TCE ISVD 변이체 및 참조 TCE ISVD 작제물의 SPR 기반 오프-레이트 결정**

				인간 TCRαβ-지퍼	
ISVD ID	**Res 61**	**Res 99**	**Res 103**	**kd (1/s)**	참조 대비 **kd** 비
T017000953	D	W	A	2.0E-04	0.5
T017000954	D	W	E	3.7E-04	1.0
T017000965	D	W	F	3.8E-04	1.0
T017000963	D	W	G	결합 없음	결합 없음
T017000957	D	W	H	2.7E-04	0.7
T017000958	D	W	I	2.5E-04	0.7
T017000961	D	W	K	3.4E-04	0.9
T017000956	D	W	L	2.4E-04	0.6
T017000964	D	W	P	결합 없음	결합 없음
T017000959	D	W	Q	2.6E-04	0.7
T017000952	D	W	R	4.7E-04	1.3
T017000962	D	W	S	3.6E-04	1.0
T017000966	D	W	T	3.1E-04	0.8
T017000960	D	W	V	2.5E-04	0.7
T017000955	D	W	Y	4.4E-04	1.2
T017000700 (참조)	D	W	W	3.8E-04	1.0

[0397]

[0398] 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, SPR 기반 오프-레이트 결정에 의해 평가된 바와 같이, 인간 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 카바트 위치 103에서의 치환을 갖는 TCE ISVD 변이체의 결합은 위치 103에 아미노산 잔기 A, E, F, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, Y를 갖는 작제물의 경우 참조 T017000700과 매우 유사한 수준에서 유지되지만, 위치 103에 아미노산 잔기 G 또는 P를 갖는 작제물에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다.

[0399] SPR 분석 결과에 기반하여, 참조 T017000700의 서열에서 위치 61, 99 및 103(카바트 넘버링) 중 하나 이상에서 아미노산을 치환하는 경우 TCR에 결합하는 기능적 ISVD가 수득될 수 있다는 결론을 내릴 수 있다.

[0400] 생성된 다수의 ISVD를 선택하였고, 추가 실험에서 추가로 분석하였으며, 이는 이하에서 논의될 것이다.

[0401] **6.2 실시예 2: TCE ISVD 변이체의 생물물리학적 특성(Tm, Tagg 및 올리고머화)의 결정**

[0402] 열 이동 분석(TSA)에서 용융 온도의 결정

[0403] 열 이동 분석(TSA)을 LightCycler 480II 기계(Roche)의 96-웰 플레이트에서 수행하였다. 행당 하나의 ISVD를 다음 pH에서 분석하였다: 4, 5, 6, 7, 8 및 9. 웰당 5 µL의 ISVD 샘플(PBS 중 0.8 mg/mL)을 5 µL의 Sypro Orange(MilliQ 물 중 40배, Invitrogen 카탈로그 번호 S6551) 및 10 µL의 완충제(100 mM 포스페이트, 100 mM 보레이트, 100 mM 시트레이트 및 115 mM NaCl, pH 범위 3.5 내지 9)에 첨가하였다. 적용된 온도 구배(0.03℃/s의 속도로 37~99℃)는 소수성 패치가 노출되는 ISVD의 전개를 유도한다. Sypro Orange는 이러한 소수성 패치에 결합하여, 형광 강도(Ex/Em = 465/580 nm)를 증가시킨다. pH 7에서 형광 강도 곡선의 1차 도함수의 변곡점은 용융 온도의 척도 역할을 한다.

[0404] 응집 온도 결정의 개시(Tagg 분석)

[0405] ISVD 단백질이 응집하기 시작하는 온도(= 응집 개시 온도 = Tagg)를 DynaPro 플레이트 판독기(Wyatt)를 사용하여 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정하였다. 이를 위해, 이. 콜라이(*E. coli*)에서 생산되고, IMAC, 그 후 정제용 SEC를 통해 정제되고, 여과된(0.22 µm) 3xFLAG-HIS6 태그(서열 번호 77)를 갖는 ISVD를 1 mg/mL(D-PBS)의 농도로 사용하였다. 해동 후, 샘플을 0.1 µm 막 상에서 여과하고, 14000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 30 µL(4회 반복)의 샘플을 광 산란 강도의 연속 기록과 함께 0.25℃/분의 일정한 속도로 40℃에서 80℃까지 가열

하였다. 측정된 강도로부터 유도된 유체역학적 반경을 온도에 대해 플롯팅하여 반경이 증가하기 시작한 온도(= Tagg, ℃)를 결정하였다.

[0406] 올리고머화 분석

[0407] 스트레스 조건(45℃에서 1주) 하의 1가 ISVD의 올리고머화 경향을 분석용 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)로 조사하였다. 이를 위해, 이. 콜라이에서 생산되고, IMAC, 그 후 정제용 SEC를 통해 정제되고, 여과된(0.22 μm) 3xFLAG-HIS6 태그를 갖는 ISVD를 1 mg/mL(DPBS)의 농도로 사용하였다. 2개의 100 μL 분취물의 SE-HPLC 프로파일을 비교하였다: 하나의 샘플을 -20℃에서 1주 동안 인큐베이션하고 다른 샘플을 45℃에서 1주 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 20000 RCF에서 5분 동안 원심분리에 의해 제거하고, 이어서 Acquity UPLC BEH200 SEC(이동상 750 mM L-아르기닌 HCl + 10 mM 포스페이트 pH 7.0, 유속 0.4 mL/분)에서 분석하였다. 스트레스를 받은 샘플(+45℃) 및 스트레스를 받지 않은 샘플(-20℃)의 상대적인 피크 전 면적의 차이를 계산하고, Δ% 올리고(= % 올리고 1W 45℃ - % 올리고 T0)로 보고하였다.

[0408] 결과

[0409] 위치 61, 99 및 103에서 선택된 아미노산 치환(카바트 넘버링)을 갖는 TCE ISVD의 정제된 변이체(표 A-4 참조)를 표 4 및 5에 예시된 바와 같이 45℃에서 1주 후 용융 온도(Tm), 응집 개시(Tagg) 및 올리고머화 측면에서 특성화하였다.

[0410] TCE ISVD의 위치 61에서, 아미노산 잔기 변이체 A, E, P, Q, R, S, V가 선택되었는데, 이는 이들이 인간 VH 유전자에서 이 위치에서 가장 빈번하게 발생하는 잔기이기 때문이다.

[0411] TCE ISVD의 위치 99에서, 아미노산 잔기 변이체 A, H, Q, S, T, 및 Y가 선택되었다. Y는 TCRαβ에 대한 결합에 대해 각각의 ISVD 변이체의 오프-레이트에 가장 적게 영향을 미치는 잔기이기 때문에 선택되었다(표 2). 잔기 A, H, Q, S, T는 각각의 TCE ISVD가 TCRαβ에 대한 결합에 대한 상이한 오프-레이트의 범위를 나타내기 때문에 선택되었다.

[0412] 인간 VH 유전자 및_자연 발생 ISVD의 대략 95%에서[서열의 자체 분석] 트립토판(W)이 카바트 위치 103에서 발견된다. 자연 발생 ISVD의 위치 103에서 발견될 수 있는 다른 잔기는 Y, R 및 S이다. 따라서, 위치 103의 아미노산 잔기 변이체에 대해 Y, R 및 S가 선택되었다.

[0413] **[표 4] 위치 61 및 99에서의 TCE ISVD 변이체, 및 참조 TC017000700의 생물물리학적 특성 (Tm, Tagg 및 올리고머화)**

ISVD ID	Tm	참조 대비 ΔTm (℃)	Tagg	참조 대비 Δtagg (℃)	Δ% 올리고	참조 대비 Δ% 올리고
T017000700	72.0	-	68	-	0.2	-
T017000938	72.0	0.0	66	-2	1.0	0.8
T017000940	68.6	-3.4	60	-8	0.9	0.7
T017000944	72.0	0.0	61	-7	0.9	0.7
T017000945	72.5	0.5	68	0	0.6	0.4
T017000946	70.0	-2.0	64	-4	0.7	0.5
T017000949	69.6	-2.4	64	-4	1.1	0.9
T017000951	70.0	-2.0	63	-5	1.0	0.8
T017000967	72.0	0.0	73	5	0.4	0.2
T017000975	73.4	1.4	71	3	1.5	1.3
T017000976	69.6	-0.4	64	-4	0.9	0.7
T017000977	70.5	-1.5	65	-3	1.6	1.4
T017000978	73.0	1.0	71	3	0.0	-0.2
T017000979	71.5	-0.5	68	0	1.7	1.5
T017000980	70.5	-1.5	67	-1	0.1	-0.1
T017000981	70.5	-1.5	68	0	1.3	1.1
T017000992	73.0	1.0	73	5	0.2	0.0
T017000995	71.0	-1.0	73	5	0.1	-0.1
T017000999	72.0	0.0	72	4	0.1	-0.1
T017001001	71.0	-1.0	68	0	0.3	0.1
T017001002	72.0	0.0	69	1	0.2	0.0

[0414]

[0415] [표 5] 위치 103에서의 TCE ISVD 변이체, 및 참조 TC017000700의 생물물리학적 특성 (Tm, Tagg 및 올리고머화)

ISVD ID	Tm (℃)	참조 대비 ΔTm (℃)	Tagg (℃)	참조 대비 ΔTagg (℃)	Δ% 올리고
T017000982	64.7	-7.3	61	7	0.1
T017000955	63.2	-8.8	57	11	0.3
T017000952	56.9	-15.1	48	20	0.2
T017000962	59.3	-12.7	53	15	0.3

[0416]

[0417] 표 4에서 볼 수 있는 바와 같이, T017000978, T017000992, T017000999 및 T017001002는 참조 T017000700과 비교하여 3가지 특성 모두를 유지하거나 개선하였다. Tm의 경우 0℃ 내지 1℃ 증가가 관찰되었고, Tagg의 경우 1℃ 내지 5℃ 증가가 관찰되었으며, 참조에 대해 0.2%에서 본 기술에 따른 ISVD에 대해 0.0% 또는 0.1%까지의 올리고머 분획의 감소가 관찰되었다.

[0418] 놀랍게도, 표 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 위치 103에서의 ISVD 변이체의 TCR 결합은 영향을 받지 않았지만, 이 위치에서의 치환은 참조 ISVD와 비교하여 용융 온도를 7.3℃ 내지 15.1℃ 감소시키고, 응집 개시 온도를 7℃ 내지 20℃ 감소시켰다. 이는 W103이 TCE ISVD의 생물물리학적 안정성에 중요할 수 있음을 시사한다.

[0419] 결과적으로, 앞으로 나아가면서, 트립토판을 위치 103에서 유지하면서, 위치 61 및 99의 아미노산 잔기를 변화

시키기로 결정하였다.

[0420] **6.3 실시예 3: 인간 및 사이노몰구스 TCRαβ 단백질에 대한 TCE ISVD 변이체의 친화도 결정**

[0421] 인간 TCRαβ-지퍼 단백질(huTCR(2XN9)-지퍼, 자체 생산) 및 사이노몰구스 TCRαβ-지퍼 단백질(cyTCR(AEA41865)-지퍼, 자체 생산)에 대한 정제된 1가 TCE-FLAG3-HIS6 및 TCE-HIS6 ISVD 작제물의 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)(Bio-rad Laboratories, Inc., ProteOXPR36)에 의해 조사하였다. 두 표적 모두 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 GLC 센서 칩(짧은 매트릭스, 정상 용량)에 고정시켰다. ISVD 작제물을 다중-사이클 동역학(MCK) 실험에서 6가지 상이한 농도로 주사하였다. ISVD의 각 농도를 120초 동안 주사하고, 해리를 600초 동안 평가하였다.

[0422] 참조 분석물 레인 및 블랭크 완충제 주사를 차감하여 데이터를 이중 참조하였다. ProteOn Manager 3.1.0(Bio-rad Laboratories, Inc., 버전 3.1.0.6) 소프트웨어를 사용하여 Langmuir 1:1 상호작용 모델을 적용하여 친화도 상수(ka, kd 및 K_D)를 계산하였다.

[0423] 인간 및 사이노몰구스 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 TCE ISVD 아미노산 변이체의 친화도 측정 결과는 하기 표 6 및 7에 요약되어 있다. 참조로서 T017000700을 사용하였다.

[0424] **[표 6] 인간 TCR-지퍼 융합 단백질 결합에 대한 TCE ISVD 변이체, 및 참조 T017000700의 SPR 기반 동역학 결정**

	인간 TCRα β-지퍼			
ISVD ID	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**K_D (M)**	참조 대비 **K_D** 비
T017000700	1.3E+05	3.7E-04	2.5E-09	1.0
T017000938	1.7E+05	3.6E-04	2.1E-09	0.9
T017000940	2.0E+05	3.8E-04	1.9E-09	0.8
T017000944	1.6E+05	3.8E-04	2.3E-09	0.9
T017000945	1.6E+05	3.6E-04	2.3E-09	0.9
T017000946	1.7E+05	3.8E-04	2.3E-09	0.9
T017000949	1.8E+05	3.8E-04	2.1E-09	0.9
T017000951	1.6E+05	3.9E-04	2.5E-09	1.0
T017000967	1.1E+05	4.8E-04	4.4E-09	1.8
T017000975	1.4E+05	5.5E-04	3.8E-09	1.5
T017000976	1.5E+05	5.7E-04	3.9E-09	1.6
T017000977	1.1E+05	5.2E-04	4.5E-09	1.8
T017000978	1.1E+05	5.2E-04	5.0E-09	2.0
T017000979	1.1E+05	5.6E-04	4.9E-09	2.0
T017000980	1.3E+05	5.5E-04	4.1E-09	1.7
T017000981	1.2E+05	5.3E-04	4.4E-09	1.8
T017000995	3.3E+04	3.3E-02	1.0E-06	404
T017000999	3.8E+04	5.3E-03	1.4E-07	56
T017001001	2.5E+04	8.6E-03	3.5E-07	141

[0425]

[0426] **[표 7] 사이노몰구스 TCR-지퍼 융합 단백질 결합에 대한 TCE ISVD 변이체, 및 참조 T017000700의 SPR 기반 동역학 결정**

	사이노 TCRαβ-지퍼				
ISVD ID	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**K_D (M)**	참조 대비 **K_D** 비	**K_D** 비 **cy/huTCR**
T017000700	2.2E+05	1.8E-03	8.0E-09	1.0	3.3
T017000938	2.8E+05	1.9E-03	6.7E-09	0.8	3.2
T017000940	3.2E+05	1.9E-03	6.1E-09	0.8	3.2
T017000944	2.8E+05	1.9E-03	7.0E-09	0.9	3.0
T017000945	2.6E+05	1.8E-03	7.1E-09	0.9	3.1
T017000946	2.7E+05	1.9E-03	7.0E-09	0.9	3.1
T017000949	2.8E+05	1.9E-03	6.8E-09	0.8	3.2
T017000951	2.6E+05	2.0E-03	7.4E-09	0.9	3.0
T017000967	2.0E+05	2.8E-03	1.4E-08	1.7	3.1
T017000975	2.3E+05	3.4E-03	1.5E-08	1.8	3.9
T017000976	2.3E+05	3.5E-03	1.5E-08	1.9	3.9
T017000977	1.8E+05	3.5E-03	1.9E-08	2.4	4.3
T017000978	1.7E+05	3.3E-03	2.0E-08	2.5	4.0

[0427]

T017000979	1.8E+05	3.5E-03	1.9E-08	2.3	3.8
T017000980	2.1E+05	3.4E-03	1.7E-08	2.1	4.0
T017000981	2.1E+05	3.5E-03	1.7E-08	2.1	3.8
T017000995	4.7E+04	9.3E-02	2.0E-06	246	2.0
T017000999	5.1E+04	1.8E-02	3.5E-07	43	2.5
T017001001	3.2E+04	3.4E-02	1.1E-06	133	3.1

[0428]

[0429] 표 6 및 7에서 볼 수 있는 바와 같이, T017000995, T017000999, 및 T017001001을 제외하고, 모든 테스트된 작제물에 대해, TCE ISVD 변이체의 친화도는 참조 TCE ISVD와 대등하게 유지된다(2.5배 이내의 K_D 값).

[0430] 각 ISVD는 인간 TCRαβ 단백질보다 사이노몰구스 TCRαβ 단백질에서 2 내지 4배 더 높은 K_D를 나타낸다. 이는 본 기술에 따른 ISVD가 인간 치료적 응용에서 개발 및 사용될 가능성이 있음을 나타낸다.

[0431] **6.4 실시예 4: 정제된 1차 인간 T 세포에 대한 1가 TCE ISVD의 결합**

[0432] 본 기술에 따른 TCE ISVD를 유세포 분석에서 인간 T 세포에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 하기 ISVD를 테스트하였다: T017000700(참조), T017000978, T017000995, T017000999, 및 T017001001. 음성 대조군도 추가되었다. 염색되지 않은 세포(US), GaM-PE로만 염색된 세포 및 ANTI-FLAG® M2 항체 및 GaM-PE(a-FLAG + GaM-PE)로만 염색된 세포는 음성 대조군으로 포함되었다.

[0433] 간략하게 말해서, 세포를 수확하고 V-바닥 96-웰 플레이트로 옮기고(50 µL 중 웰당 5x1E4개 세포), 2% FBS(Sigma, F7524) 및 0.05% 아지드나트륨(Acros Organics, 19038)이 포함된 FACS 완충제(D-PBS(Gibco,14190))에서 4℃에서 3.5시간 동안 TCE ISVD의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다.

[0434] 이후, 세포를 3회 세척하고, 1 µg/mL 단클론 ANTI-FLAG® M2 항체(Sigma, F1804)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 다시 세척하고, 1/100 희석된 R-피코에리트린 접합된 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항-마우스 IgG, Fc γ 단편 스페시픽(Jackson Immunoresearch, 115-116-071; GaM-PE로 지칭됨)과 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0435] 이어서, 생존 세포와 사멸 세포를 구별하기 위해 5 nM TO-PRO®-3 요오드화물(642661)(Life Technologies - Molecular Probes, T3605)이 보충된 FACS 완충제에 세포를 재현탁하였다. 염색 후, FlowLogic 소프트웨어를 사용하여 MACSQuant® 유세포 분석기(Miltenyi)를 사용하여 세포를 분석하였다. 먼저, 전체 세포 집단의 80% 초과를 나타내는 P1 집단을 FSC-SSC 분포에 기반하여 선택하였다. 이 집단으로부터, TO-PRO®-3 요오드화물 양성(사멸) 세포를 제외하고, 평균 형광 강도 PE 값을 계산하였다.

[0436] 측정 결과는 도 1에서 볼 수 있다. 예상된 바와 같이, TCE ISVD가 없는 대조군 조건에 대해 인간 T 세포의 염색은 관찰되지 않았다. 또한, 측정된 평균 형광 강도에 기반하여, 이 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, T017000978은 참조 T017000700과 대등한 염색을 갖는다. 변이체 T017000995, T017000999, 및 T017001001은 표 6에 제시된 바와 같이 지퍼 단백질에 대해 결정된 결합 친화도에 상응하는 훨씬 더 낮은 염색을 갖는다.

[0437] **6.5 실시예 5: TCE-CD123-ALB 작제물의 생성**

[0438] TCE ISVD 변이체를 CD123에 대해 지정된 종양 고정 ISVD 빌딩 블록 및 9GS 링커에 의해 연결된 인간 혈청 알부민에 대해 지정된 ISVD 빌딩 블록을 갖는 다중특이성 ISVD 작제물로 형식화하였다. TCE 변이체 빌딩 블록을 N-말단 위치(위치 1) 또는 제2 위치(위치 2)에 배치하고; 이어서 항-CD123 빌딩 블록을 각각 위치 2 또는 위치 1에 배치하였다. 모든 작제물에서, 항-인간 혈청 알부민 빌딩 블록을 C-말단 위치 3에 두었다. 위치 61 및 99(카

바트 넘버링)에서의 TCE 빌딩 블록에서의 치환에 추가적으로, 상기 TCE 빌딩 블록의 제1 잔기는, TCE 빌딩 블록이 다중특이성 작제물에서 위치 1에 배치되는 경우, E로 유지되거나 D로 변경되었다. E1D 돌연변이는 일반적으로 피로글루타메이트 형성을 피하기 위해 도입된다. 생성된 작제물은 하기 표 8에 열거되어 있다. 참조 작제물 T017001017은 참조 TCR 결합 ISVD T017000700을 포함하였다.

[0439] **[표 8] TCE-CD123-ALB 및 CD123-TCE-ALB 작제물의 목록**

CD123-TCE-ALB / TCE-CD123-ALB		작제물에서의 항-TCR ISVD		작제물 내의 TCE 의 카바트 위치 변이체			
샘플 ID	서열 번호	명칭	작제물에서의 TCE 위치	Res1	Res61	Res 99	Res 103
T017001017	58	T017000700	1	E	D	W	W
T017001018	59	T017000978	1	E	E	Y	W
T017001019	60	T017001001	1	E	E	T	W
T017001020	61	T017000999	1	E	E	S	W
T017001021	62	T017000995	1	E	E	Q	W
T017001022	63	T017000975	1	D	D	W	W
T017001023	64	T017000991	1	D	E	Y	W
T017001024	65	T017001001 (E1D)	1	D	E	T	W
T017001025	66	T017000999 (E1D)	1	D	E	S	W
T017001026	67	T017000995 (E1D)	1	D	E	Q	W
T017001027	68	T017000700	2	E	D	W	W
T017001028	69	T017000978	2	E	E	Y	W
T017001029	70	T017001001	2	E	E	T	W
T017001030	71	T017000999	2	E	E	S	W
T017001031	72	T017000995	2	E	E	Q	W

[0440]

[0441] 하기 TCE ISVD 빌딩 블록을 상기 열거된 작제물에 사용하였다:

[0442] T017001017 및 T017001027에 대해, 참조 TCE ISVD T017000700(서열 번호 1)을 사용하였다.

[0443] T017001018 및 T017001028에 대해, T017000978(서열 번호 37)을 사용하였다.

[0444] T017001019, T017001024, 및 T017001029에 대해, T017001001(서열 번호 52)을 사용하였다. T017001024는 TCE ISVD에 E1D 돌연변이를 추가로 함유하였다.

[0445] T017001020, T017001025, 및 T017001030에 대해, T017000999(서열 번호 50)을 사용하였다. T017001025는 TCE ISVD에 E1D 돌연변이를 추가로 함유하였다.

[0446] T017001021, T017001026, 및 T017001031에 대해, T017000995(서열 번호 46)를 사용하였다. T017001026는 TCE ISVD에 E1D 돌연변이를 추가로 함유하였다.

[0447] T017001022에 대해, T017000975(서열 번호 34)를 사용하였다. 이는 E1D 돌연변이를 갖는 T017000700이다.

[0448] T017001023에 대해, T017000991(서열 번호 42)을 사용하였다. 이는 E1D 돌연변이를 갖는 T017000978이다.

[0449] **6.6 실시예 6: 인간 및 사이노몰구스 TCRαβ-지퍼 단백질에 대한 TCE-CD123-ALB 작제물의 친화도 결정**

[0450] 인간 TCRαβ-지퍼 단백질(huTCR(2XN9)-지퍼, 자체 생산) 및 사이노몰구스 TCRαβ-지퍼 단백질(cyTCR(AEA41865)-지퍼, 자체 생산)에 대한 정제된 TCE-CD123-ALB 및 CD123-TCE-ALB ISVD 작제물의 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)(Cytiva, Biacore 8K+)에 의해 조사하였다. 두 표적 모두 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 CM5 센서 칩에 고정시켰다. 총 15개의 ISVD 작제물(표 8)을 다중-사이클 동역학 실험에서 12개의 상이한 농도(20 μM 내지 0.84 nM의 연속 희석)로 주사하였다. ISVD의 각 농도를 180초 동안 주사하고, 해리를 600초 동안 평가하였다.

[0451] 참조 유동 세포(FC) 및 블랭크 완충제 주입을 차감하여 데이터를 이중 참조하였다. Biacore Insight 평가 소프트웨어(Cytiva, 버전 3.0.12.15655)를 사용하여 Langmuir 1:1 상호작용 모델을 적용하여 친화도 상수(ka, Kd 및 K_D)를 계산하였다. 인간 TCRαβ 단백질에 대한 15개의 다가 ISVD 작제물(표 8)의 친화도 측정 결과는 표 9에, 사이노몰구스 TCRαβ 단백질에 대한 결과는 표 10에 요약되어 있다.

[0452] **[표 9] 인간 TCR-지퍼 단백질에 대한 TCE-CD123-ALB 작제물의 친화도 결정**

	인간 TCR-지퍼 단백질에 대한 동역학			
샘플 ID	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	K_D (M)	**T017001017**에 대한 배수 변화 K_D
T017001017	7.7E+04	3.3E-04	4.3E-09	1
T017001018	6.1E+04	4.6E-04	7.6E-09	2
T017001019	1.4E+04	6.9E-03	5.0E-07	116
T017001020	2.3E+04	4.6E-03	2.0E-07	47
T017001021	1.8E+04	2.7E-02	1.5E-06	360
T017001022	8.5E+04	4.4E-04	5.2E-09	1
T017001023	7.2E+04	6.6E-04	9.1E-09	2
T017001024	1.8E+04	1.5E-02	8.7E-07	205
T017001025	2.5E+04	7.0E-03	2.8E-07	65
T017001026	2.5E+04	4.3E-02	1.8E-06	412
T017001027	1.3E+04	5.9E-04	4.5E-08	11
T017001028	1.1E+04	6.9E-04	6.3E-08	15
T017001029	3.6E+03	1.4E-02	3.8E-06	897
T017001030	6.0E+03	5.6E-03	9.2E-07	216
T017001031	5.5E+03	3.9E-02	7.0E-06	1654

[0453]

[0454] [표 10] 사이노몰구스 TCR-지퍼 단백질에 대한 TCE-CD123-ALB 작제물의 친화도 결정

	사이노몰구스 TCR-지퍼 단백질에 대한 동역학				
샘플 ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)	T017001017에 대한 배수 변화 K_D	K_D 비 cy/huTCR
T017001017	1.2E+05	1.5E-03	1.3E-08	1	2.9
T017001018	1.2E+05	3.9E-03	3.2E-08	3	4.2
T017001019	1.7E+04	2.8E-02	1.6E-06	129	3.3
T017001020	2.8E+04	1.6E-02	5.5E-07	44	2.8
T017001021	2.4E+04	8.2E-02	3.4E-06	274	2.2
T017001022	1.5E+05	2.3E-03	1.5E-08	1	2.9
T017001023	1.9E+05	7.0E-03	3.7E-08	3	4.1
T017001024	2.2E+04	5.1E-02	2.4E-06	189	2.7
T017001025	3.0E+04	2.3E-02	7.8E-07	63	2.8
T017001026	2.9E+04	1.1E-01	3.9E-06	313	2.2
T017001027	3.0E+04	5.8E-03	1.9E-07	15	4.3
T017001028	1.6E+04	6.5E-03	4.0E-07	32	6.4
T017001029	5.3E+03	4.8E-02	9.1E-06	728	2.4
T017001030	7.5E+03	2.7E-02	3.6E-06	286	3.9
T017001031	8.7E+03	1.5E-01	1.8E-05	1402	2.5

[0455]

[0456] 표 9 및 표 10은 본 기술에 따른 TCE ISVD 변이체가 작제물에 사용되는 경우 TCR에 결합하는 능력을 보유함을 보여준다. 이는 본 기술에 따른 TCE ISVD 변이체가 표적화 ISVD와 조합으로 사용될 수 있음을 나타낸다. 따라서, 이들은 표적-특이적 치료적 적용에서의 개발 및 사용에 적합하다.

[0457] 6.7 실시예 7: 정제된 1차 인간 T 세포에 대한 TCE-CD123-ALB ISVD 작제물에 의한 결합의 결정

[0458] 1차 인간 T 세포에 대한 본 기술에 따른 TCE-CD123-ALB ISVD 작제물에 의한 용량 의존적 결합을 유세포 분석을 사용하여 결정하였다. 하기 작제물을 사용하였다: T017001017(참조), T017001018, T017001019, T017001020, 및 T017001021. 염색되지 않은 세포(US), GaM-PE로만 염색된 세포 및 ABH0074 및 GaM-PE로만 염색된 세포(ABH0074 + Gam-PE)는 음성 대조군으로 포함되었다.

[0459] 간략하게 말해서, 세포를 수확하여 V-바닥 96-웰 플레이트로 옮기고(50 µL 중 웰당 5x1E4개 세포), 2% FBS(Sigma, F7524) 및 0.05% 아지드화나트륨(Acros organics, 19038))가 포함된 FACS 완충제(D-PBS (Gibco,14190)에서 4℃에서 2.5시간 동안 TCE-CD123-ALB ISVD 작제물의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다.

[0460] 이후, 세포를 3회 세척하고, 10 µg/mL 항-VHH mAb(자체 제조됨)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 다시 세척하고, 1/100 희석된 R-피코에리트린 접합된 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항-마우스 IgG, Fc γ 단편 스페시픽(Jackson Immunoresearch, 115-116-071)과 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 5 nM TO®-PRO -3 요오드화물(642/661)이 보충된 FACS 완충액(Life Techn. - Molecular Probes, T3605)를 사용하여 생존 세포와 사멸 세포를 구별하였다. 염색 후, FlowLogic 소프트웨어를 사용하여 MACSQuant® 유세포 분석기(Miltenyi)를 사용하여 세포를 분석하였다. 먼저, 전체 세포 집단의 80% 초과를 나타내는 P1 집단을 FSC-SSC 분포에 기반하여 선택하였다. 이 집단으로부터, TO-PRO®-3 요오드화물 양성(사멸) 세포를 제외하고, 평균 형광 강도 PE 값을 계산하였다.

[0461] 측정의 결과는 도 2에 제시되어 있다. 예상된 바와 같이, TCE ISVD가 없는 대조군 조건에 대해서는 인간 T 세포의 염색이 관찰되지 않았다. 또한, 이 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, T017001018(TCE ISVD T017000978을 포함함) 및 참조 T017001017(TCE ISVD T017000700을 포함함)은 인간 T 세포와 유사한 EC50으로 결합한다.

T017001019(TCE ISVD T017000995를 포함함), T017001020(TCE ISVD T017000999를 포함함), 및 T017001021(TCE ISVD T017001001을 포함함)은 다른 한편으로 인간 T 세포에 대해 더 낮은 결합 친화도를 갖는다. 이는 표 9에 제시된 바와 같이 지퍼 단백질에 대해 관찰된 결합에 상응한다.

[0462] **6.8 실시예 8: 다중특이성 TCE-CD123-ALB 작제물은 T 세포 매개 표적 세포 살해를 유도한다**

[0463] 유세포 분석 기반 세포독성 분석

[0464] ISVD 작제물을 이펙터 세포 및 비부착성 표적 세포로서 인간 1차 T 세포를 사용한 유세포 분석 기반 세포독성 분석에서 재정시된 T 세포 매개 살해에 대해 특성화하였다. 제조업체의 지침에 따라 PKH26 적색 형광 세포 링커 키트(Sigma, PKH26GL-1KT)를 사용하여 4 μM PKH26 막 염료로 표적 세포를 표지하였다. 이펙터 세포(2.5 x 105개 세포/웰) 및 PKH 표지된 표적 세포(2.5 x 104개 세포/웰)를 표적 세포주의 분석 배지(1% 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, 15140) 및 30 μM Alburex HSA(CSL Behring, 2160-679)를 갖는 표적 성장 배지)에서 96-웰 V-바닥 플레이트(Greiner Bio-one, # 651 180)(이펙터 대 표적 비율 10:1)에서 공동-인큐베이션하였다. 농도 의존적 세포 용해의 분석을 위해, 표적 분석 배지에서 ISVD 작제물의 연속 희석액을 세포에 첨가하고, 5% CO2 분위기에서 18시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 원심분리에 의해 펠릿화하고 FACS 완충제(10% FBS(Sigma, F7524) 및 0.05% 아지드화나트륨(Acros organics, 19038)이 포함된 D-PBS(Gibco,14190))로 세척하였다. 이어서, 생존 세포와 사멸 세포를 구별하기 위해 5 nM TO-PRO®-3 요오드화물(642661)(ThermoFisher Scientific, T3605)이 보충된 100 μL FACS 완충제에 세포를 재현탁하였다. MACSQuant X 유세포 분석기(Miltenyi Biotec)를 사용하여 세포를 분석하였다. 샘플당 70 μL의 총 샘플 부피를 획득하였다. PKH26 양성 세포에 게이팅을 설정하고, 이 집단 내에서, TO-PRO®-3 양성 세포를 결정하였다. 비용해(specific lysis) %= ((% TO-PRO-3+작제물 미포함 - % TO-PRO-3+작제물 포함)/ % TO-PRO-3+작제물 미포함)) x100. ISVD가 상기 기술된 바와 같이 HSA로 완전히 포화되도록 하기 위해, 과량의 HSA 존재 하에서 분석을 실행하였다.

[0465] 결과

[0466] T 세포 관여자로서의 TCE ISVD 변이체의 기능성을 평가하기 위해, 표 8에 열거된 TCE-CD123-ALB 형식을 상기 기술된 바와 같이 30 μM HSA의 존재 하에tj CD123 발현 인간 MOLM-13 표적 세포주와 조합된 인간 1차 T 세포(2명의 공여자)를 사용한 유세포 분석 기반 T 세포 매개 MOLM-13 세포 살해 분석에서 평가하였다. 이들 결과의 그래프 예시는 도 3a 내지 도 3f에 도시되어 있다. 표적 세포 살해에 대한 계산된 EC50 값은 표 11에 제시되어 있다.

[0467] **[표 11] 30 μM HSA의 존재 하에서 10:1의 이펙터 대 표적 비를 사용한 유세포 분석 기반 인간 T 세포 매개 MOLM-13 세포 살해 검정에서 TCE-CD123-ALB 작제물의 EC50 (M)**

		MOLM-13 고갈	
샘플 **ID**	작제물에서의 **TCE** 위치	공여자 **#1 EC50 (M)**	공여자 **#2 EC50 (M)**
T017001017	1	4.5E-11	9.2E-11
T017001018	1	3.3E-11	1.0E-10
T017001019	1	1.5E-10	5.2E-10
T017001020	1	4.7E-11	2.3E-10
T017001021	1	2.3E-10	2.1E-09
T017001022	1	1.5E-11	1.4E-10
T017001023	1	2.4E-11	1.1E-10
T017001024	1	1.8E-10	9.8E-10
T017001025	1	6.6E-11	3.4E-10
T017001026	1	3.4E-10	4.4E-09
T017001027	2	5.7E-10	2.8E-09
T017001028	2	6.7E-10	3.2E-09
T017001029	2	음성	음성
T017001030	2	5.8E-09	음성
T017001031	2	음성	음성

[0468]

[0469] 표 11 및 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, TCE 빌딩 블록이 표적 세포의 N-말단 위치(위치 1)에 있었던 모든 작제물은 강력한 표적 세포의 세포 살해를 매개하였다. 또한, 글루탐산으로부터 아스파르트산으로의 TCE ISVD의 제1 위치에서의 돌연변이는 작제물의 살해 효력에 유의하게 영향을 미치지 않았다. 또한, 작제물의 N-말단 위치에 TCE ISVD를 갖는 것은 작제물의 제2 위치에 동일한 TCE ISVD를 배치하는 것과 비교한 경우 증가된 효력을 초래하는 것으로 보인다.

[0470] 놀랍게도, TCR 지퍼 단백질 및 인간 T 세포에 대한 친화도가 다른 작제물보다 더 낮은 TCE ISVD, T017001001, T01700999, 및 T017000995를 각각 함유하는 ISVD 작제물 T017001019, T017001020 및 T017001021은 표적 세포 살해에 대한 높은 효력을 갖는다. 실제로, 인간 TCR 지퍼 단백질뿐만 아니라 인간 T 세포에서 관찰된 친화도가 참조보다 40배 이상 더 낮았지만(표 6 및 9 및 도 1 및 2 참조), 표적 세포 살해에 대한 효력은 유의하게 다르지 않았다.

[0471] 종양 관련 표적에 대한 친화도와 비교하여 T 세포 수용체에 대한 낮은 친화도는 T 세포 풍부 2차 림프구 조직 대비 종양 조직으로의 분포에 중요하다는 것이 보고되었다. 종양 조직의 우선적 표적화는 T 세포 매개 표적 제거를 감소시키는 것이 바람직하다.

[0472] 따라서 TCR에 대한 친화도가 낮고 표적 세포 살해에 대한 효력이 높은 이러한 특정 ISVD 작제물은 높은 효력을 유지하지만 더 높은 종양 조직 노출로 인해 더 낮은 수준으로 투여될 수 있는 T 세포 관여 생물치료제를 생성하기 위한 고유한 가능성을 제공할 수 있으며, 이는 결국 독성 위험을 감소시킬 수 있다.

[0473] 결론적으로, 본 기술에 따른 TCE ISVD 변이체는 인간에서 표적-특이적 치료적 적용을 위한 작제물에서 사용하기에 매우 적합하다.

[0474] **6.9 실시예 9: KG-1a 세포의 다중특이성 TCE-CD123-ALB 작제물-유도 인간 및 사이노몰구스 T 세포 매개 표적 세포 살해**

[0475] TCE-CD123-ALB ISVD 작제물이 종양 세포를 살해할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 이펙터 세포로서 단리된 인간 또는 사이노몰구스 T 세포를 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. ISVD 작제물 T017001017, T017001018, T017001019, T017001020, 및 T017001021을 테스트하였다. T017000968(서열 번호 75)은 음성 대조군으로 포함되었다. T017000968은 항-TCR ISVD T017000975 및 알부민 결합 ISVD를 포함하지만, 항-CD123 ISVD는 포함하지 않

는다.

[0476] 유세포 분석 기반 분석에서 TCE-CD123-ALB 작제물에 의한 CD123 표적 세포의 재지정된 T 세포 매개 살해

[0477] RosetteSep (StemCell Technologies, 15061)을 사용하여 건강한 지원자로부터의 버피 코트(Buffy Coat) 혈액(Blood bank Gent)으로부터 인간 T 세포를 수집한 후, 제조업체의 지침에 따라 Ficoll-PaqueTM PLUS(GE Healthcare, 17-1440-03)에서 농축시켰다. 정제된 인간 T 세포의 품질 및 순도는 유세포 분석법으로 항-CD3 (eBioscience, 12-0037-73), 항-CD8 (BDBiosciences, 555367), 항-CD4 (BD Biosciences, 345771), 항-CD45RO (BD Biosciences, 555493), 항-CD45RA (BDBiosciences, 550855), 항-CD19 (BDBiosciences, 555413), 항-CD25 (BDBiosciences, 557138) 및 항-CD69 (BDBiosciences, 557050) 형광 표지된 항체로 체크하였다. 세포를 액체 질소에서 동결시켰다.

[0478] 제조업체의 지침에 따라 범 T 세포 단리 키트(Miltenyi, 130-091-993)를 사용하여 PBMC(Ficoll 밀도 원심분리를 통해 단리됨)로부터 사이노몰구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis))로부터의 T 세포를 자체로(Sanofi, 프랑스 몽펠리에) 단리하였다. 세포를 액체 질소에서 동결시켰다.

[0479] 제조업체의 지침에 따라 PKH26 적색 형광 세포 링커 키트(Sigma, PKH26GL-1KT)를 사용하여 4 μM PKH-26 막 염료로 인간 CD123 발현 KG1a 세포를 표지하였다. 2.5x1E5개의 이펙터(즉, 인간 또는 사이노몰구스 1차 T 세포) 및 2.5x1E4개의 표적 세포(즉, PKH-표지된 KG1a 세포)를 96-웰 V-바닥 플레이트에서 공동-인큐베이션하였다(이펙터 대 표적 비는 10:1임). 농도-의존적 세포 용해의 측정을 위해, 30 μM HSA(CSL Behring, Alburex 20 인간 혈청 알부민)를 갖는 분석 배지에서 TCE-CD123-ALB 작제물의 연속 희석액을 세포에 첨가하고, 37℃에서 5% CO2 분위기에서 18시간 동안 인큐베이션하였다.

[0480] 인큐베이션 후, 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고, 5 nM TO-PRO®-3 요오드화물(642/661)이 보충된 FACS 완충제(Life Techn. - Molecular Probes, T3605)를 사용하여 생존 세포와 사멸 세포를 구별하였다. MACSQuant® 유세포 분석기(Miltenyi)를 사용하여 세포를 분석하였다. PKH26 양성 세포에 게이팅을 설정하고, 이 집단 내에서, TO-PRO®-3 요오드화물 양성 세포를 결정하였다.

[0481] 결과

[0482] 결과는 하기 표 12 및 도 4에서 볼 수 있다.

[0483] **[표 12] 유세포 분석 기반 T 세포 매개 KG-1a 세포 살해 분석에서의 TCE-CD123-ABL 작제물**

샘플 ID	효력 (M) – 인간 T 세포	효력 (M) – 사이노 T 세포
T017001017	2.1E-10	3.9E-11
T017001018	2.7E-10	4.0E-11
T017001019	2.3E-09	7.4E-10
T017001020	7.6E-10	2.3E-10
T017001021	5.7E-09	9.4E-10
T017000689	-	-

[0484]

[0485] 표 12 및 도 4로부터 볼 수 있는 바와 같이, 모든 TCE ISVD 작제물은 인간 및 사이노 T 세포 둘 모두로 KG-1a 세포를 살해하는 데 있어서 강력하였다. 예상된 바와 같이, 음성 대조군 작제물 T017000689는 세포 살해를 나타내지 않았다.

[0486] 낮은 친화도 TCE ISVD T017001019, T017001020, 및 T017001021은 또한 KG1-a 세포 살해 분석에서 높은 효력을 가졌다. 이는, 실시예 8에 언급된 바와 같이, 낮은 친화도 항-TCR 빌딩 블록을 갖는 이들 TCE 작제물이 T 세포 관여 생물치료제로서 유의한 잠재력을 가짐을 추가로 뒷받침한다.

[0487] 더욱이, 테스트된 모든 TCE-CD123-ALB 형식에 대해, 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하는 형식 각각에 대해 관찰된 매개된 세포독성 활성은 사이노몰구스 T 세포에 의해 매개된 활성과 매우 유사하였다.

[0488] 따라서, 이러한 세포 살해 분석은 본 기술에 따른 TCE ISVD 변이체가 인간에서의 표적-특이적 치료적 적용을 위한 작제물에서 사용하기에 매우 적합함을 것을 추가로 뒷받침한다.

[0489] **6.10 실시예 10: TCE-GPC3-GPC3-ALB 융합물의 기능성**

[0490] TCE-GPC3-GPC3-ALB 융합물의 생성

[0491] TCE ISVD 변이체를 글리피칸-3(GPC3)에 대해 지정된 2개의 종양 고정 ISVD 빌딩 블록 및 5GS 및 9GS 링커에 의해 연결된 인간 혈청 알부민에 대해 지정된 ISVD 빌딩 블록을 갖는 다중특이성 ISVD 작제물로 형식화하였다. TCE 빌딩 블록의 첫 번째 잔기를 D로 변경하였다. 생성된 작제물은 하기 표 13에 열거되어 있다. 참조 작제물(A022600427)은 참조 TCR 결합 ISVD T017000975(E1D 돌연변이를 갖는 T017000700; 서열 번호 34), 글리피칸-3에 대해 지정된 2개의 종양 고정 ISVD 빌딩 블록(GPC3) 및 인간 혈청 알부민 결합 ISVD를 포함하였다. 음성 대조군(T017000698)은 항-GPC3 ISVD 빌딩 블록을 포함하지 않았다.

[0492] 임피던스-기반 세포독성 분석

[0493] ISVD 작제물은 인간 또는 사이노몰구스 1차 이펙터 T 세포 및 부착성 표적 세포를 사용하는 임피던스-기반 세포독성 검정(예를 들어 WO 2018091606A1에 기술된 바와 같음)에서 재지정된 T 세포 매개 살해를 특성화하였다. xCELLigence 기기(Roche)를 사용하여 전극 표면에 대한 표적 세포의 부착에 의해 유도된 임피던스의 변화를 측정하였다. T 세포는 비부착성이므로 임피던스 측정에 영향을 미치지 않는다. xCELLigence® RTCA MP 기기는 전기 임피던스의 변화를 정량화하여, 세포 지수라는 무차원 파라미터로 표시하며, 이는 세포로 덮힌 조직-배양 웰의 총 면적에 정비례한다. 96 E-플레이트(ACEA Biosciences; 05 232 368 001)의 각 웰에 50 µL의 120 µM Alburex HSA(CSL Behring, 2160-679)를 첨가하여 분석 배지(표적 세포 성장 배지 + 1% 페니실린/스트렙토마이신(Life technologies Cat#15140))에서 30 µM의 최종 농도를 갖도록 하였다. 외부 웰은 사용하지 않고 200 µL 배지 또는 D-PBS로 채웠다. 96 E-플레이트를 xCELLigence® 스테이션(5% CO2의 37℃ 인큐베이터)에 놓고, 단일 측정을 수행하여 세포가 없는 분석 배지의 배경 임피던스를 측정하였다. 이어서, 분석 배지의 50 µL 표적 세포(2 x 1E4개 세포/웰)를 96 E-플레이트에 시딩하고, 분석 배지의 연속 희석된 ISVD 작제물 용액(4X 농도) 50 µL를 첨가하였다. (최종 부피 = 200 µL). 실온에서 30분 후, 분석 배지의 50 µL의 1차 T 세포(3 x 1E5개 세포/웰)를 웰당 첨가하여 15:1의 이펙터 대 표적 비를 달성하였다. 플레이트를 xCELLigence® 스테이션에 놓고 4일 동안 15분마다 임피던스를 측정하였다. 데이터를 고정된 시점(60시간)에서 분석하였다.

[0494] 생성된 작제물은 하기 표 13에 제시되어 있다.

[0495] **[표 13] TCE-GPC3-GPC3-ALB 및 대조군 작제물의 목록**

[0496]

작제물 ID	TCE ISVD ID	서열 번호
A022600427	T017000975	73
A022600462	T017000991	74
T017000698	T017000975	75

[0497] 결과

[0498] TCE ISVD 변이체 T017000991(서열 번호 42)을 종양 앵커 GPC3(글리피칸-3)에 대한 2개의 ISVD 빌딩 블록 및 GS 링커에 의해 연결된 알부민에 대해 지정된 ISVD 빌딩 블록을 갖는 융합 작제물에서 참조 T017000975(서열 번호 34)와 비교하였다. 음성 대조군으로서, GPC3 결합 ISVD가 없는 작제물을 생성하였다(T017000698, 표 13). 양성 대조군으로서, GPC3 결합 이중특이적 항체를 생성하였다. 이 항체의 한 아암은 GPC3에 결합하고 다른 아암은 CD3에 결합한다. 결과의 그래프 예시는 도 5a 내지 도 5d에 도시되어 있다. 표적 세포 살해에 대한 계산된 IC50 값은 표 14에 제시되어 있다.

[0499] **[표 14] 30 µM HSA의 존재 하에서 15:1의 이펙터 대 표적 비를 사용한 임피던스 기반 인간 및 사이노몰구스 T 세포 매개 HuH-7 세포 살해 분석에서의 TCE-GPC3-GPC3-ALB 작제물의 IC50 (M)**

	TCE-GPC3-GPC3-ALB 매개 HuH-7 고갈			
샘플 **ID**	인간 공여자 **#1 IC50 (M)**	인간 공여자 **#2 IC50 (M)**	사이노몰구스 공여자 **#1 IC50 (M)**	사이노몰구스 공여자 **#2 IC50 (M)**
A022600427	3.0E-10	1.1E-10	2.3E-08	2.5E-10
A022600462	2.8E-10	1.0E-10	3.9E-09	2.2E-10
T017000698	음성	불량한 곡선 적합	음성	음성
양성 대조군	1.0E-10	1.5E-10	6.0E-11	2.5E-11

[0500]

[0501] GPC3-결합 ISVD에 융합된 TCE 빌딩 블록을 갖는 2개의 작제물에 대한 IC50 값은 인간 또는 사이노몰구스 T 세포를 사용한 경우 대등하다. 예상된 바와 같이, GPC3-결합 ISVD가 없는 작제물, 즉, 인간 혈청 알부민-결합 ISVD에 융합된 TCRαβ-결합 ISVD만이 세포 살해의 임의의 수준을 매개하지 않았거나 단지 낮은 수준만을 매개하였다.

[0502] **6.11 실시예 11: TCE ISVD의 화학적 안정성 평가**

[0503] 본 기술에 따른 TCE ISVD의 화학적 안정성을 평가하기 위해 T017000991(서열 번호 42)을 사용하여 강제 분해 연구를 수행하고, HIS6-태그가 부착된(서열 번호 78) 참조 T017000975(서열 번호 34)와 비교하였다.

[0504] 연구는 각각 가속화된 조건 및 스트레스 조건을 모방하는, 10 mM의 H_2O_2를 이용한 강제 산화 및 25℃ 및 40℃에서의 4주 인큐베이션 기간으로 이루어졌다. 스트레스 테스트 후, T017000991의 안정성을 트립신 분해를 사용한 펩티드 맵핑, 역상 크로마토그래피 및 질량 분광법 MS/MS 검출에 의한 펩티드 분리에 의해 분석하였다. 분자의 하기 변형을 스크리닝하였다: 탈아미드화, 이성질체화/라세미체화 및 메티오닌 또는 트립토판 산화. T017000991의 서열 최적화의 값을 평가하기 위해, 화학적 변형을 갖는 ISVD의 화학적 안정성을 참조 T017000975와 비교하였다.

[0505] 결과

[0506] 상이한 온도 조건에 대한 펩티드 맵핑 분석의 결과는 하기 표 15에 제시되어 있다.

[0507] [표 15] 온도 스트레스 후 T017000991 및 T017000975(대조군)의 트립신 펩티드 지도 분석의 비교.

				T017000975에 대한 펩티드 %			T017000991에 대한 펩티드 %		
단편 표지	펩티드	서열 번호	변형자 (카바트 넘버링)	T0	Δ 4w 25℃	Δ 4w 40℃	T0	Δ 4w 25℃	Δ 4w 40℃
T7	VAHISIGDQTDYADSAK	182	이성질체화 D61	1.0	+0.3	+2.1	N.D.	N.D.	N.D.
T11	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR	183	탈아미드화 N82a	1.1	0.0	+0.4	1.1	+0.1	+0.2
T11	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR	183	탈아미드화 N82a	0.5	+0.2	+1.0	0.7	+0.1	+0.7
T11	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR	183	산화 M82	1.6	+1.2	+0.5	1.4	-0.1	+2.8
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSAAAHHHHHHH	184	산화 W99	0.6	+0.2	+0.3	N.D.	N.D.	N.D.

[0508]

[0509] 강제 산화 조건 하에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 서열 커버리지는 두 분자 모두에 대해 약 85%였다. AspN 분해와 조합하여, 두 분자 모두에 대해 100% 서열 커버리지를 얻었다. 추가 변형은 검출되지 않았다.

[0510] T017000975에서 2개의 화학적 부하가 확인되었다: D61은 이성질체화되기 쉬움, 및 W99는 산화되기 쉬움(카바트 넘버링). 앞서 언급한 바와 같이, 이들 2개의 민감한 아미노산을 T017000991(D61E, W99Y)에서 치환하여, 평가된 조건 하에서 본 기술에 따른 TCE ISVD에서 이들 2개의 부하를 완전히 제거하였다.

[0511] 결과적으로, 본 기술에 따른 TCE ISVD의 화학적 안정성은 참조 TCE ISVD와 관련하여 개선되었다.

[0512] 6.12 실시예 12: 형식화된 ISVD 작제물의 일부로서의 TCE ISVD의 화학적 안정성

[0513] 본 기술에 따른 TCE ISVD의 안정성의 개선을 추가로 입증하기 위해, 형식화된 ISVD 작제물의 일부로서 T017000991의 화학적 안정성을 분석하였다.

[0514] 단기 저장 연구를 수행하였다. T017000991 및 T017000975(대조군으로서)를 인간 혈청 알부민에 결합하는 2개의 항-GPC3 ISVD 및 ISVD로 형식화하였다. 결과는 하기 표 16에 제시되어 있다.

[0515] [표 16]

ISVD 작제물 ID	서열 번호	형식
A022600424	76	T017000975-GPC3-GPC3-ALB
A022600462	74	T017000991-GPC3-GPC3-ALB

[0516]

[0517] 형식화된 분자를 적합한 제형 완충제와 함께 액체로 저장한 경우 저장 동안 트립토판 산화 및 아스파르트산 이성질체화가 관찰되었다.

[0518] 그 때 트립토판 산화율은 pH, 온도, ISVD 농도, 전이 금속, 및 폴리소르베이트 20에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 임의의 잠재적 산화 사건을 가속화하기 위해, 스트레스 연구를 수행하였다. 스트레스 조건은 플라스틱 튜브에서 3개월 동안 40℃/75% 상대 습도(RH) ± 5%RH에서 인큐베이션하고, 산화제로서 100 ppm의 Fe(II)를 첨가하는 것으로 이루어졌다.

[0519] 이 연구를 위해, 두 ISVD 작제물 모두를 25 mM 히스티딘-HCl에서 1 mg/mL로 제형화하고, 8%(w/v) 수크로스, 0.01%(w/v) pH 6.5 완충제 및 25℃/60%RH ± 5%RH에서의 안정성을 또한 3개월의 기간에 걸쳐 모니터링하였다.

[0520] 안정성 프로파일을 트립토판 산화의 표시로서 <10의 상대적 체류 시간(RRT)을 갖는 피크 후 역상 크로마토그래피 및 트립신 분해 및 역상 LC-MS/MS 후 펩티드 맵핑에 의해 모니터링하였다.

[0521] 결과

[0522] 결과의 그래프 예시는 도 6에서 볼 수 있으며, 이는 역상 크로마토그래피에 의한 RRT<1.0으로의 피크 후의 25℃에서의 안정성 프로파일을 보여준다. A022600424와 비교하여 A022600462의 산화율에 대한 감소가 관찰되었으며, 트립토판 산화의 5배 감소가 있었다.

[0523] 스트레스 조건 하에서 안정성 프로파일을 평가하는 동안 유사한 경향이 관찰될 수 있다(도 7). 제형 용액에의 Fe(II)의 첨가는 폴리소르베이트 20 및 히스티딘의 존재 하에서 ISVD 작제물의 산화율을 촉매하였다. 40℃에서 1일 인큐베이션한 후, A022600462의 산화율은 대조군 A022600424와 비교하여 약 4배 더 낮았다. 더 낮은 산화율은 14일의 강제 분해 조건 후에도 여전히 가시적이었다.

[0524] 펩티드 맵핑을 사용하여 아미노산 서열에서 상이한 산화 사건이 발생하는 위치를 정확하게 결정하였다. 온도 스트레스 안정성에 대한 샘플을 분석하고, 이 목적을 위해 비교하였다. 트립신 소화 후, 서열의 거의 85%가 생성된 펩티드에 의해 커버될 수 있다. 질량 분광계(MS) 상의 Biopharma Finder 소프트웨어(BPF; 버전 3.2)를 사용하여 상이한 펩티드를 확인하고 이들에 대한 화학적 변형을 설명할 수 있었다. 결과는 펩티드 번호 13, 보다 정확하게는 W99(A022600424) 및 W103(A022600424 및 A022600462)에 위치한 TCE ISVD 상의 것인, 선택된 형식 상에 트립토판 산화의 상이한 부위가 있음을 보여주었다. 결과는 도 8에 제시되어 있다.

[0525] 저장 안정성 연구로부터의 샘플의 펩티드 맵핑 분석은 트립토판 W99가 이전 서열로부터 제거되었기 때문에 A022600424와 비교한 경우 A022600462에 대한 전체 산화율이 훨씬 더 낮다는 것을 보여주었다. 제2 트립토판 상의 산화율은 안정적으로 유지되는 것으로 보이며, 포맷에 존재하는 다른 빌딩 블록에서의 트립토판 산화는 도입된 아미노산 치환에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 예상대로, D61 잔기의 제거는 최종 형식에서 이성질체화 책임의 제거를 초래하였다.

[0526] 결론적으로, ISVD에서의 트립토판 산화 및 이성질체화와 관련된 문제들은 관련 위치에서 아미노산을 치환함으로써 극복된 반면, ISVD의 기능성은 유지되었다.

[0527] **7 산업상 이용가능성**

[0528] 폴리펩티드, 이를 코딩하는 핵산 분자, 핵산을 포함하는 벡터 및 본원에 기술된 조성물은 예를 들어 암을 앓고 있는 대상체의 치료에 사용될 수 있다.

[0529] [표 A-6] 서열 목록

명칭	서열 번호	서열
T017000700	1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000937	2	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYANSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000938	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAPSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000939	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAKSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000940	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYARSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000941	6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAISAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000942	7	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYATSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000943	8	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAHSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000944	9	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000945	10	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS

[0530]

T017000946	11	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAASAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000947	12	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAYSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000948	13	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYALSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000949	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000950	15	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAFSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000951	16	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYASSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000952	17	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYRGQGTLVTVSS
T017000953	18	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYAGQGTLVTVSS
T017000954	19	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYEGQGTLVTVSS
T017000955	20	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYYGQGTLVTVSS

[0531]

T017000956	21	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYLGQGTLVTVSS
T017000957	22	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYHGQGTLVTVSS
T017000958	23	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYIGQGTLVTVSS
T017000959	24	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYQGQGTLVTVSS
T017000960	25	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYVGQGTLVTVSS
T017000961	26	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYKGQGTLVTVSS
T017000962	27	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYSGQGTLVTVSS
T017000963	28	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYGGQGTLVTVSS
T017000964	29	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYPGQGTLVTVSS
T017000965	30	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYFGQGTLVTVSS

[0532]

T017000966	31	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYTGQGTLVTVSS
T017000967	32	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000974	33	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSS
T017000975	34	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAPSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000976	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYARSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000977	36	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAVSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000978	37	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000979	38	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAASAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000980	39	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAQSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000981	40	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYASSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS

[0533]

T017000982	41	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYYGQGTLVTVSS
T017000991	42	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
T017000992	43	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIAPYDYWGQGTLVTVSS
T017000993	44	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIPPYDYWGQGTLVTVSS
T017000994	45	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIDPYDYWGQGTLVTVSS
T017000995	46	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIQPYDYWGQGTLVTVSS
T017000996	47	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIEPYDYWGQGTLVTVSS
T017000997	48	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIRPYDYWGQGTLVTVSS
T017000998	49	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIFPYDYWGQGTLVTVSS
T017000999	50	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRISPYDYWGQGTLVTVSS

[0534]

[0535]

T017001000	51	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIGPYDYWGQGTLVTVSS
T017001001	52	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRITPYDYWGQGTLVTVSS
T017001002	53	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIHPYDYWGQGTLVTVSS
T017001003	54	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIVPYDYWGQGTLVTVSS
T017001004	55	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYASAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYC RALSRIKPYDYWGQGTLVTVSS
T017001005	56	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRILPYDYWGQGTLVTVSS
T017001006	57	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIIPYDYWGQGTLVTVSS
T017001017	58	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVV QPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHP FFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPG GSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
T017001018	59	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY

		CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
T017001019	60	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRITPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
T017001020	61	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRISPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
T017001021	62	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIQPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSV

[0536]

		KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001022	63	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVV QPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHP FFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPG GSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS
T017001023	64	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFF ADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001024	65	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRITPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFF ADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001025	66	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRISPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQP

[0537]

[0538]

		GGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFFA DYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR LSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVS S
T017001026	67	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIQPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGYTYYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCATDPYYSSCHPFF ADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
T017001027	68	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKERE GVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAH ISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRAL SRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGG SLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
T017001028	69	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKERE GVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAH ISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRAL SRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS

		VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
T017001029	70	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKERE GVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAH ISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRAL SRITPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
T017001030	71	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKERE GVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAH ISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRAL SRISPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
T017001031	72	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTTLDYYVIGWFRQAPGKERE GVSCISSSDGYTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALY YCATDPYYSSCHPFFADYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAH ISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRAL SRIQPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSS
A022600427	73	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGG

[0539]

		SLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEWVATITNAGVTSYADSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGS YRGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKRELVARIAPGEGTYYGALYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMS WVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
A022600462	74	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYAESAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEWVATITNKGVTSYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGSY RGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKRELVARIAPGEGTYYGALYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMS WVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
T017000698	75	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKERE KVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAY YCRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVV QPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSS QGTLVTVSSA
A022600424	76	VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREK VAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYY CRALSRIWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGFTFSSFAMTWVRRPPGKGLEWVATITNKGVTSYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTALYICANARRTGPRAPTDIGSY RGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIFRSVFSSSTMEWYRQAPGKKRELVARIAPGEGTYYGALYADSVK

[0540]

		GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMS WVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
FLAG3-HIS6 태그	77	AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH
HIS6 태그	78	HHHHHH
TCE ISVD 의 CDR1 (카바트)	79	INFYG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	80	HISIGDQTDYAX$_1$SAKG
TCE ISVD 의 CD3 (카바트)	81	LSRIX$_2$PYDY
TCE ISVD 의 CDR1 (Abm)	82	GYVHKINFYG
TCE ISVD 의 CDR2 (Abm)	83	HISIGDQTD
TCE ISVD 의 CDR3 (Abm)	84	LSRIX$_2$PYDY
TCE ISVD	85	X$_0$VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKER EKVAHISIGDQTDYAX$_1$SAKGRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAA YYCRALSRIX$_2$PYDYX$_3$GQGTLVTVSS
5GS 링커	86	GGGGS
9GS 링커	87	GGGGSGGGS
C-말단 ISVD	88	VTVSS
C-말단 ISVD	89	VKVSS
C-말단 ISVD	90	VQVSS
C-말단 ISVD	91	VTVKS
C-말단 ISVD	92	VTVQS
C-말단 ISVD	93	VKVKS
C-말단 ISVD	94	VKVQS
C-말단 ISVD	95	VQVKS
C-말단 ISVD	96	VQVQS

[0541]

[0542]

C-말단 ISVD	97	VTVSSA
C-말단 ISVD	98	VKVSSA
C-말단 ISVD	99	VQVSSA
C-말단 ISVD	100	VTVKSA
C-말단 ISVD	101	VTVQSA
C-말단 ISVD	102	VKVKSA
C-말단 ISVD	103	VKVQSA
C-말단 ISVD	104	VQVKSA
C-말단 ISVD	105	VQVQSA
인간 TCR 알파 불변 도메인 (P01848 로부터 유래됨)	106	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
인간 TCR 베타 불변 도메인 (P01850 으로부터 유래됨)	107	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
레서스 TCR 알파 (AEA41863)	108	MLLLLVLVLEVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVSVSEGVPVLLRCNYSSSFS PYLFWYVQYPNQGLQLLLKYTSGTTLVKGINGFEAEFKKSETSFHLTK ASAHVSDAAEYFCALARGALVFGKGTRLSVIPNIQNPDPAVYQLRGS KSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKSN GAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPGTESVCDANLVEKSFETD MNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
레서스 TCR 베타 (AEA41864)	109	MGFWTLCCVSFCILVAKHTDAGVIQLPRHEVTEMGKEVTLRCEPISG HSSLFWYRQTMMRGLEFLIYFNNKSPIDDSGMPKDRFSATMPDASF STLKIQPSEPRDSAVYFCASTPGQGREKLFFGSGTQLSVLEDLKKVFPP KVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALEDSRYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFY GLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEVWGRADCGFTSVSYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVSALMLMAMVKRKDF

인간 TCR-지퍼: 알파 사슬	110	MNMRPVTSSVLVLLLMLRRSNGQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSS SVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSS LHITAAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKSVLDMRSMDF KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCSSADLVPRGS TTAPSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQKLISEEDL
인간 TCR-지퍼: 베타 사슬	111	MSNTVLADSAWGITLLSWVTVFLLGTSSADGGITQSPKYLFRKEGQN VTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGY SVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSRSSYEQYFGPGTRLTVTE DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCSSADLVPR GSTTAPSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQTGHHHHHHH HHH
사이노 TCR-지퍼: 알파 사슬 (AEA41865 로부터 유래됨)	112	MLLITSVLVLWMQLSQVNGQQIMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSST TLSNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVKSGEVKKQKRLIFQFGEAKKNSSL HITATQTTDVGTYFCATTGVNNLFFGTGTRLTVLPYIQNPDPAVYQL RGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFK SNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSCSSADLVPRGST TAPSAQLKKKLQALKKKNAQLKWKLQALKKKLAQEQKLISEEDL
사이노 TCR-지퍼: 베타 사슬 (AEA41866 및 AEA41868 로부터 유래됨)	113	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQD MNHDYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGSTEKGEVPDGYNVTRSN TEDFPLRLESAAPSQTSVYFCASSYWTGRSYEQYFGPGTRLTVIEDLKK VFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEV HSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQV QFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADCSSADLVPRGSTTA PSAQLEKELQALEKENAQLEWELQALEKELAQTGHHHHHHHHHH
인간 TCR 알파 불변 도메인 (P01848 로부터 유래됨)	114	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SC

[0543]

인간 TCR 베타 불변 도메인 (P01850 로부터 유래됨)	115	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC
사이노몰구스 TCR-알파 불변 도메인 (AEA41865 로부터 유래됨)	116	PYIQNPDPAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITD KTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPE SSC
사이노몰구스 TCR-베타 불변 도메인 (AEA41868 로부터 유래됨)	117	EDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNH FRCQVQFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADC
Alb8	118	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb8-A	119	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb23	120	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23-A	121	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb83	122	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAT YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb83-A	123	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAT YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

[0544]

[0545]

Alb132	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAT YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb132-A	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAT YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb73	126	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
Alb73-A	127	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	128	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	129	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb199	130	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
Alb199-A	131	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb23002	132	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	133	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

Alb216	134	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSS
Alb216-A	135	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
3A 링커	136	AAA
7GS 링커	137	SGGSGGS
8GS 링커	138	GGGGSGGS
10GS 링커	139	GGGGSGGGGS
15GS 링커	140	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS 링커	141	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS 링커	142	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS 링커	143	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS 링커	144	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS 링커	145	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS 링커	146	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
G1 힌지	147	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1 힌지	148	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
라마 상부 긴 힌지 영역	149	EPKTPKPQPAAA
G3 힌지	150	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE PKSCDTPPPCPRCP
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	151	HISIGDQTDYADSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	152	HISIGDQTDYANSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	153	HISIGDQTDYAPSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	154	HISIGDQTDYAKSAKG

[0546]

TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	155	HISIGDQTDYARSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	156	HISIGDQTDYAISAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	157	HISIGDQTDYATSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	158	HISIGDQTDYAHSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	159	HISIGDQTDYAVSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	160	HISIGDQTDYAESAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	161	HISIGDQTDYAASAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	162	HISIGDQTDYAYSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	163	HISIGDQTDYALSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	164	HISIGDQTDYAQSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	165	HISIGDQTDYAFSAKG
TCE ISVD 의 CDR2 (카바트)	166	HISIGDQTDYASSAKG
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	167	LSRIWPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	168	LSRIYPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	169	LSRIAPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	170	LSRIPPYDY

[0547]

TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	171	LSRIDPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	172	LSRIQPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	173	LSRIEPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	174	LSRIRPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	175	LSRIFPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	176	LSRISPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	177	LSRIGPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	178	LSRITPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	179	LSRIHPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	180	LSRIVPYDY
TCE ISVD 의 CDR3 (카바트)	181	LSRIKPYDY
펩티드 단편 T7	182	VAHISIGDQTDYADSAK
펩티드 단편 T11	183	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR
펩티드 단편 T13	184	IWPYDYWGQGTLVTVSSAAAHHHHHHH
펩티드 단편 T14	185	LSCAASGFTFSSFAMTWVR
펩티드 단편 T16	186	GLEWVATITNK

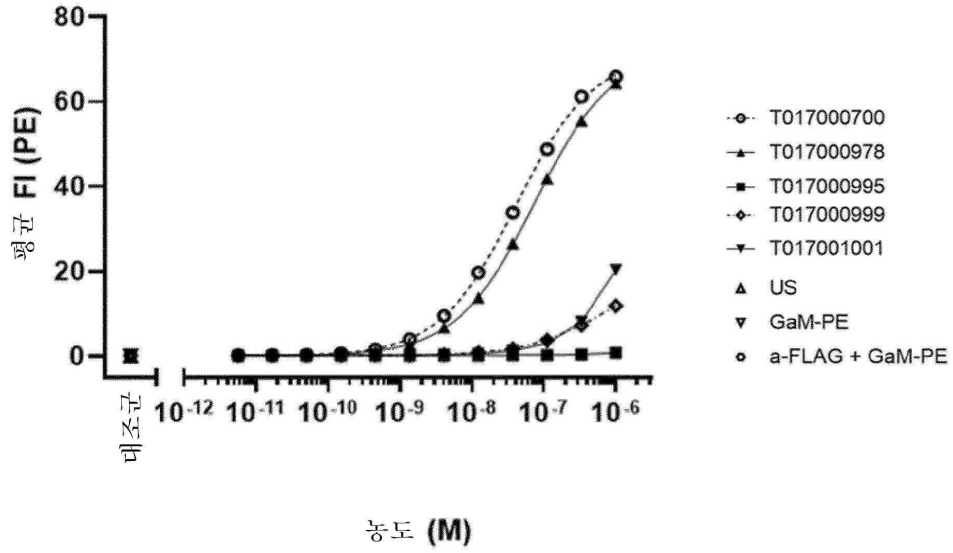
[0548]

펩티드 단편 T27	187	SVFSSSTMEWYR
펩티드 단편 T36	188	NTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS EVQLVESGGGWQPGGS
펩티드 단편 T40	189	GPEWVSSISGSGSDTLYLADSVK

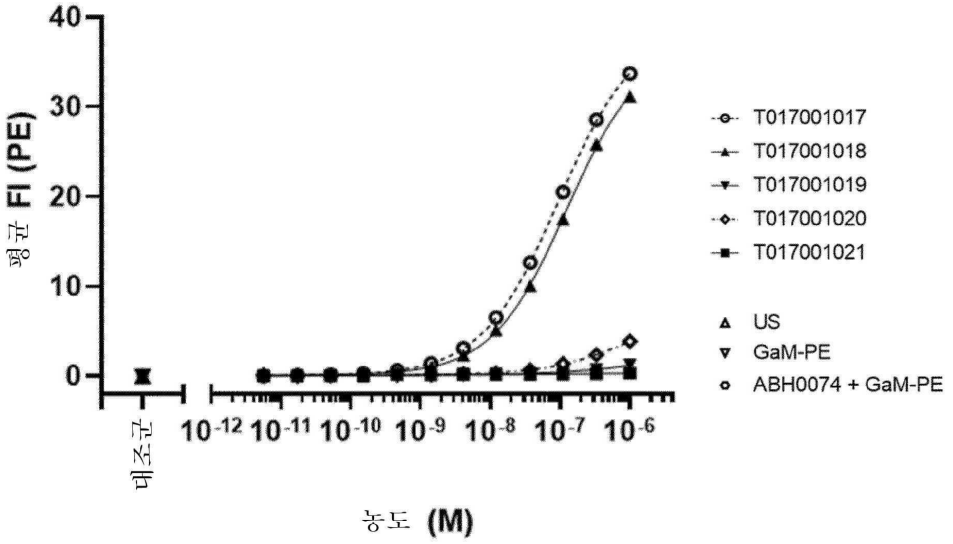
[0549]

도면

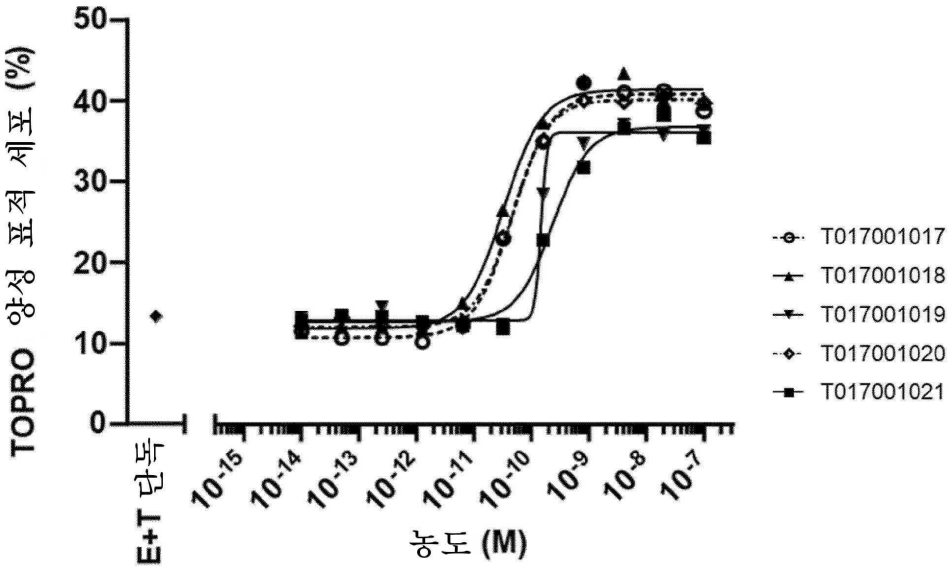
도면1


80
60
40
20
0
평균 FI (PE)
대조군
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000700
T017000978
T017000995
T017000999
T017001001
US
GaM-PE
a-FLAG + GaM-PE

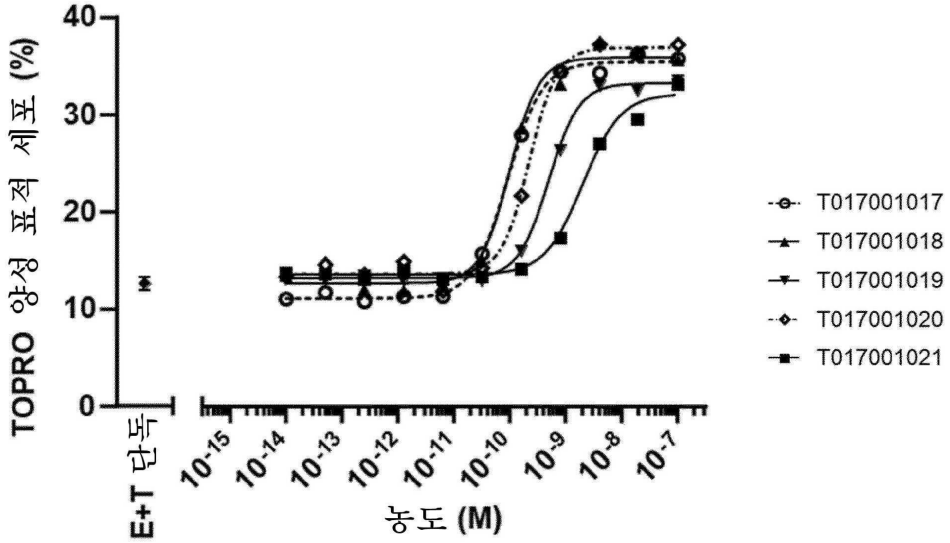
도면2


40
30
20
10
0
평균 FI (PE)
대조군
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017001017
T017001018
T017001019
T017001020
T017001021
US
GaM-PE
ABH0074 + GaM-PE

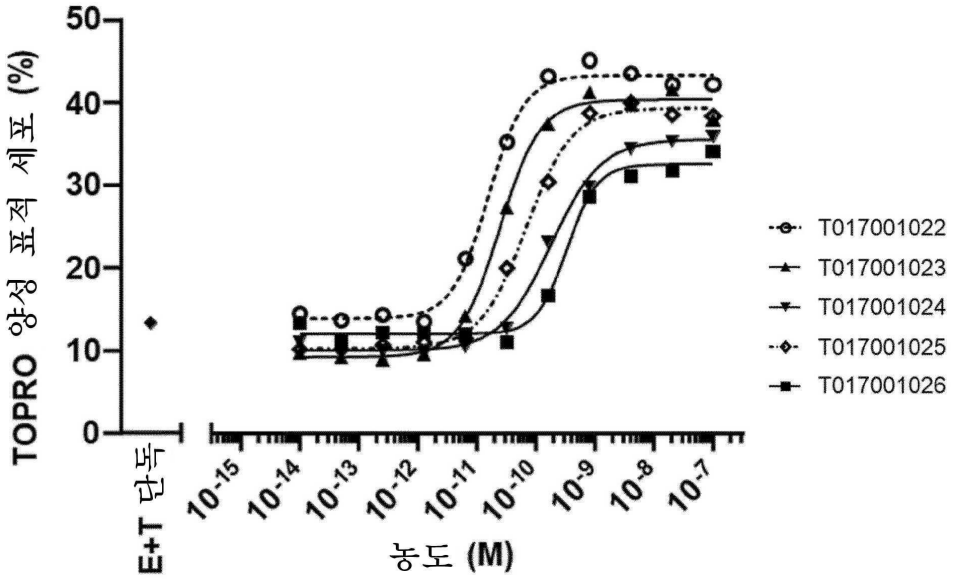
도면3a


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
50
40
30
20
10
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001017
T017001018
T017001019
T017001020
T017001021

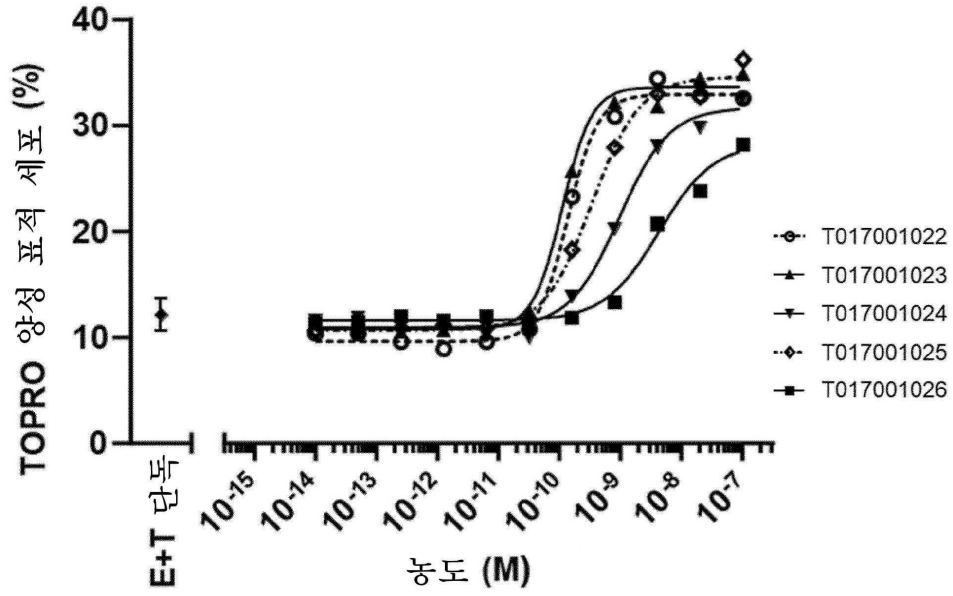
도면3b


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
40
30
20
10
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001017
T017001018
T017001019
T017001020
T017001021

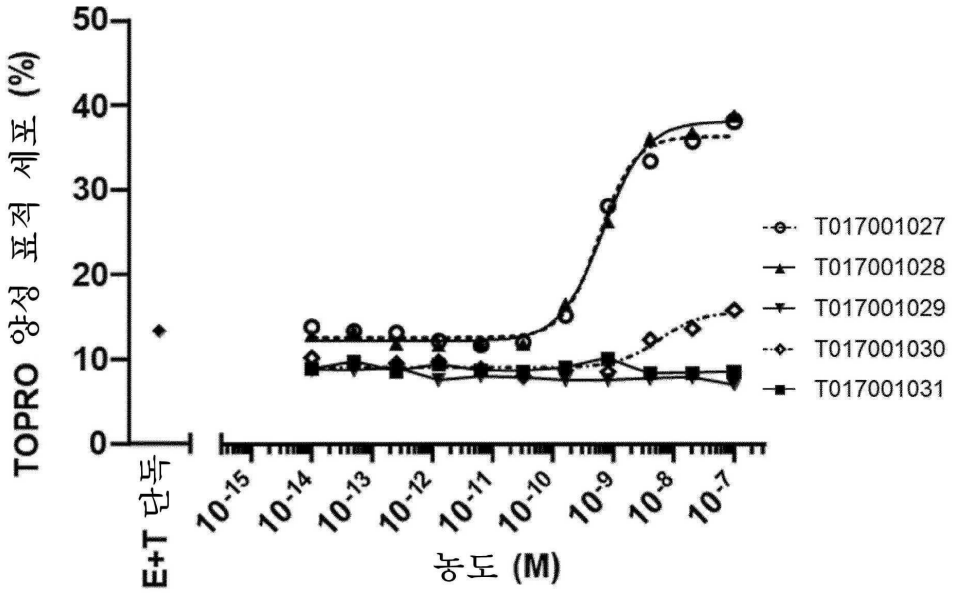
도면3c


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
50
40
30
20
10
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001022
T017001023
T017001024
T017001025
T017001026

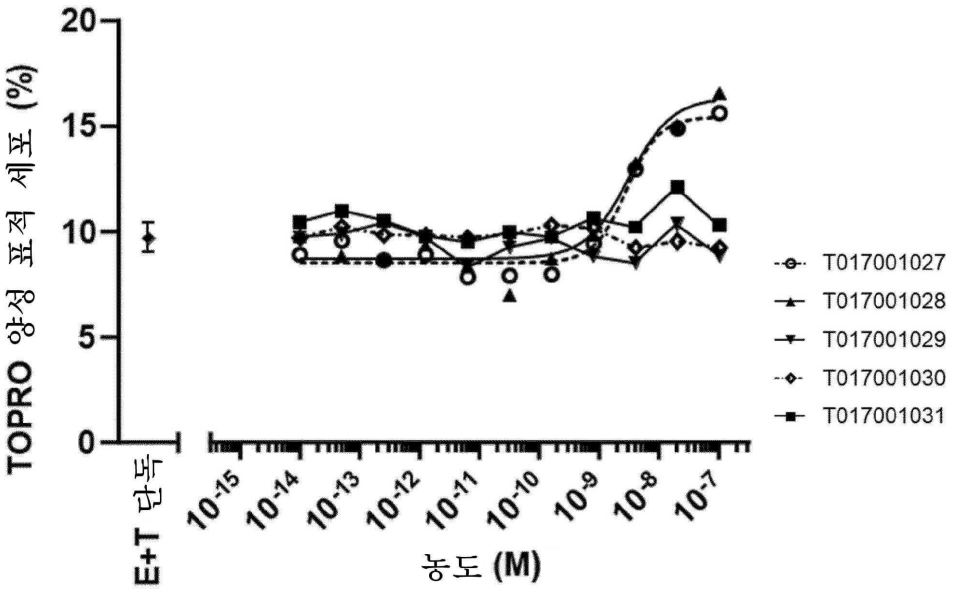
도면3d


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
40
30
20
10
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001022
T017001023
T017001024
T017001025
T017001026

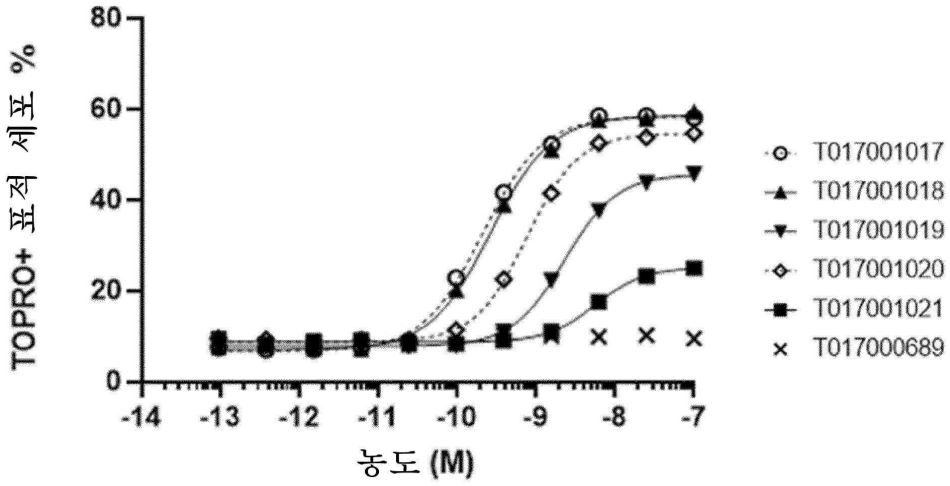
도면3e


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
50
40
30
20
10
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001027
T017001028
T017001029
T017001030
T017001031

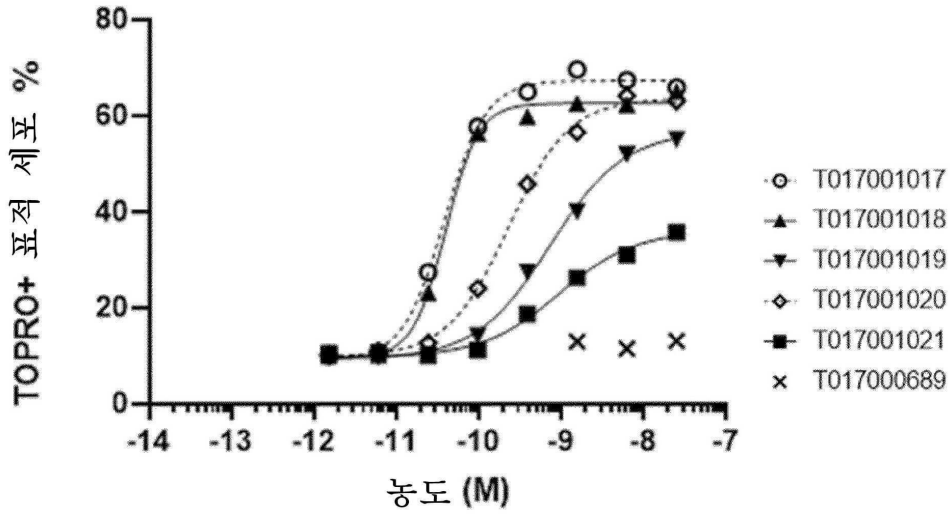
도면3f


TOPRO 양성 표적 세포 (%)
20
15
10
5
0
E+T 단독
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017001027
T017001028
T017001029
T017001030
T017001031

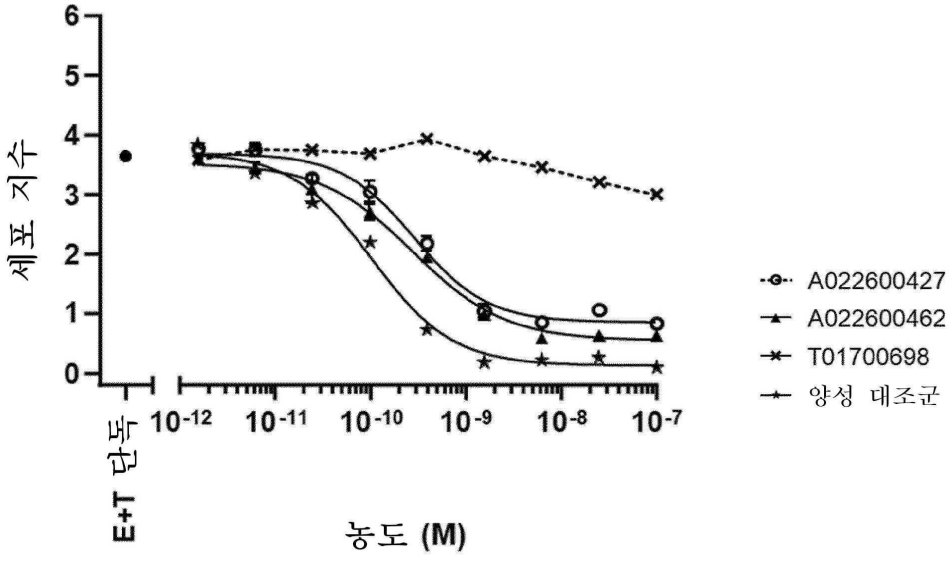
도면4a



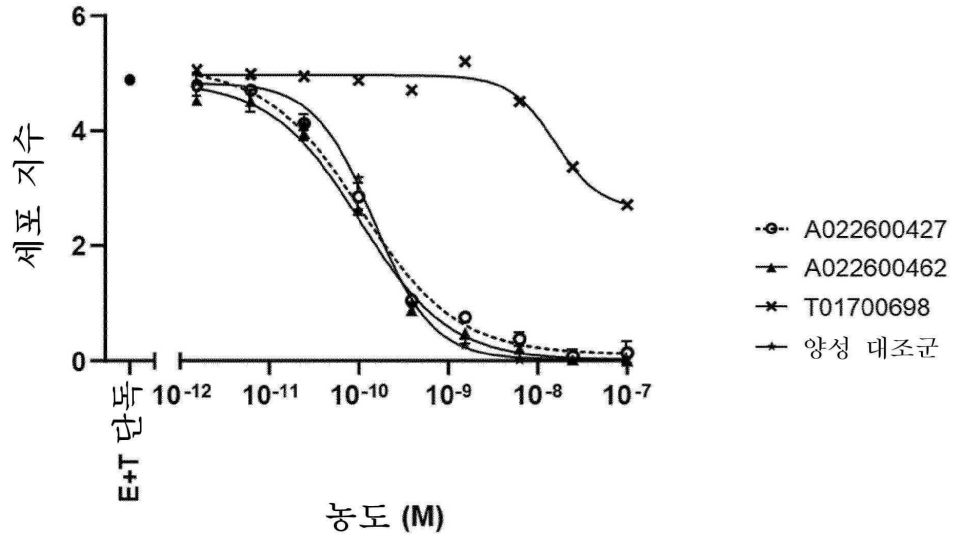
도면4b



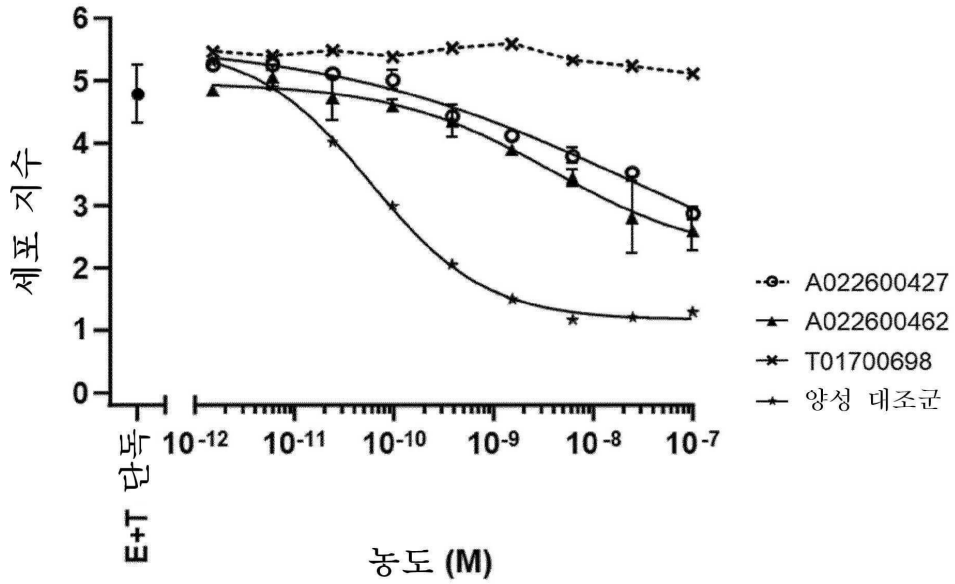
도면5a



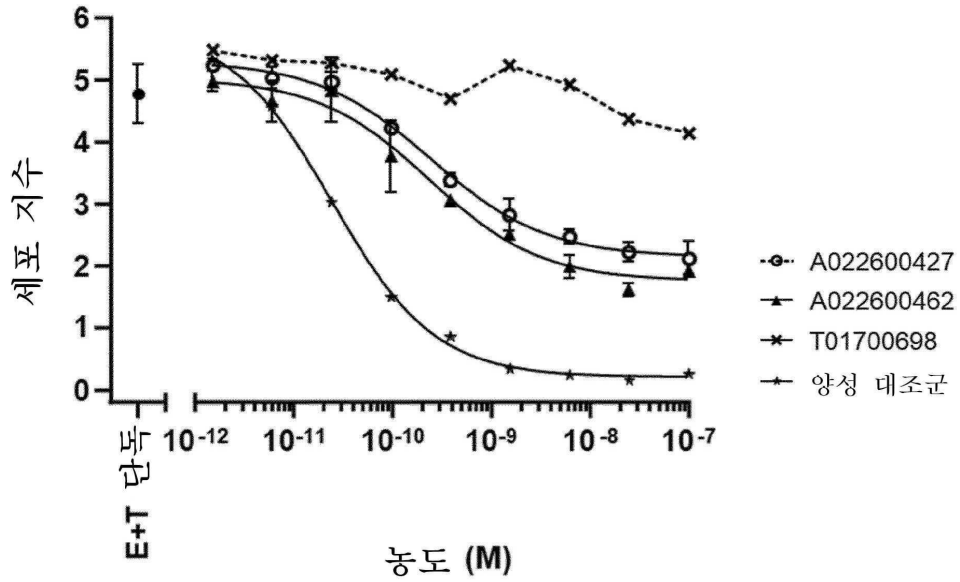
도면5b


6
4
2
0
세포 지수
E+T 단독
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
A022600427
A022600462
T01700698
양성 대조군

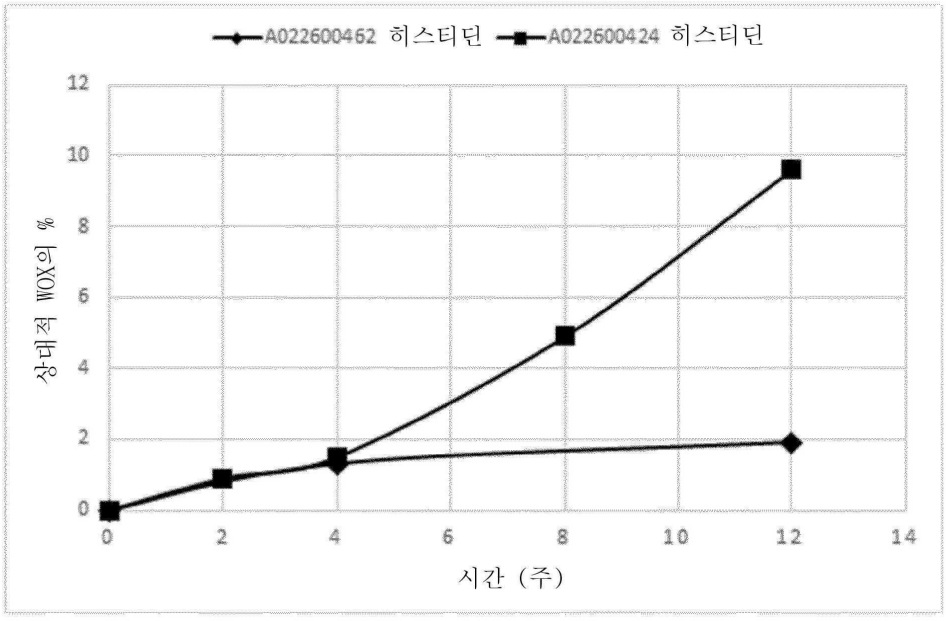
도면5c


6
5
4
3
2
1
0
세포 지수
E+T 단독
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
A022600427
A022600462
T01700698
양성 대조군

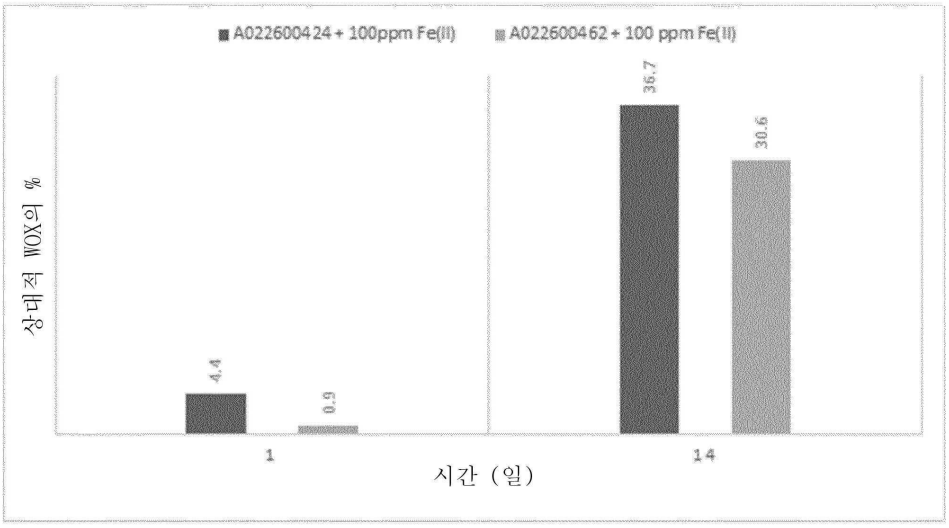
도면5d


세포 지수
6
5
4
3
2
1
0
E+T 단독
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
A022600427
A022600462
T01700698
양성 대조군

도면6


A022600462 히스티딘
A022600424 히스티딘
상대적 WOX의 %
12
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8
10
12
14
시간 (주)

도면7


A022600424 + 100ppm Fe(II)
A022600462 + 100 ppm Fe(II)
상대적 WOX의 %
4.4
0.9
36.7
30.6
1
14
시간 (일)

도면8

펩티드	펩티드 서열	변형	위치	QE 플러스/BPF			
				델타 2w40°C~2w25°C			
				A02260424		A02260462	
				펩티드 %		펩티드 %	
T7	VAHISIGDQTDYADSAK	이성질체화	D61	1.1		-	
T11	NTVYLQMNSLRPEDTAAYYCR	탈아미드화 (+1)	N83	0.2		-	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+4)	W102	1.5		-	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+32)	W102	2.3		-	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+16)	W102	3.7		-	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+4)	W107	5.8		5.6	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+32)	W107	0.6		1.3	
T13	IWPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR	산화 W (+16)	W107	0.3		0.8	
T14	LSCAASGFTFSSFAMTWVR	산화 M (+16)	M156	-0.1		-0.1	
T16	GLEWVATITNK	산화 W (+4)	W169	0.6		0.6	
T16	GLEWVATITNK	산화 W (+32)	W169	1.0		1.2	
T16	GLEWVATITNK	산화 W (+16)	W169	2.5		2.6	
T27	SVFSSSTMEWYR	산화 M (+16)	M292	0.4		0.1	
T36	NTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGWVQPGGS	산화 W (+4)	W363	8.6		9.9	
T36	NTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGWVQPGGS	산화 W (+32)	W363	3.7		3.7	
T36	NTVYLQMNSLRPEDTALYYCASGVAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGWVQPGGS	산화 W (+16)	W363	4.1		4.4	
T40	GPEWVSSISGSGSDTLYADSVK	산화 W (+4)	W429	0.5		0.6	
T40	GPEWVSSISGSGSDTLYADSVK	산화 W (+32)	W429	0.8		1.1	
T40	GPEWVSSISGSGSDTLYADSVK	산화 W (+16)	W429	0.2		0.2	

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.