(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099410
(43) 공개일자 2024년06월28일

(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 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7018489
(22) 출원일자(국제) 2022년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/080860
(87) 국제공개번호 WO 2023/079101
국제공개일자 2023년05월11일
(30) 우선권주장
2115925.6 2021년11월05일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엘리게이터 바이오사이언스 에이비
스웨덴 에스이-223 81 룬드 메디콘 빌리지
(72) 발명자
본 샨트스 라우라
스웨덴 223 81 룬드 셀레베겐 2 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비
니에시가 바르나바스
스웨덴 223 81 룬드 셀레베겐 2 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

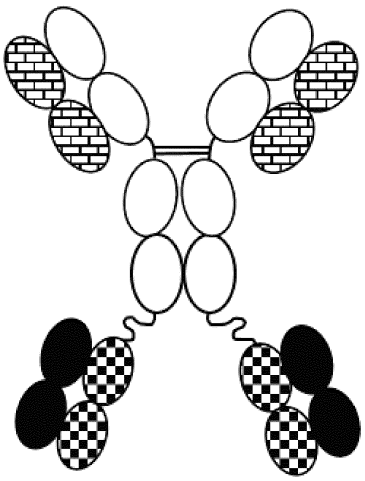
전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 폴리펩티드**

(57) 요 약

본 발명은 제조 동안 면역원성을 감소시키고/시키거나 순도를 개선시키는 새로운 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드 (특히, 이중특이적 항체)에 관한 것이다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 16/3007 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)

(72) 발명자
레빈 마티아스
스웨덴 223 81 룬드 셀레베겐 2 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비
셀 안나
스웨덴 223 81 룬드 셀레베겐 2 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비

(30) 우선권주장
2204539.7 2022년03월30일 영국(GB)
2212801.1 2022년09월02일 영국(GB)

명 세 서

청구범위

청구항 1

항원에 대한 특이성을 갖는 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 중쇄 영역 및 경쇄 영역을 포함하며,

i. 상기 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키며; 그리고

ii. 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 면역원성 반응 및/또는 면역원성을 유도할 예측된 위험을 감소시키거나 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 면역원성의 증가는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 더 높은 예측된 면역원성 위험 및/또는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 더 높은 면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하지 않는, 폴리펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이가 도입되기 전의 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역원성의 감소는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 더 낮은 예측된 면역원성 위험 및/또는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 더 낮은 면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하나, 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하지 않는, 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 이차 돌연변이가 도입되기 전에 일차 돌연변이 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역원성의 회피가 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 유사하거나 동일한 예측된 면역원성 위험 및/또는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 유사하거나 동일한 면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드가 하나 이상의 일차 돌연변이 또는 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하지 않는, 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는, 하나 이상의 일차 돌연변이가 도입되기 전 그리고 하나 이상의 이차 돌연변이가 도입되기 전의 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진, 폴리펩티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역원성은 항원-제시 세포 (APC) 의존적 면역원성 및/또는 T-세포 의존적 면역원성인, 폴리펩티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이차 돌연변이는 MHC 클래스 II 및/또는 T-세포 수용체 (TCR)에 대한 폴리펩티드 결합을 감소시키거나 회피하는, 폴리펩티드.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 APC는 수지상 세포인, 폴리펩티드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고, 여기서 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 187 (EU 넘버링 체계에 따름)에 있는, 폴리펩티드.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 표 D로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X에 있는, 폴리펩티드.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 일차 돌연변이는 T187E/D인, 폴리펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 영역은 C카파 또는 C람다 도메인을 포함하고, 여기서 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 도메인의 위치 114 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름)에 있는, 폴리펩티드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 표 B로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X에 있는, 폴리펩티드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 일차 돌연변이는 T/S114A인, 폴리펩티드.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고, 여기서 상기 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 180, 183 및/또는 188에 있는, 폴리펩티드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 영역은 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인을 포함하고, 여기서 상기 이차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111 및/또는 109에 있는, 폴리펩티드.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 경쇄 영역은 VL 도메인을 포함하고, 상기 이차 돌연변이는 VL 도메인의 위치 126에 있는, 폴리펩티드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이차 돌연변이는 다음의 위치 중 하나 이상 (바람직하게는 2 개 이상)에 있는, 폴리펩티드: CH1 도메인의 위치 180; CH1 도메인의 위치 183; CH1 도메인의 위치 188; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 109; 및 VL 도메인의 위치 126.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 표 F로부터 선택된 아미노산 서열의, 위치 X^{180}에 있고/있거나, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고/이거나, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있는, 폴리펩티드.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이차 돌연변이는 Y180A; Y180G; Y180I; Y180N; Y180S; Y180T; Y180V; 또는 Y180W, 및/또는 S183N 또는 S183T, 및/또는 V188G인, 폴리펩티드.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에 있는 C카파 또는 C람다 도메인의 이차 돌연변이는 표 E로부터 선택된 아미노산 서열의, 위치 X^{109}에 있고/있거나, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에 있는 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있는, 폴리펩티드.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이차 돌연변이는 A111R; A111T; A111W; 또는 A111V, 및/또는 T109P인, 폴리펩티드.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이차 돌연변이는 I126A; I126G; I126H; I126N; I126P; I126Q; I126S; 또는 I126T (IMGT 넘버링 체계에 따름)인, 폴리펩티드.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 단백질 A 결합 부위를 포함하는 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 돌연변이는 위치 65 (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있는, 폴리펩티드.

청구항 28

제26항 및 제27항에 있어서,

상기 돌연변이는 T65E 또는 T65A 또는 T65I인, 폴리펩티드.

청구항 29

항원에 대한 특이성을 갖는 폴리펩티드로서,

상기 폴리펩티드는 단백질 A 결합 부위를 포함하는 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 VH는 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래되는, 폴리펩티드.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서,

상기 돌연변이는 VH 도메인의 위치 65 (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있는, 폴리펩티드.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 돌연변이는 T65E 또는 T65A 또는 T65I인, 폴리펩티드.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 단일특이적 폴리펩티드인, 폴리펩티드.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 표적 항원은 면역조정제 또는 종양 세포-회합된 항원 (TAA)인, 폴리펩티드.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 면역조정제는 체크포인트 분자인, 폴리펩티드.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 체크포인트 분자는 자극 체크포인트 분자, 예컨대, CD40인, 폴리펩티드.

청구항 37

제34항에 있어서,

상기 TAA는 5T4, EpCAM 및/또는 CEACAM5인, 폴리펩티드.

청구항 38

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 이중특이적 폴리펩티드인, 폴리펩티드.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 폴리펩티드는

(a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 제1 중쇄 영역 및 제1 경쇄 영역을 포함하는, 면역글로불린 분자; 및

(b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 적어도 하나의 Fab 단편을 포함하고,

여기서 상기 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고,

여기서 상기 하나 이상의 일차 돌연변이는 제1 중쇄 영역과 제1 경쇄 영역의 회합을 촉진하고/하거나, 제2 중쇄 영역과 제2 경쇄 영역의 회합을 촉진하는, 폴리펩티드.

청구항 40

제39항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자는 제1 중쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피 및/또는 제1 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서,

상기 항체는 (b)에 따른 2 개의 Fab 단편을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역글로불린 분자는 제1 중쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피 및 제1 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피를 포함하고,

상기 이중특이적 항체는 (b)에 따른 2 개의 Fab 단편을 추가로 포함하고,

상기 제1 Fab 단편은 Fab 단편의 경쇄 폴리펩티드를 통해 제1 중쇄 폴리펩티드의 제1 카피의 C-말단에 융합되어 있고;

상기 제2 Fab 단편은 Fab 단편의 경쇄 폴리펩티드를 통해 제1 중쇄 폴리펩티드의 제2 카피의 C-말단에 융합되어 있는, 폴리펩티드.

청구항 43

제42항에 있어서,

상기 제1 중쇄 영역 및/또는 제2 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고, 여기서 상기 CH1 도메인은 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서,

상기 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이는 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 중쇄 영역 및/또는 제2 중쇄 영역, 바람직하게는 제2 중쇄 영역은 VH 도메인을 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위를 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 돌연변이는 제27항 또는 제28항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 47

이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는

(a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는, 면역글로불린 분자; 및

(b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편을 포함하고;

여기서 상기 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

여기서 상기 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키며; 그리고

여기서 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 면역원성 반응 및/또는 면역원성을 유도할 예측된 위험을 감소시키거나 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 48

제47항에 있어서,

상기 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이는 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 49

이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는

(a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는, 면역글로불린 분자; 및

(b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편을 포함하고;

여기서 상기 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

여기서 상기 제2 중쇄 영역은 VH 도메인을 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위를 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 50

제49항에 있어서,

상기 돌연변이는 제27항 또는 제28항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 51

이중특이적 항체로서,

상기 이중특이적 항체는

(a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는, 면역글로불린 분자; 및

(b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편을 포함하고;

여기서 상기 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

여기서 상기 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키며;

여기서 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 면역원성 반응 및/또는 면역원성을 유도할 예측된 위험을 감소시키거나 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하고;

여기서 상기 제2 중쇄 영역은 VH 도메인을 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위를 포함하고, 여기서 상기 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 정지시키는 돌연변이를 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 52

제51항에 있어서,

상기 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이는 제1항 내지 제25항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서,

상기 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 정지시키는 돌연변이는 제26항 또는 제27항에 정의된 바와 같은, 폴리펩티드.

청구항 54

제39항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및/또는 제2 항원은 면역조정제인, 폴리펩티드.

청구항 55

제54항에 있어서,

상기 면역조정제는 체크포인트 분자인, 폴리펩티드.

청구항 56

제55항에 있어서,

상기 체크포인트 분자는 자극 체크포인트 분자, 예컨대, CD40인, 폴리펩티드.

청구항 57

제39항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및/또는 제2 항원은 TAA인, 폴리펩티드.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 TAA는 EpCAM, 5T4 또는 CEACAM5인, 폴리펩티드.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 폴리펩티드, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 60

약물에 사용하기 위한, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 제59항에 정의된 바와 같은 조성물.

청구항 61

암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 제59항에 정의된 바와 같은 조성물.

청구항 62

치료적 유효량의 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 본 발명의 폴리펩티드 또는 제59항에 정의된 바와 같은 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법.

청구항 63

치료적 유효량의 제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 폴리펩티드 또는 제59항에 정의된 바와 같은 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 64

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

치료를 필요로 하는 개체의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 폴리펩티드.

청구항 65

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

암의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 폴리펩티드.

청구항 66

설명 및/또는 실시예 및/또는 도면을 참조하여 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드 및/또는 조성물 및/또는 이중특이적 항체 및/또는 방법 및/또는 치료 방법 및/또는 사용을 위한 폴리펩티드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 제조 동안 면역원성을 감소시키고/시키거나 순도를 개선시키는 새로운 돌연변이를 포함하는 폴리펩티드 (특히, 이중특이적 항체)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 선진국에서 조기 사망의 주된 원인이다. 암의 면역요법은 종양 세포에 대항하는 효과적인 면역 반응을 증

가시키는 것을 목적으로 한다. 이는, 예를 들어, 종양 항원에 대항하는 내성을 파괴하고, 항-종양 면역 반응을 증대시키며, 종양 부위에서 국소 사이토카인 반응을 자극함으로써 달성될 수 있다. 오래 지속되는 항-종양 면역 반응의 중요한 이펙터 세포는 활성화된 종양-특이적 이펙터 T 세포이다. 활성화된 이펙터 T 세포의 강력한 확장은 종양에 대한 면역 반응을 재지시할 수 있다. 이러한 맥락에서, 조절 T 세포 (Treg)는 항-종양 면역을 억제하는 역할을 한다. 따라서, Treg의 고갈, 억제, 반전 또는 비활성화는 항-종양 효과를 제공하고, 종양 미세환경에서 면역 억압을 반전시킬 수 있다. 추가로, 예를 들어, 수지상 세포에 의한 이펙터 T 세포의 불완전한 활성화는 비효율적인 항-종양 반응을 초래하는 T 세포 무반응(anergy)을 유발할 수 있는 반면, 수지상 세포에 의한 적절한 유도는 활성화된 이펙터 T 세포의 강력한 확장을 생성하여, 종양에 대한 면역 반응을 재지시할 수 있다. 또한, 자연 살해 (NK) 세포는 하향-조절된 인간 백혈구 항원 (HLA) 발현을 갖는 종양 세포를 공격함으로써 그리고 항원-의존적 세포성 세포독성 (ADCC)을 유도함으로써 종양 면역학에서 중요한 역할을 한다. 따라서, NK 세포의 자극은 또한 종양 성장을 감소시킬 수 있다.

[0003] 치료적 폴리펩티드 (그리고, 특히 이중특이적 항체)는 세포의 이중 표적화를 허용하므로 암 치료에 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 종양 세포 근처에 있는 숙주 면역 세포를 활성화할 수 있으므로, 하나의 항원만을 표적화하는 기존 단일특이적 약물의 대안이 될 수 있다.

[0004] 이중특이적 항체는 단클론 항체와 비교하여 생성하기가 더 어렵다. 많은 상이한 포맷이 발명되었고 모든 포맷은 상이한 강점 및 한계를 가지고 있다.

[0005] 이중특이적 항체를 개발하는 것에 도전하는 것은 치료적 용도의 적합성을 감소시킬 증가된 면역원성을 야기하는 임의의 변형 (특히 돌연변이)을 회피하면서, 양호한 수율 및 순도로 생산하는 데 실용적인 구조 및 아미노산 서열을 설계하는 것이다.

[0006] 이러한 배경에 대해, 본 발명자들은 제조 동안 면역원성을 감소시키고/시키거나, 순도를 개선시키는 폴리펩티드 돌연변이를 놀랍게도 식별하였다.

발명의 내용

[0007] **발명의 요약**

[0008] 다음의 발명은 폴리펩티드 (특히, 바람직하게는 도 11에 도시된 RUBY 포맷 구조의 이중특이적 항체)에 대한 새로운 돌연변이를 제공한다. 이들 돌연변이 (본원에 기재된 "이차 돌연변이")는 항체 내로 도입된 다른 돌연변이 (본원에 기재된 "일차 돌연변이")의 면역원성을 추가로 감소시키고/시키거나, 폴리펩티드의 순도 및 제조 용이성을 개선시킨다 (본원에 기재된 "개선된 순도 돌연변이").

[0009] 본원에 기재된 새로운 돌연변이는 이들이 적용되는 폴리펩티드의 특성을 더 크게 개선시키며, 그 자체는 이미 양호한 면역원성 프로파일 및 제조 용이성을 가질 수 있다는 점에 유의해야 한다. 예를 들어, 새로운 돌연변이가 적용된 예시된 폴리펩티드는 이전에 이용가능하고 임상에 안전한 많은 것보다 이미 우수하였다. 본원에 기재된 새로운 돌연변이는 이러한 우수한 이전 특질을 개선시킨다. 이에 기반하여, 이들 새로운 돌연변이는 "최적화된" 것이라고 지칭될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 본 발명의 특정 양태를 구현하는 바람직하고 비-제한적인 실시예가 이제 다음의 도면을 참조하여 설명될 것이다:

도 1 - 단일 돌연변이 bsAb 변이체의 이중 ELISA. S114A 돌연변이를 운반하는 펩티드의 인실리코 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시키기 위해 평가된 돌연변이체는 패널 A-D에 도시되어 있으며, T187E 돌연변이를 운반하는 펩티드의 인실리코 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시키기 위해 평가된 돌연변이체는 E-H에 도시되어 있다. 참조로서 야생형 bsAb AC_05293을 포함하였다.

도 2 - 불변 경쇄의 S114A 돌연변이 및/또는 CH1 불변 중쇄의 T187E 돌연변이를 운반하는 bsAb와 비교하여 펩티드의 감소된 예측된 MHC 클래스 II 결합을 갖는 이중 돌연변이 bsAb 변이체의 이중 ELISA. 참조로서 WT bsAb, AC_05293을 포함하였다.

도 3 - 상이한 이중 돌연변이 bsAb 변이체의 용융 온도 (Tm1) 및 응집 온도 (Tagg). 참조로서 WT bsAb인 AC_05293을 포함하였다.

도 4 - 항온처리 전과 비교하여 40℃에서 1, 2 및 4 주 동안 항온처리한 후의 응집 (% HMW). SEC-HPLC를 사용하여 값을 측정하였다.

도 5 - 냉동/해동 안정성 평가. HMW의 % 변화로서 측정된 응집은 1 및 3 라운드의 냉동/해동 후에 연구되었다.

도 6 - 모든 변이체에 대한 전단 응력 안정성 평가. A280 측정을 수행한 후, MixMate에서 30 분 동안 2000 rpm으로 항온처리한 다음, 10 분 동안 3000 xg에서 원심분리한 후, A280을 재-측정하였다.

도 7 - 50% 단백질 침전을 수득하기 위해 필요한 % PEG로서 측정된 콜로이드 안정성. 모든 변이체에는 높은 콜로이드 안정성을 나타내는 PEG 농도 >8-9)가 필요하였다.

도 8 - 이중 표적 ELISA에 의해 결정된 바와 같은 RUBY™ bsAb의 항원 결합. 모체 bsAb AC_05332 (A), AC_05330 (B), AC_5302 (C) 및 이의 돌연변이 버전의 5T4 및 CD40에 대한 동시 결합.

도 9 - 유세포 분석법을 사용하여 결정된 바와 같은, AC_05332 (A), AC_05330 (B), AC_5302 (C) 및 이의 돌연변이 버전에 의해 CHO 세포 (CHO-5T4) 및 CHO wt 세포 상에 발현된 5T4에 대한 결합.

도 10 - 유세포 분석법을 사용하여 결정된 바와 같은, AC_05332 (A), AC_05330 (B), AC_5302 (C) 및 이의 돌연변이 버전에 의해 B16 세포 (B16-CD40) 및 B16wt 세포 상에 발현된 CD40에 대한 결합.

도 11 - 이는 RUBY™ 포맷으로 지칭되는 이중특이적 항체 작제물의 예시적인 조성을 도시한다. 이 도면의 이중특이적 항체는 3 개의 유형의 폴리펩티드 쇄로 구성된다: (1) 폴리펩티드 링커를 통해 Fab 경쇄 (체크 무늬)에 융합된 IgG 중쇄 (백색). (2) IgG 경쇄 (벽돌 모양) 및 (3) Fab 중쇄 (흑색). 중쇄 및 경쇄 사이의 경계면에 돌연변이가 도입된다.

도 12 - CD40xTAA bsAb는 항원 제시 세포에 대한 종양 잔해의 국소화를 매개한다. CD40+ 세포와 클러스터링된 CEA+ 종양 잔해의 수는 배양 8 시간 후 라이브 세포 이미징 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다. 그래프는 4 회의 대표적인 실험 (CEA) 중 하나에서 중복 웰의 평균 (+SD)을 도시한다.

도 13 - 인간 결장직장암 종양으로부터의 해리된 세포를 다음에 대해 분석하였다: (좌측) 이들의 CEA-발현 (전체 생존가능한 세포에 대해 게이팅됨), (중앙) CD40 리포터 검정에서 CD40xCEA Neo-X-Prime bsAb에 대한 가교를 제공하는 능력 및 (우측) CD40xCEA Neo-X-Prime bsAb 또는 이소타입xCD40 bsAb를 사용하여 종양 침윤 면역 세포 (생존가능한 CD45+CD3-CD56- 세포에 대해 게이팅됨)의 자극 후 CD83 상향조절 (3 회의 대표적인 실험 중 하나로부터의 데이터).

도 14 - CD40xCEA bsAb에 의한 CD40 및 CEA의 동시 결합은 생체 외에서 편도암 APC의 활성화를 매개한다. 편도암 생검으로부터의 인간 CD45+ HLA-DR+ CD3- 세포를 CD40xCEA bsAb, CD40 mAb 또는 이소타입 대조군의 존재 하에 인간 CEA로 형질주입된 UV-조사된 CHO 세포와 공동-배양하였다. 13 시간 배양 후, 세포를 수확하고, CD19+ CD20+ B 세포, CD14+ 대식세포, CD1c+ cDC2 및 XCR1+ cDC1의 유세포 분석법을 사용하여 CD86+ CD40+ 세포의 빈도를 조사하였다.

도 15 - MC38-CEACAM5 2 종양 성장 및 생존. MC38-CEACAM5 2 종양으로 접종된 hCD40tg 마우스에 접종-후 7 일, 10 일 및 13 일차에 표시된 치료제를 투약하였다. 종양은 자주 측정되었으며, 그래프는 처리군 중 임의의 것의 제1 마우스가 윤리적 한계를 초과하는 종양 부피에 도달할 때까지 각각의 그룹의 평균 종양 부피 (+SD) 및 각각의 처리군의 생존 마우스 %를 도시한다.

도 16 - 인간 위암 종양으로부터의 해리된 세포를 다음에 대해 분석하였다: (좌측) 이들의 CEA-발현 (전체 생존가능한 세포에 대해 게이팅됨), (중앙) CD40 리포터 검정에서 CD40xCEA Neo-X-Prime bsAb (ffAC_05337)에 대한 가교를 제공하는 능력 및 (우측, 1 nM CD40xCEA) CD40xCEA Neo-X-Prime bsAb 또는 이소타입xCD40 bsAb를 사용하여 종양 침윤 면역 세포 (생존가능한 CD45+CD3-CD56- 세포에 대해 게이팅됨)의 자극 후 CD83 상향조절 (4 회의 대표적인 실험 중 하나로부터의 데이터).

도 17 - 가용성 CEA의 존재 및 부재 하에 상이한 CEA 수용체 밀도를 갖는 종양 세포와 공동-배양했을 때 CD40 리포터 세포에 대한 이중특이적 항체 ffAC_05337의 효과. MKN45, CEA 고발현 세포 (A), LS174T, CEA 중간 발현 세포 (B), HT29 및 LOVO, CEA 저발현 세포 (C-D). 반응은 배경에 대한 유도 배수로서 계산되었다.

도 18 - 가용성 CEA의 존재 또는 부재 하에 CEA 발현 CHO 세포 및 적정된 항체와 공동-배양된 CD40 리포터 세포에 대한 이중특이적 항체 ffAC_05337의 효과. 반응은 배경에 대한 유도 배수로서 계산되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 제1 양태에서, 본 발명은 항원에 대한 특이성을 갖고, 중쇄 영역 및 경쇄 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공하며;

[0012] i. 여기서 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응 면역원성을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키며; 그리고

[0013] ii. 여기서 폴리펩티드는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 감소 또는 회피하고/하거나, 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 예측된 위험 면역원성을 감소 또는 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함한다.

[0014] 용어 "폴리펩티드"는 2 개 이상의 서브유닛 아미노산, 아미노산 유사체 또는 기타 펩티드 모방체의 화합물을 지칭하기 위한 이의 가장 넓은 의미로 본원에 사용된다. 따라서 용어 "폴리펩티드"는 짧은 펩티드 서열 및 또한 더 긴 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 D 또는 L 광학 이성질체, 및 아미노산 유사체 및 펩티드 모방체 둘 모두를 포함하여, 자연 및/또는 비자연 또는 합성 아미노산 중 어느 하나를 지칭한다.

[0015] 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체이다.

[0016] 추가의 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 이중특이적 폴리펩티드, 더 바람직하게는 이중특이적 항체이다. 대안적인 실시양태에서, 폴리펩티드는 단일특이적 폴리펩티드이다.

[0017] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항체들"은 항원 결합 부위를 함유하는 분자, 예컨대, 면역글로불린 분자 및 항원 결합 부위를 함유하는 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편을 지칭한다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형 (예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 하위부류일 수 있다. 항체는 합성 항체, 단클론 항체, 단일 도메인 항체, 단일 쇄 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 다중-특이적 항체 (이중특이적 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 인트라바디, scFv (예컨대, 단일-특이적 및 이중-특이적 등을 포함), Fab 단편, F (ab') 단편, 디설파이드-연결된 Fv (sdFv), 항-이디오타입 (항-Id) 항체 및 위의 것들 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이중특이적"은 폴리펩티드가 2 개의 별개의 표적 엔티티에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 이중특이적 폴리펩티드, 예컨대, 2 개의 표적을 표적화하는 항체는 두 표적 모두가 과도하게 발현되는 위치에서 면역계의 특이적 활성화를 유도할 잠재력을 가지고 있다.

[0019] 용어 "에 대한 특이성을 갖는" 항체는 특정 표적/마커/에피토프/항원에서의 이의 결합 특이성(들)을 지시하도록 작제된 항체, 즉, 표적/마커/에피토프/항원에 대해 면역특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 또한, "에 대해 특이성을 갖는"과 동일한 정의를 갖는, 표현 특정 표적/마커/에피토프/항원"에 대해 선택적인", "에 지시된", "에 결합하는", "에 대항하는" 또는 "에 대항하여 지시된" 항체가 사용될 수 있다. 2 개의 상이한 표적/마커/에피토프/항원에 대한 특이성을 갖는 이중특이적 항체는 두 표적/마커/에피토프/항원 모두에 면역특이적으로 결합한다. 항체가 특정 표적 항원, 예컨대, CD40에 대해 지시되는 경우, 이는 따라서 상기 항체는 상기 표적 항원 구조에 존재하는 임의의 적합한 에피토프에 대해 지시될 수 있다고 가정된다.

[0020] 면역학 분야의 숙련자는 "중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진한다"는 개념을 이해하고 인식할 것이다. 여기서, 본 발명자들은 일차 돌연변이가 중쇄 영역 및 경쇄 영역의 잘못된 결합을 방지한다는 것, 즉, 돌연변이가 제조 부산물의 형성을 방지한다는 것을 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일차 돌연변이는 중쇄 영역 및 경쇄 영역의 자기-응집을 방지할 수 있으며, 즉, 돌연변이는 응집체의 형성을 방지한다. 일 실시양태에서 일차 돌연변이가 입체 장애 및/또는 전하 간의 비양립성(incompatibility)을 생성함으로써 응집체 및/또는 부산물의 형성을 방지할 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이며, 이들 용어는 아래에 더 상세히 논의되어 있다.

[0021] 용어 "면역원성"은 면역학 분야의 당업자라면 잘 이해할 수 있을 것이며, 이는 폴리펩티드가 투여된 개체에서 상기 폴리펩티드에 대항하여 지시된 원치 않은 면역 반응을 자극하게 하는 폴리펩티드의 특질을 포함한다.

[0022] 바람직한 실시양태에서, 면역원성의 증가는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 더 높은 예측된 면역원성 위험 및/또는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 더 높은

면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하지 않는다.

[0023] 특정 실시양태에서, 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이가 도입되기 전의 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0024] 바람직한 실시양태에서, 면역원성의 감소는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 더 낮은 예측된 면역원성 위험 및/또는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 더 낮은 면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하나, 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하지 않는다.

[0025] 특정 실시양태에서, 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 이차 돌연변이가 도입되기 전에 일차 돌연변이 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0026] 바람직한 실시양태에서, 면역원성의 회피는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 예측된 면역원성 위험과 비교했을 때 유사하거나 동일한 예측된 면역원성 위험 및/또는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드의 면역원성과 비교했을 때 유사하거나 동일한 면역원성을 특징으로 하며, 바람직하게는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이 또는 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하지 않는다.

[0027] 특정 실시양태에서, 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이가 도입되기 전에 그리고 하나 이상의 이차 돌연변이가 도입되기 전에 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0028] 실시예 (특히, 실시예 1)에 설명된 바와 같이, 폴리펩티드의 면역원성을 예측하거나 식별하는 한 가지 방법은 아미노산 서열이 주요 조직적합성 복합체 II (MHCII)에 결합할 것인지 여부를 고려하는 것과 같은, 이의 아미노산 서열이 개체의 분자 및/또는 수용체에 결합하여 원치 않은 면역 반응을 야기할 것인지에 대한 인실리코 예측을 실시하는 것이다. 이 작업은 다른 기술 중에서 AbEpiAnalyzer 도구 (EIR Sciences)를 사용하여 실시될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 일차 돌연변이 대조 폴리펩티드, 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드 및/또는 제2 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드와 비교하는 것과 같은, 위에 언급된 실시양태 내의 이러한 예측을 실시하는 방법은 면역학 및/또는 컴퓨터 생물학 분야의 숙련자에 의해 인식될 것이다.

[0029] 또한 인식될 것인 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드의 면역원성에 관한 생체 내 및/또는 생체 외 실험 (본원에 논의된 대조 폴리펩티드와 함께 포함)이 또한 실시될 수 있으며; 예를 들어, 적절한 모델 유기체를 사용한다.

[0030] 일 실시양태에서, 면역원성은 항원-제시 세포 (APC) 면역원성 및/또는 T-세포 의존적 면역원성이다.

[0031] 용어 항원-제시 세포 (APC) 및 T-세포는 면역학 분야의 숙련가에게 알려져 있을 것이며; 특히 APC와 관련하여 이들은 MHC의 맥락 내에서 항원을 가공하고 제시하는 세포이다. 이어서, APC는 이들 항원을 다른 면역 세포, 예컨대, T-세포에 제시할 수 있다.

[0032] 특정 실시양태에서, APC는 수지상 세포; 대식세포; 또는 B 세포를 포함하는 목록으로부터 선택된 하나 이상의 APC이며, 바람직하게는 수지상 세포이다.

[0033] 바람직한 실시양태에서, 이차 돌연변이는 MHC 클래스 II 및/또는 T-세포 수용체 (TCR), 바람직하게는 MHC 클래스 II에 대한 폴리펩티드 결합을 감소시키거나 회피한다.

[0034] MHC 클래스 II 및/또는 TCR에 대한 폴리펩티드의 결합의 감소 또는 회피를 유발하는 돌연변이의 개념은 면역학 분야의 숙련가에 의해 인식되고 이해될 것이다. "폴리펩티드 결합을 감소시킨다"란, MHC 클래스 II 및/또는 TCR에 대한 이차 돌연변이가 있는 폴리펩티드의 친화도가 이들 이차 돌연변이가 없는 폴리펩티드 (예컨대, 위에 기재된 제1 이차 돌연변이 대조 폴리펩티드)보다 낮다는 것을 포함한다. "폴리펩티드 결합을 회피한다"란, 이차 돌연변이가 있는 폴리펩티드와 MHC 클래스 II 및/또는 TCR 사이에 검출가능한 결합이 없다는 것을 포함한다. 결합 친화도를 측정하기 위한 예시적인 방법은 경쟁 면역검정 (예컨대, Wang *et* al., 2008 PLoS Comput Biol. 4(4): e1000048에 기재됨) 또는 실시예에 기재된 바와 같은 Octet이다.

[0035] 제2 양태에서, 본 발명은 항원에 대한 특이성을 갖는 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 폴리펩티드는 단백질 A 결합 부위를 포함하는 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하고, 여기서 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함한다.

[0036] 면역학 분야의 당업자가 알 수 있을 바와 같이, 단백질 A는 원래 *스타필로코커스 아우레우스*에서 발견되었으며,

IgG (예컨대, VH 도메인)를 포함하는 다수의 포유동물 단백질에 대해 높은 친화도를 가지고 있다. IgG에 대한 이의 친화도로 인해, 단백질 A는 정제 동안 폴리펩티드를 선택적으로 단리하기 위해 종종 사용된다. 이것이 유용한 도구이기는 하지만, 폴리펩티드가 복잡한 경우, 특히 본원에 기재된 이중특이적 항체와 같은 다중 폴리펩티드 쇄로 이루어진 경우, 폴리펩티드의 단백질 A 부위는 관심 있는 완전한 폴리펩티드와 함께 원치 않은 미스폴딩된 또는 미결합된 구성요소 폴리펩티드 쇄의 공동-정제를 야기할 수 있다. 인식될 것인 바와 같이, 이러한 공동-정제는 원치 않은 폴리펩티드로의 오염을 야기할 수 있으며, 이는 바람직하지 않다. 따라서, 발명자들은 특히 생산 공정 동안 원치 않은 폴리펩티드를 형성하기 쉬운 폴리펩티드 영역에서 단백질 A 결합 부위를 돌연변이시키는 것이 바람직할 수 있다는 것을 식별하였다. 발명자들은 놀랍게도 VH 도메인에서 단백질 A 결합 부위를 돌연변이시키는 것이 생산 공정 동안 관심 있는 폴리펩티드의 순도를 개선시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 본원에 기재된 단백질 A 결합 부위의 돌연변이는 "최적화된 RUBY" 돌연변이이고, "개선된 순도" 돌연변이로서 또한 지칭될 수 있다.

[0037] 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합의 감소 또는 회피를 유발하는 돌연변이의 개념은 면역학 분야의 숙련가에 의해 인식되고 이해될 것이다. "단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시킨다"란, 돌연변이가 있는 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 친화도가 돌연변이가 없는 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 친화도보다 낮고/낮거나, 돌연변이가 항체 생산 동안 단백질 A-특이적 방법에 의해 더 이상 결합 (및/또는 공동-정제)될 수 없는 정도로 단백질 A의 친화도를 감소시킨다는 것을 포함한다. "단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 회피한다"란, 단백질 A와 돌연변이가 있는 단백질 결합 부위 사이에 검출가능한 결합이 없다는 것을 포함한다. 결합 친화도를 측정하기 위한 예시적인 방법은 실시예에 기재된 바와 같이 Octet이다.

[0038] 특정 실시양태에서, 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이는 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 하나 이상의 돌연변이이다.

[0039] 본 발명의 제2 양태의 일 실시양태에서, VH는 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된다.

[0040] IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH는 프레임워크 영역 1, 3 및 CDRH2의 보존된 부분에서 식별되는 해당 부위를 구성하는 단백질 A 결합 도메인을 포함하는 단백질 A 결합 부위를 가지므로, 특히 단백질 A 결합을 감소시키거나 회피하기 위한 돌연변이가 발생하기 쉽다. 이는 Bach, Lewis et al. 2015 J Chromatogr A.;1409:60-9, Potter et al. 1996, J Immunol.;157(7):2982-8. PMID: 8816406; 및 Potter et al 1997, Int Rev Immunol.;14(4):291-308. doi: 10.3109/08830189709116521. PMID: 9186782에 추가로 논의되어 있다.

[0041] 일 실시양태에서, 단백질 A 결합 부위에 대한 돌연변이는 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH의 프레임워크 1 영역; IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH의 프레임워크 2 영역; 및 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH의 CDRH2 중 하나 이상에 있으며, 바람직하게는 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH의 CDRH2에 있다.

[0042] 예시적인 IGHV3 생식계열 유전자 계열 구성원은 다음의 서열을 갖는 IGHV3-23*01이다:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
(CDR2에 밑줄이 그어져 있음 - 서열번호 1)

[0043] 바람직한 실시양태에서, 단백질 A 결합 부위에 대한 돌연변이는 IGHV3 생식계열 유전자 계열로부터 유래된 VH의 CDRH2의 마지막 아미노산 (즉, C-말단 아미노산)에 대한 돌연변이이다.

[0044] 본 발명의 제1 양태의 돌연변이가 동일한 폴리펩티드에서 본 발명의 제2 양태의 돌연변이와 조합될 수 있다는 것이 포함된다. 본원에 논의된 돌연변이의 이러한 잠재적인 조합은 하기에 개시되어 있다.

[0045] 제1 및 제2 양태의 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 이중특이적 항체이고,

[0046] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 제1 중쇄 영역 및 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0047] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 적어도 하나의 Fab 단편을 포함하고,

[0048] 여기서 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고,

[0049] 여기서 하나 이상의 일차 돌연변이는 제1 중쇄 영역과 제1 경쇄 영역의 회합을 촉진하고/하거나, 제2 중쇄 영역과 제2 경쇄 영역의 회합을 촉진한다. 이 특정 실시양태는 일반적으로 도 11에 도시된 바와 같이 RUBY 포맷 구조를 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0050] 따라서, 당업자는 용어 "면역글로불린"이 위에 기재된 바와 같이, 면역글로불린 분자, 및 항원 결합 부위를 함유하는 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편을 포함한다는 것을 인식할 것이다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체 단편"은 F(ab')2, F(ab)2, Fab', Fab, Fv 및 scFv 등과 같은 항체의 일부이다. 구조에 관계없이, 항체 단편은 온전한 항체가 인식하는 것과 동일한 항원과 결합한다. 예를 들어, 항-CD40 항체 단편은 CD40에 결합한다. 용어 "항체 단편"은 또한 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 이루어진 "Fv" 단편과 같은 가변 영역으로 이루어진 단리된 단편, 및 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커 ("scFv 단백질")에 의해 연결되는 재조합 단일 쇄 폴리펩티드 분자를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체 단편"은 Fc 단편 또는 단일 아미노산 잔기와 같이 항원 결합 활성이 없는 항체의 부분을 포함하지 않는다.

[0052] "Fab 단편"이란, 온전한 항체에 의해 인식되는 동일한 항원에 결합할 수 있는 Fab 단편 (완전한 경쇄 및 가변 영역, 및 중쇄의 CH1 영역을 포함함)을 포함한다. Fab 단편은 당업계에 알려진 용어이며, Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 불변 도메인 및 하나의 가변 도메인을 포함한다.

[0053] 본 발명의 일 실시양태에서, 결합 도메인 B1 또는 결합 도메인 B2 중 하나는 면역글로불린 분자이고, 결합 도메인 B1 또는 결합 도메인 B2 중 하나는 Fab 단편이며, 여기서 Fab 단편은 Fab 단편의 경쇄를 통한 면역글로불린의 중쇄의 C 말단에 융합되어 있다.

[0054] 예를 들어, 폴리펩티드는 도 11에 도시된 바와 같은 포맷을 가질 수 있다. 이러한 포맷은 "RUBY™ 포맷" (계류중인 영국 특허 출원 1820556.7 및 PCT 출원 WO 2020/127354에 기재된 바와 같음)으로서 지칭된다. 본원에 기재된 바와 같은 "RUBY™ 포맷" 및 "최적화된 RUBY™ 포맷"의 항체가 본 발명의 이중특이적 폴리펩티드에 특히 바람직하다.

[0055] 일 실시양태에서, 하나 이상의 Fab 단편(들)은 링커를 통해 면역글로불린의 C-말단에 연결된다.

[0056] 본 발명의 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 4가이며, 2 개의 항원 각각에 2가로 결합할 수 있다.

[0057] 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 2 개의 아암(arm)을 갖고 따라서 제1 항원에 대한 2 개의 결합 부위를 갖는 항체로서 배열된 면역글로불린, 및 각각이 제2 항원에 대한 결합 부위를 제공하는 2 개의 Fab 단편을 포함한다. 따라서, 제1 항원에는 2 개의 결합 부위가 있고, 제2 항원에는 2 개의 결합 부위가 있다. 본 실시양태의 이중특이적 폴리펩티드는 다음의 3 개의 폴리펩티드 쇄를 포함할 수 있다: (1) IgG a 링커의 중쇄 및 Fab의 경쇄를 포함하는 쇄 H1; (2) IgG에 대한 경쇄인, 쇄 L1; 및 (3) 첨부된 (부착된) Fab에 대한 중쇄인, 쇄 H2. 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 다음의 6 개의 폴리펩티드 쇄를 포함할 수 있다: (a) IgG a 링커의 중쇄 및 Fab의 경쇄를 포함하는, 2 개의 쇄 H1; (b) IgG에 대한 경쇄인, 2 개의 쇄 L1; 및 (c) 첨부된 (부착된) Fab에 대한 중쇄인, 2 개의 쇄 H2. 이 구조는 "RUBY™ 포맷" 및 "최적화된 RUBY™ 포맷" 항체 둘 모두에 사용될 수 있으며, 이들 "H1", "H2" 및 "L1" 쇄는 특이적 돌연변이와 관련하여 아래에 기재되어 있다.

[0058] 일 실시양태에서, 결합 도메인 B1은 면역글로불린이고, 결합 도메인 B2는 Fab이다. 대안적인 실시양태에서, 결합 도메인 B1은 Fab이고, 결합 도메인 B2는 면역글로불린이다.

[0059] 따라서, 제1 중쇄 폴리펩티드는 제1 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드이고, 제1 경쇄 폴리펩티드는 제1 항체 또는 항원-결합 단편의 경쇄를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드이다.

[0060] 따라서, 제2 중쇄 폴리펩티드는 제2 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드이고, 제2 경쇄 폴리펩티드는 제2 항체 또는 항원-결합 단편의 경쇄를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드이다.

[0061] 제1 및 제2 항체 또는 항원-결합 단편은 각각 제1 항원 및 제2 항원에 대해 특이성을 갖는다.

[0062] 본 발명의 이중특이적 항체의 일 실시양태에서, 면역글로불린 분자는 제1 중쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피 및/또는 제1 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피를 포함한다.

[0063] 따라서, 일 실시양태에서 면역글로불린 분자는 2 개의 중쇄 폴리펩티드 및 2 개의 상응하는 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. "상응하는"이란, 중쇄 및 경쇄가 항체 포맷으로 조립된다는 것을 의미하며, 즉, 중쇄는 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역, 및 VH 및 VL 영역을 통해 경쇄와 회합되어 있고, 중쇄는 또한 CH2 및 CH3 영역을 통해 함께 연결되어 있다.

[0064] 본 발명의 이중특이적 항체의 일 실시양태에서, 면역글로불린 분자는 제1 중쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피 및/또

는 제1 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피를 포함한다.

[0065] 따라서, 일 실시양태에서 면역글로불린 분자는 2 개의 중쇄 폴리펩티드 및 2 개의 상응하는 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. "상응하는"이란, 중쇄 및 경쇄가 항체 포맷으로 조립된다는 것을 의미하며, 즉, 중쇄는 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역, 및 VH 및 VL 영역을 통해 경쇄와 회합되어 있고, 중쇄는 또한 CH2 및 CH3 영역을 통해 함께 연결되어 있다.

[0066] 일 실시양태에서 이중특이적 항체는 (b)에 따른 2 개의 Fab 단편, 즉, 제2 항원에 대한 특이성을 갖는 것에 따른 2 개의 Fab 단편을 포함하며, Fab 단편 각각은 제2 중쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드를 포함한다.

[0067] 따라서, 일 실시양태에서 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0068] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 중쇄 폴리펩티드 및 2 개의 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 면역글로불린 분자, 및

[0069] (b) 2 개의 Fab 단편 (제2 항원에 대한 특이성을 가짐) 및 제2 중쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드를 포함함

[0070] 따라서, 일 실시양태에서, 이중특이적 항체는 다음을 포함한다:

[0071] • 제1 중쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피 및 제1 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 카피를 포함하는 면역글로불린 분자,

[0072] • 이중특이적 항체는 제2 항원에 대한 특이성을 갖는 것에 따른 2 개의 Fab 단편을 추가로 포함하며, Fab 단편 각각은 제2 중쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드를 포함함,

[0073] • 제1 Fab 단편은 Fab 단편의 경쇄 폴리펩티드를 통해 제1 중쇄 폴리펩티드의 제1 카피의 C-말단에 융합되어 있음,

[0074] • 제2 Fab 단편은 Fab 단편의 경쇄 폴리펩티드를 통해 제1 중쇄 폴리펩티드의 제2 카피의 C-말단에 융합되어 있음.

[0075] 본 발명의 제1 양태에 따른 이중특이적 항체의 일 실시양태에서, 면역글로불린 분자는 인간 Fc 영역 또는 상기 영역의 변이체를 포함하며, 여기서 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 영역, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 영역이다.

[0076] 항체의 불변 (Fc) 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대, 이펙터 세포) 및 고전적 보체계의 제1 구성요소 (C1q)를 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. Fc 영역은 바람직하게는 인간 Fc 영역, 또는 상기 영역의 변이체이다. Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 영역일 수 있으며, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 영역일 수 있다. Fc 영역의 변이체는 전형적으로 Fc 수용체, 예컨대, Fc감마R 및/또는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 변경된 친화도로 결합하여, 폴리펩티드의 개선된 기능 및/또는 반감기를 제공한다. 생물학적 기능 및/또는 반감기는 천연 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 반감기에 비해 증가되거나 감소될 수 있다. 변이체 Fc 영역의 존재에 의해 조정될 수 있는 이러한 생물학적 기능의 예는 항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC), 항체-의존적 세포성 식세포작용 (ADCP), 보체-의존적 세포독성 (CDC) 및/또는 아폽토시스를 포함한다.

[0077] 일 실시양태에서 Fc 영역은 자연 발생 (즉, 야생형) 인간 Fc 영역이라는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 대안적인 실시양태에서 Fc 영역은 비-자연 발생 (예컨대, 돌연변이된) 인간 Fc 영역이다.

[0078] 일 실시양태에서 면역글로불린의 Fc 영역은 변형된 글리코실화를 가질 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 어푸코실화될 수 있다.

[0079] "어푸코실화된", "탈푸코실화된" 또는 "논-포쿠실레이티드(non-focusylated)" 항체란, 항체의 Fc 영역에 임의의 푸코스 당 유닛이 부착되어 있지 않거나, 푸코스 당 유닛의 함량이 감소되었음을 의미한다. 감소된 함량은 푸코실화된 '야생형' 항체와 비교하여 변형된 항체 상의 푸코스의 상대적 양, 예컨대, 만노시다제의 억제제의 부재 및/또는 GDP-6-데옥시-D-릭소(lyxo)-4-헥술로스 환원효소의 존재 하에 발현된 동등한 항체와 비교하여 면역글로불린 분자당 더 적은 푸코스 당 유닛에 의해 정의될 수 있다.

[0080] 일 실시양태에서, 하나 이상의 Fab 단편(들)은 링커를 통해 면역글로불린의 C-말단에 연결되어 있다. 따라서, 링커는 제2 경쇄 폴리펩티드를 제1 중쇄 폴리펩티드에 연결하는 펩티드 링커일 수 있다. 2 개의 Fab 단편 (그리고 따라서 2 개의 제2 경쇄 폴리펩티드)이 있고 면역글로불린에 2 개의 제1 중쇄 폴리펩티드가 또한 있는 일 실

시양태에서, 각각의 Fab 단편은 링커를 통해 제1 중쇄 폴리펩티드 중 하나에 부착된다.

[0081] 일 실시양태에서, 링커는 SGGGGSGGGGS (서열번호 2), SGGGGSGGGGSAP (서열번호 3), NFSQP (서열번호 4), KRTVA (서열번호 5), GGGGSGGGGSGGGGS (서열번호 6) 또는 (SG)m으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 펩티드이며, 여기서 m = 1 내지 7이다.

[0082] 일차 돌연변이

[0083] 일 실시양태에서, 경쇄 영역은 C카파 또는 C람다 도메인을 포함하고, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름)에 있고/있거나, 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 187 (EU 넘버링 체계에 따름)에 있다. 특이적인 실시양태에서, 경쇄 영역은 C카파 또는 C람다 도메인을 포함하고, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에 있다. 대안적인 구체적인 실시양태에서, 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고, 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 187에 있다. 추가 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름)에 있고, CH1 도메인의 위치 187 (EU 넘버링 체계에 따름)에 있다.

[0084] 바람직한 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 X114A 및/또는 CH1 도메인의 위치 X187E/D이다. 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 X114A이다. 대안적인 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 X187E/D이다. 추가 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 X114A (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 및 CH1 도메인의 X187E/D (EU 넘버링 체계에 따름)이다. X는 임의의 아미노산을 지칭한다.

[0085] 대안적인 바람직한 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114X이고/이거나, CH1 도메인의 T187X이다. 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114X이다. 대안적인 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 T187X이다. 추가 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114X (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 및 CH1 도메인의 T187X (EU 넘버링 체계에 따름)이다. X는 임의의 아미노산을 지칭한다.

[0086] 돌연변이를 논의하는 맥락에서 "/"의 사용은 대안의 가능한 아미노산을 예시하기 위한 것이며; 예를 들어, "X187E/D"는 E 또는 D가 위치 187에 아미노산 "X"에 대한 대체물로서 포함될 수 있음을 나타낸다.

[0087] 추가의 바람직한 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114A이고/이거나, CH1 도메인의 T187E/D이다. 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114A이다. 대안적인 구체적인 실시양태에서, 일차 돌연변이는 CH1 도메인의 T187E/D이다. 추가 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 T/S114A (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 및 CH1 도메인의 T187E/D (EU 넘버링 체계에 따름)이다.

[0088] 바람직한 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄, 바람직하게는 "H2" 쇄에 있다.

[0089] 바람직한 실시양태에서, C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄, 바람직하게는 "H1" 쇄에 있다.

[0090] **표 A: 관련 야생형 또는 출발 재료 C카파, C람다 및 VL J 세그먼트 도메인 아미노산 서열.** 아래 설명된 바와 같이, C카파 도메인의 경계는 EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따른 위치 108 (즉, 도메인의 가장 N-말단 아미노산)에 있고, C람다 도메인의 경계는 Kabat 넘버링 체계에 따른 위치 107A에 있다. 인접한 아미노산은 VL 도메인에 있으며, IMGT 넘버링 체계에 따라 위치 127 (즉, 도메인의 가장 N-말단 아미노산)로 넘버링된다. 아래 표에서, 마지막 VL 도메인 아미노산은 이탤릭체로 표시되어 있고, 제1 C카파/C람다 도메인 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다.

C카파+VL 또는 C람다+VL	아미노산 서열	서열번호
C카파	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	7
C람다 (1)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	8
C람다 (2)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	9
C람다 (3)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	10
C람다 (6)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNT GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP AECS	11
C람다 (7)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLVSDFNPGAVTVAWKADGSPVKV GVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAP AECS	12
C카파 - 관련 절편	RTVAAPSVFIFPPSDEQL	13
C람다 (1) - 관련 절편	GQPKANPTVTLFPPSSEEL	14
C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) - 관련 절편	GQPKAAPSVTLFPPSSEEL	15
VL의 C카파 J1	WTFGQGTKVEIK	16
VL의 C카파 J2	YTFGQGTKLEIK	17
VL의 C카파 J3	FTFGPGTKVDIK	18
VL의 C카파 J4	LTFGGGTKVEIK	19

[0091]

VL의 C카파 J5	ITFGQGTRLEIK	20
VL의 추가의 C카파 J	TFGAGTKLEIK	284
VL의 C카파 J1- 관련 절편	TFGQGTKVEIK	21
VL의 C카파 J2- 관련 절편	TFGQGTKLEIK	22
VL의 C카파 J3- 관련 절편	TFGPGTKVDIK	23
VL의 C카파 J4- 관련 절편	TFGGGTKVEIK	24
VL의 C카파 J5- 관련 절편	TFGQGTRLEIK	25
VL의 C람다 J1	YVFGTGTKVTVL	26
VL의 C람다 J2	VVFGGGTKLTVL	27
VL의 C람다 J4	FVFGGGTQLIIL	28
VL의 C람다 J5	WVFGEGTELTVL	29
VL의 C람다 J7	AVFGGGTQLTVL	30
VL의 C람다 J1- 관련 절편	VFGTGTKVTVL	31
VL의 C람다 J2- 관련 절편	VFGGGTKLTVL	32
VL의 C람다 J4- 관련 절편	VFGGGTQLIIL	33
VL의 C람다 J5- 관련 절편	VFGEGTELTVL	34
VL의 C람다 J7- 관련 절편	VFGGGTQLTVL	35
C카파+VL J1 - 관련 절편	TFGQGTKVEIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	36
C카파+VL J2 - 관련 절편	TFGQGTKLEIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	37
C카파+VL J3 - 관련 절편	TFGPGTKVDIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	38
C카파+VL J4 - 관련 절편	TFGGGTKVEIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	39
C카파+VL J5 - 관련 절편	TFGQGTRLEIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	40
C카파+VL J - 관련 절편	TFGAGTKLEIAKTVAAPSVFIFPPSDEQL	206
C 람다 (1) +VL J1 - 관련 절편	VFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL	41
C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) +VL J1 - 관련 절편	VFGTGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL	42
C 람다 (1) +VL J2 - 관련 절편	VFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL	43

[0092]

C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) +VL J2 - 관련 절편	VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL	44
C 람다 (1) +VL J4 - 관련 절편	VFGGGTQLIILGQPKANPTVTLFPPSSEEL	45
C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) +VL J4 - 관련 절편	VFGGGTQLIILGQPKAAPSVTLFPPSSEEL	46
C 람다 (1) +VL J5 - 관련 절편	VFGEGTELTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL	47
C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) +VL J5 - 관련 절편	VFGEGTELTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL	48
C 람다 (1) +VL J7 - 관련 절편	VFGGGTQLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL	49
C 람다 (2), (3), (6) 또는 (7) +VL J7 - 관련 절편	VFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL	50

[0093]

[0094] **표 B: 본 발명과 관련된 아미노산 서열인 C카파/C람다 및 VL, 또는 C카파/C람다의 일차 돌연변이.** EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따른 C카파/C람다 도메인의 위치 114는 X에 있다. 표 A에 설명된 바와 같이, 마지막 VL 도메인 아미노산은 이탤릭체로 표시되어 있고, 제1 C카파/C람다 도메인 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다.

C 카파, C 람다, C 카파+VL, 또는 C람다+VL	아미노산 서열	서열번호
C카파+VL	TFGQGTKVEIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	51
C카파+VL	TFGQGTKLEIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	52
C카파+VL	TFGPGTKVDIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	53
C카파+VL	TFGGGTKVEIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	54
C카파+VL	TFGQGTRLEIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	55
C카파+VL	TFGAGTKLEIAARTVAAPXVFIFPPSDEQL	285
C카파+VL	EIAARTVAAPXV	56
C카파+VL	DIAARTVAAPXV	57
C카파	RTVAAPXV	58
C카파 또는 C람다	PXV	59
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQPKANPXVTLFPPSSEEL	60
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQPKAAPXVTLFPPSSEEL	61
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQPKANPXVTLFPPSSEEL	62
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQPKAAPXVTLFPPSSEEL	63
C람다+VL	VFGGGTQLILLGQPKANPXVTLFPPSSEEL	64
C람다+VL	VFGGGTQLILLGQPKAAPXVTLFPPSSEEL	65
C람다+VL	VFGEGTELTVLGQPKANPXVTLFPPSSEEL	66
C람다+VL	VFGEGTELTVLGQPKAAPXVTLFPPSSEEL	67
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQPKANPXVTLFPPSSEEL	68
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQPKAAPXVTLFPPSSEEL	69
C람다+VL	VLGQPKANPXV	70
C람다+VL	VLGQPKAAPXV	71
C람다+VL	ILGQPKANPXV	72
C람다+VL	ILGQPKAAPXV	73
C람다	GQPKANPXV	74
C람다	GQPKAAPXV	289

[0095]

[0096] X는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T 또는 S이고, 이는 바람직하게는 A로 대체됨

[0097] 일 실시양태에서, C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 표 B로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X에 있다.

[0098] 특정 실시양태에서, C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X를 중심으로 표 B로부터 선택된 3 mer, 5 mer, 7 mer, 9 mer, 11 mer, 13 mer, 15 mer, 17 mer, 19 mer, 21 mer, 또는 23 mer의 아미노산 서열의 위치 X에 있으며; 예를 들어, 서열 TFGQGTKVEIKRTVAAP**X**VFIFPPSDEQL (서열번호 51)에서 이 실시양태의 9 mer는 VAAP**X**VFIF (서열번호 75)이다.

[0099] 추가 실시양태에서, C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 서열 P**X**V를 포함하고 표 B로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열의 위치 X에 있다.

[0100] 바람직한 실시양태에서, C카파 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 아미노산 서열 TFGQGTKLEIKRTVAAP**X**VFIFPPSDEQL (서열번호 52) 또는 EIKRTVAAP**X**V (서열번호 56) 또는 P**X**V (서열번호 59)의 위치 X에 있다.

[0101] 추가의 바람직한 실시양태에서, C카파 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 아미노산 서열 TFGAGTKLEIKRTVAAP**X**VFIFPPSDEQL (서열번호 285)의 위치 X에 있다.

[0102] 특히 바람직한 실시양태에서, 위에 추가로 논의된 바와 같이, 표 B의 아미노산 서열 중 임의의 것의 위치 114에서의 아미노산을 대체하는 아미노산은 A이다.

[0103] **표 C: 관련 야생형 CH1 아미노산 서열.**

Fc 이소타입	아미노산 서열	서열번호
IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	290
IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV	291
IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV	292
IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV	293
IgG1 - 관련 절편	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV	76
IgG2 - 관련 절편	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV	77
IgG3 - 관련 절편	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV	78
IgG4 - 관련 절편	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV	79

[0104]

[0105] 일 실시양태에서, CH1 도메인은 IgG1; IgG2; IgG3; 및 IgG4를 포함하는 목록으로부터 선택된 FC 이소타입으로부터 유래된다.

[0106] 가장 바람직하게는, CH1 도메인은 IgG1으로부터 유래된다.

[0107] **표 D: 본 발명과 관련된 CH1 아미노산 서열의 일차 돌연변이.** EU 넘버링 체계에 따른, CH1 도메인의 위치 187은 X에 있다.

Fc 이소타입	아미노산 서열	서열번호
IgG1	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYICNV	80
IgG2	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSNFGTQTYTCNV	81
IgG3	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYTCNV	82
IgG4	AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTKTYTCNV	83
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	GLYSLSSVV**X**VP	84
IgG1/IgG2/IgG3/IgG4	V**X**V	85

[0108]

[0109] X는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T이고, 이는 바람직하게는 E 또는 D로 대체됨

[0110] 일 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 표 D로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X에 있다.

[0111] 특정 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 표 D로부터 선택된 3 mer, 5 mer, 7 mer, 9 mer, 11 mer, 13 mer, 15 mer, 17 mer, 19 mer, 21 mer, 23 mer, 25 mer, 27 mer, 29 mer, 또는 31 mer의 아미노산 서열의 위치 X에 있으며; 예를 들어, 서열 AVLQSSGLYSLSSVV**X**VPSSSLGTQTYICNV (서열번호 80)의 이 실시양태의 9 mer는 SSVV**X**VPSS (서열번호 86)이다.

[0112] 추가 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 서열 V**X**V를 포함하고 표 D로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열의 위치 X에 있다.

[0113] 본원에 기재된 아미노산 서열에서의 돌연변이의 위치 지정은 수치 값을 참조하지만 (예를 들어, "CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이는 아미노산 서열 AVLQSSGLYSLSSVVXVPSSSLGTQTYICNV (서열번호 80)의 위치 X에 있다"), 이는 이러한 특정 실시양태와 이러한 돌연변이를 추가로 논의하는 다른 실시양태 사이의 교차-참조를

허용한다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 개시된 아미노산 서열 내에 기재된 바와 같은 돌연변이는 또한 해당 서열의 맥락에서 포함될 수 있지만 연관된 번호에 의해 명시된 전체 위치에서는 포함될 수 없다는 것이 포괄된다. 따라서, 그리고 예로서, CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이가 아미노산 서열 AVLQSSGLYSLSSVVXVPSSSLGTQTYICNV (서열번호 80) 또는 GLYSLSSVVXVP (서열번호 84) 또는 VXV (서열번호 85)의 위치 X에 있다는 것은, 일차 돌연변이가 아미노산 서열 AVLQSSGLYSLSSVVXVPSSSLGTQTYICNV (서열번호 80) 또는 GLYSLSSVVXVP (서열번호 84) 또는 VXV (서열번호 85)의 위치 X에 있을 수 있다는 것이 또한 포함된다.

[0114] 이차 돌연변이

[0115] 본원에 기재된 "이차 돌연변이"; 특히 "세트 2a" 및/또는 "세트 2b"를 포함하여 "돌연변이 세트 2"는 "최적화된 RUBY™"의 돌연변이로서 지칭될 수 있다.

[0116] "RUBY™ 포맷"의 이중특이적 폴리펩티드는 임상용으로 설계되었으며 낮은 면역원성을 가지지만, "이차 돌연변이"를 갖는 "최적화된 RUBY™ 포맷"의 이중특이적 폴리펩티드는 이중특이적 폴리펩티드 자체에 대항하여 지시된 면역원성 반응을 촉발할 위험을 더욱 더 감소시키도록 조작되었다.

[0117] 이러한 이차 돌연변이의 다양한 조합이 본 발명의 폴리펩티드 (바람직하게는 이중특이적 폴리펩티드)에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 위에 기재된 일차 돌연변이 중 임의의 것과 조합하여 사용될 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 동일한 폴리펩티드에 사용되는 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이의 조합은 아래에 기재되어 있다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 돌연변이의 변이가 또한 본 발명의 일부로서 작용할 것이라는 점을 인식할 것이다. 가변 도메인 (VH 또는 VL)의 모든 돌연변이는 IMGT 넘버링 체계에 따라 넘버링되고, 불변 C카파 경쇄 도메인의 모든 돌연변이는 EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따라 넘버링되고, 불변 C람다 경쇄 도메인의 모든 돌연변이는 Kabat 넘버링 체계에 따라 넘버링되며, 모든 불변 중쇄 돌연변이는 EU 넘버링 체계에 따라 넘버링된다.

[0118] 일 실시양태에서, 하나 이상의 이차 돌연변이는 연속 아미노산의 서열에서 일차 돌연변이로부터 8 개 이하의 아미노산 업스트림 및/또는 다운스트림의 하나 이상의 위치에 있다.

[0119] 구체적인 실시양태에서, 하나 이상의 이차 돌연변이는 연속 아미노산의 서열 (예컨대, 표 B의 아미노산 서열)에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이로부터 8 개 이하의 아미노산 업스트림 및/또는 다운스트림의 하나 이상의 위치에 있다.

[0120] C카파 또는 C람다 도메인에서의 위치 114의 업스트림의 아미노산의 위치 지정을 논의할 때, 범위는 C카파 또는 C람다 도메인의 N-말단에 있는 VL 도메인까지 확장될 수 있다

[0121] EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따르면, C카파 도메인의 N-말단 경계는 위치 108이고, 그 이전에 인접한 아미노산은 VL 도메인에 있고 IMGT 넘버링에 따라 위치 127로 넘버링된다. 따라서, C카파 도메인과 VL 도메인 사이의 위치 넘버링은 다음과 같다 (C카파 도메인에 밑줄이 그어져 있고 VL은 볼드체로 표시되어 있음 - X는 아미노산 및 이의 위치의 수를 나타냄): $\mathbf{X}^{123}\mathbf{X}^{124}\mathbf{X}^{125}\mathbf{X}^{126}\mathbf{X}^{127}\underline{X}^{108}\underline{X}^{109}\underline{X}^{110}\underline{X}^{111}\underline{X}^{112}\underline{X}^{113}\underline{X}^{114}\underline{X}^{115}\underline{X}^{116}$ - 도메인의 경계는 적용의 다음 순서에서 다음과 같다: **TFGQGTKVEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQL (서열번호 36 - C카파 도메인, 이 서열과 관련된 것으로서 밑줄이 그어져 있고, VL은 볼드체로 표시되어 있음).

[0122] Kabat 넘버링 체계에 따르면, C람다 도메인의 N-말단 경계는 위치 107A이고, 그 이전에 인접한 아미노산은 VL 도메인에 있고 IMGT 넘버링에 따라 위치 127로 넘버링된다. 따라서, C람다 도메인과 VL 도메인 사이의 위치 넘버링은 다음과 같다 (C람다 도메인에 밑줄이 그어져 있고 VL은 볼드체로 표시되어 있음 - X는 아미노산 및 이의 위치의 수를 나타냄): $\mathbf{X}^{123}\mathbf{X}^{124}\mathbf{X}^{125}\mathbf{X}^{126}\mathbf{X}^{127}\underline{X}^{107}\underline{X}^{108}\underline{X}^{109}\underline{X}^{110}\underline{X}^{111}\underline{X}^{112}\underline{X}^{113}\underline{X}^{114}\underline{X}^{115}\underline{X}^{116}$ - **VFGTGTKVTVL**GQPKANPTVTLFPPSSEEL (서열번호 41 - C람다 도메인, 이 서열과 관련된 것으로서 밑줄이 그어져 있고, VL은 볼드체로 표시되어 있음).

[0123] 따라서, 일 실시양태에서, 하나 이상의 이차 돌연변이는 VL 도메인의 위치 126으로부터 C카파 도메인의 위치 122까지의 영역에 있다. 대안적인 실시양태에서, 하나 이상의 이차 돌연변이는 VL 도메인의 위치 127로부터 C람다 도메인의 위치 123까지의 영역에 있다.

[0124] 추가의 구체적인 실시양태에서, 하나 이상의 이차 돌연변이는 연속 아미노산의 서열 (예컨대, 표 D로부터 선택된 아미노산 서열)에서 CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이로부터 8 개 이하의 아미노산 업스트림 및/또는 다운스트림의 하나 이상의 위치에 있고; 예를 들어, 하나 이상의 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 179로부터 위치 195까지의 영역에 있다.

[0125] 일 실시양태에서, 이차 돌연변이는 표 B로부터 선택된 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이고, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 A이고; 그리고/또는 이차 돌연변이는 표 D로부터 선택된 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이고, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 E 또는 D이다.

[0126] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 위치 X를 중심으로 표 B로부터 선택된 3 mer, 5 mer, 7 mer, 9 mer, 11 mer, 13 mer, 15 mer, 17 mer, 19 mer, 21 mer, 또는 23 mer의 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이며, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 A이다.

[0127] 추가 실시양태에서, 이차 돌연변이는 서열 P**X**V를 포함하고 표 B로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이며, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 A이다.

[0128] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 위치 X를 중심으로 표 D로부터 선택된 3 mer, 5 mer, 7 mer, 9 mer, 11 mer, 13 mer, 15 mer, 17 mer, 19 mer, 21 mer, 23 mer, 25 mer, 27 mer, 29 mer, 또는 31 mer의 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이며, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 E 또는 D이다.

[0129] 추가 실시양태에서, 이차 돌연변이는 서열 V**X**V를 포함하고 표 D로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열의 위치에서의 하나 이상의 돌연변이이며, 여기서 돌연변이는 위치 X에 없고 여기서 X는 아미노산 E 또는 D이다.

[0130] 일 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 및 VL 도메인의 아미노산 서열 **X**KR**X**V**X**APA (서열번호 87)의 위치 1, 4 및 6 중 하나 이상에 있으며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고 여기서 위치 9는 일차 돌연변이이고, 여기서 **X**K는 VL 도메인의 일부이고 R**X**V**X**APA는 C카파 도메인의 일부이다. 바람직한 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 및 VL 도메인의 아미노산 서열 IKR**X**V**X**APA (서열번호 88)의 위치 4 및/또는 6에 있으며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고 여기서 위치 9는 일차 돌연변이이고, 여기서 IK는 VL 도메인의 일부이고 R**X**V**X**APA는 C카파 도메인의 일부이다. 이 실시양태의 위치 1, 4 및 6은 VL 도메인의 위치 126, 및 본원의 실시양태의 C카파 도메인의 위치 109 및 111에 상응한다. 이 실시양태의 아미노산 서열의 더 긴 버전은 표 B에 기재되어 있으며, 이 실시양태에 기재된 이차 돌연변이를 포함하는 이러한 더 긴 서열은 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0131] 대안적인 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C람다 및 VL 도메인의 아미노산 서열 LGQ**X**K**X**NPA (서열번호 89)의 위치 4 및/또는 6에 있으며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고 여기서 위치 9는 일차 돌연변이이고, 여기서 L은 VL 도메인의 일부이고 GQ**X**K**X**NPA는 C람다 도메인의 일부이다. 추가 대안적인 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C람다 및 VL 도메인의 아미노산 서열 LGQ**X**K**X**APA (서열번호 90)의 위치 4 및/또는 6에 있으며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고 여기서 위치 9는 일차 돌연변이이고, 여기서 L은 VL 도메인의 일부이고 GQ**X**K**X**APA는 C람다 도메인의 일부이다. 이 실시양태의 위치 4 및 6은 본원의 실시양태의 C람다 도메인의 위치 109 및 111에 상응한다. 이 실시양태의 아미노산 서열의 더 긴 버전은 표 A 및 B에 기재되어 있으며, 이 실시양태에 기재된 이차 돌연변이를 포함하는 이러한 더 긴 서열은 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0132] 일 실시양태에서, 이차 돌연변이는, X가 임의의 아미노산이고 위치 8이 일차 돌연변이인, CH1 도메인의 아미노산 서열 **X**SL**X**S**X**VE**X** (서열번호 91); X가 임의의 아미노산이고 위치 8이 일차 돌연변이인, CH1 도메인의 **X**SL**X**S**X**VD**X** (서열번호 92); 위치 8이 일차 돌연변이인, CH1 도메인의 YSLSSVVEV (서열번호 93); 또는 위치 8이 일차 돌연변이인, CH1 도메인의 YSLSSVVEV (서열번호 93)의 위치 1, 4, 6 및 9 중 하나 이상에; 바람직하게는 위치 1 및 4에, 보다 바람직하게는 위치 4에 있다. 이 실시양태의 위치 1, 4, 6 및 9는 아래 실시양태의 위치 180, 183, 185 및 188에 상응한다. 이 실시양태의 아미노산 서열의 더 긴 버전은 표 C 및 D에 기재되어 있으며, 이 실시양태에 기재된 이차 돌연변이를 포함하는 이러한 더 긴 서열은 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0133] 아래 및 실시예에서 추가로 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 놀랍게도 일차 돌연변이에 대한 이차 돌연변이(들)의 상대적 위치가 일차 돌연변이의 면역원성을 감소시키는 데 관련될 수 있음을 식별하였다. 이는 일차 및 이차 돌연변이의 상대적 위치가 MHC 클래스 II와 같이 면역원성을 유발하는 수용체에 대한 폴리펩티드의 결합 특질을 변화시키는 데 중요할 수 있기 때문이다.

[0134] 일 실시양태에서, 중쇄 영역은 CH1 도메인을 포함하고, 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 위치 180, 183 및/또는

188, 바람직하게는 180 또는 183, 보다 바람직하게는 183 (EU 넘버링 체계에 따름)에 있다.

[0135] 일 실시양태에서, 경쇄 영역은 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인을 포함하고, 이차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111 및/또는 109에 있다.

[0136] 일 실시양태에서, 경쇄 영역은 VL 도메인을 포함하고, 이차 돌연변이는 VL 도메인의 위치 126에 있다.

[0137] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 위치: 111 및 109 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및 VL 도메인의 위치 126 (IMGT 넘버링 체계에 따름) 중 하나 이상에 있다.

[0138] 본 발명의 일 실시양태에서 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0139] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 180; 183; 및 188, 바람직하게는 180 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0140] (b) C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 111 및 109 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0141] (c) VL 도메인의 위치 126 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0142] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 다음의 위치 중 2 개 이상, 예를 들어 이들 위치 중 3 개 이상; 4 개 이상; 5 개 이상; 또는 6 개 모두에 있다: CH1 도메인의 위치 180; CH1 도메인의 위치 183; CH1 도메인의 위치 188; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 109; 및 VL 도메인의 위치 126.

[0143] 본 발명의 일 실시양태에서 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0144] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: Y180; S183; 및 V188, 바람직하게는 Y180 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0145] (b) C카파 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: A111 및 T109, 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: A111 및 P109 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0146] (c) VL 도메인의 위치 I126 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0147] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상에 있다: Y180; S183; 및 V188, 바람직하게는 Y180 또는 S183, 더욱 바람직하게는 S183 (EU 넘버링 체계에 따름).

[0148] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 도메인의 다음의 위치: A111 및 T109 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는 VL의 위치 I126 (IMGT 넘버링 체계에 따름) 중 하나 이상에 있다. 특정 대안적인 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상에 있다: A111 및 P109 (Kabat 넘버링 체계에 따름).

[0149] 본 발명의 일 실시양태에서 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0150] (a) CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: Y180X; S183X; 및 V188X; 바람직하게는 Y180X (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0151] (b) C카파 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: A111X; 및 T109X, 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: A111X 및 P109X (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0152] (c) VL 도메인의 I126X (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0153] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0154] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상에 있다: Y180X; S183X; 및 V188X; 바람직하게는 Y180X 또는 S183X, 더욱 바람직하게는 S183X (EU 넘버링 체계에 따름).

[0155] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0156] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 도메인의 다음의 돌연변이: A111X; 및 T109X (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 중 하나 이상에 있고/있거나, 돌연변이는 VL 도메인의 I126X (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있다. 특정 대안적인 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상에 있다: A111X 및

P109X (EU 넘버링 체계에 따름).

[0157] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0158] 본 발명의 일 실시양태에서 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0159] (a) CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: X180A/G/I/N/S/T/V/W; X183N/T; 및 X188G; 바람직하게는 X180T (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0160] (b) C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: X111R/T/W/V 및 X109P, 바람직하게는 X111V 및 X109P (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0161] (c) VL의 X126A/G/H/N/P/Q/S/T (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0162] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0163] 돌연변이를 논의하는 맥락에서 "/"의 사용은 대안의 가능한 아미노산을 예시하기 위한 것이며; 예를 들어, "X180A/G/I/N/S/T/V/W"는 A 또는 G 또는 I 또는 또는 S 또는 T 또는 V 또는 W가 위치 187에 아미노산 "X"에 대한 대체물로서 포함될 수 있음을 나타낸다.

[0164] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상에 있다: X180A/G/I/N/S/T/V/W; X183N/T; 및 X188G; 바람직하게는 X180T 또는 X183N/T, 보다 바람직하게는 X183N/T (EU 넘버링 체계에 따름).

[0165] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0166] 특정 실시양태에서, 이차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 돌연변이: X111R/T/W/V 및 X109P, 바람직하게는 X111V 및 X109P (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 중 하나 이상에 있고/있거나, 돌연변이는 VL의 X126A/G/H/N/P/Q/S/T (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있다.

[0167] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0168] 예를 들어, 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0169] (a) CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: Y180A; Y180G; Y180I; Y180N; Y180S; Y180T; Y180V; 또는 Y180W, 및/또는 S183N 또는 S183T, 및/또는 V188G, 바람직하게는 Y180T (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0170] (b) C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: A111R; A111T; A111W; 또는 A111V, 및/또는 T109P, 바람직하게는 T109P 및 A111V (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0171] (c) VL 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나: I126A; I126G; I126H; I126N; I126P; I126Q; I126S; 또는 I126T (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0172] 특정 실시예에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상에 있다: Y180A; Y180G; Y180I; Y180N; Y180S; Y180T; Y180V; 또는 Y180W, 및/또는 S183N 또는 S183T, 및/또는 V188G, 바람직하게는 Y180T; S183N; 및/또는 S183T, 보다 바람직하게는 S183N 및/또는 S183T (EU 넘버링 체계에 따름).

[0173] 특정 실시예에서, 이차 돌연변이는 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 다음의 돌연변이: A111R; A111T; A111W; 또는 A111V 및/또는 T109P, 바람직하게는 T109P 및/또는 A111V (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 중 하나 이상; 및/또는 VL 도메인의 다음의 돌연변이: I126A; I126G; I126H; I126N; I126P; I126Q; I126S; 또는 I126T (IMGT 넘버링 체계에 따름) 중 하나에 있다.

[0174] 일 실시양태에서, 돌연변이는 A111R이 아니다.

[0175] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄, 바람직하게는 "H2" 쇄에 있다.

[0176] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 183에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄, 바람직하게는 "H2" 쇄에 있다.

[0177] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 188에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄, 바람직하게는 "H2" 쇄에 있다.

[0178] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의

위치 109에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄, 바람직하게는 "H1" 쇄에 있다.

[0179] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄, 바람직하게는 "H1" 쇄에 있다.

[0180] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄, 바람직하게는 "H1" 쇄에 있다.

[0181] 특히 바람직한 실시양태에서, 이차 돌연변이는 이차 돌연변이 쌍; 예를 들어, VL 도메인의 위치 126에서의 돌연변이 및 CH1 도메인의 위치 180에서의 돌연변이이다.

[0182] 바람직한 실시양태에서, 이차 돌연변이 쌍은 다음으로 이루어진 목록으로부터 선택된 위치에 있다:

[0183] • VL 도메인의 위치 126 및 CH1 도메인의 위치 180;

[0184] • VL 도메인의 위치 126 및 CH1 도메인의 위치 183;

[0185] • VL 도메인의 위치 126 및 CH1 도메인의 위치 188;

[0186] • Cカパ 도메인의 위치 109 및 CH1 도메인의 위치 180;

[0187] • Cカパ 도메인의 위치 109 및 CH1 도메인의 위치 183;

[0188] • Cカパ 도메인의 위치 109 및 CH1 도메인의 위치 188;

[0189] • Cカパ 도메인의 위치 111 및 CH1 도메인의 위치 180;

[0190] • Cカパ 도메인의 위치 111 및 CH1 도메인의 위치 183; 및

[0191] • Cカパ 도메인의 위치 111 및 CH1 도메인의 위치 188, 바람직하게는 Cカパ 도메인의 위치 109 및 CH1 도메인의 위치 183.

[0192] 특히 바람직한 실시양태에서, 이차 돌연변이 쌍은 다음으로 이루어진 목록으로부터 선택된다:

[0193] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0194] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0195] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0196] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0197] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0198] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0199] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0200] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0201] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0202] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0203] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0204] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0205] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0206] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0207] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0208] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0209] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0210] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0211] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T; 및

[0212] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G, 바람직하게는:

[0213] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T

[0214] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G

[0215] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0216] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0217] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T; 및

[0218] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G; 가장 바람직하게는 C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T.

[0219] **표 E: 본 발명과 관련된 아미노산 서열인 C카파 및 VL, 또는 C카파/C람다에서의 이차 돌연변이.** C카파/C람다 도메인의 위치 109는 X^{109}에 있고 C카파/C람다 도메인의 위치 111은 X^{111}에 있고 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름), VL 도메인의 위치 126은 X^{126}에 있다 (IMGT 넘버링 체계에 따름). 표 A에 대해 설명된 바와 같이, 마지막 VL 도메인 아미노산은 이탤릭체로 표시되어 있고, 제1 C카파/C람다 도메인 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다.

[0220]

C 카파+VL, 또는 C람다+VL	아미노산 서열	서열번호
C카파+VL	TFGQGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	94
C카파+VL	TFGQGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	95
C카파+VL	TFGPGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	96
C카파+VL	TFGGGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	97
C카파+VL	TFGQGTRLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	98
C카파+VL	TFGAGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APAVFIFPPSDEQL	286
C카파+VL	TFGQGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	99
C카파+VL	TFGQGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	100
C카파+VL	TFGPGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	101
C카파+VL	TFGGGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	102
C카파+VL	TFGQGTRLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	103
C카파+VL	TFGAGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}APSVFIFPPSDEQL	287
C카파+VL	TFGQGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	104
C카파+VL	TFGQGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	105
C카파+VL	TFGPGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	106
C카파+VL	TFGGGTKVX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	107
C카파+VL	TFGQGTRLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	108
C카파+VL	TFGAGTKLX^{138}IAAPX^{109}VX^{111}A	294
C카파+VL	VX^{136}IAAPX^{109}VX^{111}APAV	109
C카파+VL	LX^{136}IAAPX^{109}VX^{111}APAV	110
C카파+VL	VX^{136}IAAPX^{109}VX^{111}A	111
C카파+VL	LX^{136}IAAPX^{109}VX^{111}A	112
C카파	RX^{109}VX^{111}APAV	113
C카파	RX^{109}VX^{111}A	114
C카파	VX^{111}APAV	115
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}NPAVTLFPPSSEEL	116
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}APAVTLFPPSSEEL	117

C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}NPAVTLFPPSSEEL	118
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}APAVTLFPPSSEEL	119
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}NPAVTLFPPSSEEL	120
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}APAVTLFPPSSEEL	121
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}NPAVTLFPPSSEEL	122
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}APAVTLFPPSSEEL	123
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}NPAVTLFPPSSEEL	124
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}APAVTLFPPSSEEL	125
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}NPTVTLFPPSSEEL	126
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}APSVTLFPPSSEEL	127
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}NPTVTLFPPSSEEL	128
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}APSVTLFPPSSEEL	129
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}NPTVTLFPPSSEEL	130
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}APSVTLFPPSSEEL	131
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}NPTVTLFPPSSEEL	132
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}APSVTLFPPSSEEL	133
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}NPTVTLFPPSSEEL	134
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}APSVTLFPPSSEEL	135
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}N	136
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}A	137
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}N	138
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}A	139
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}N	140
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}A	141
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}N	142
C람다+VL	VFGBGTELTVLGQX^{109}KX^{111}A	143
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}N	144
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}A	145
C람다	GQX^{109}KX^{111}NPAV	146
C람다	GQX^{109}KX^{111}APAV	147
C람다	GQX^{109}KX^{111}N	148
C람다	GQX^{109}KX^{111}A	149
C람다	KX^{111}NPAV	150
C람다	KX^{111}APAV	151

[0221]

[0222] X^{109}는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T이고, 이는 바람직하게는 P로 대체됨.

[0223] X^{111}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 A이고, 이는 바람직하게는 R 또는 T 또는 W 또는 V로 대체됨.

[0224] X^{126}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 I이고, 이는 바람직하게는 A 또는 G 또는 H 또는 N 또는 P 또는 Q 또는 S 또는 T로 대체됨.

[0225] 일 실시양태에서, 표 E로부터 선택된 아미노산 서열에서, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고/있거나, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고/있거나, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 특정 실시양태에서, 표 E로부터 선택된 아미노산 서열에서, C카파 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, C카파 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 E로부터 선택된 아미노산 서열에서, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 E로부터 선택된 아미노산 서열에서, C카파 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 E로부터 선택된 아미노산 서열에서, C카파 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고, VL 도메인의 위치

126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다.

[0226] 특정 실시양태에서, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 표 E로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{109}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 표 E로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{126}에 있다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{109}, X^{111} 및 X^{126} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 A의 상응하는 야생형 아미노산 서열과 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0227] 일 실시양태에서, 아미노산 서열은 X^{109} 및/또는 X^{111} 및/또는 X^{126}을 포함하고 표 E로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0228] **표 F: 본 발명과 관련된 CH1 아미노산 서열의 이차 돌연변이.** EU 넘버링 체계에 따라, 위치 180은 X^{180}에 있고 위치 183은 X^{183}에 있으며 위치 188은 X^{188}에 있다.

[0229]

Fc 이소타입	아미노산 서열	서열번호
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTQTYICNV	152
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	153
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	154
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	155
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTQTYICNV	156
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	157
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	158
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	159
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTQTYICNV	160
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSNFGTQTYTCNV	161
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTQTYTCNV	162
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}PSSSLGTKTYTCNV	163
IgG1/IgG2/ IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVTX^{188}P	164
IgG1/IgG2/ IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}P	165
IgG1/IgG2/ IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVVDX^{188}P	166

[0230] X^{180}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 Y이고, 이는 바람직하게는 A 또는 G 또는 I 또는 N 또는 S 또는 T 또는 V 또는 W로 대체됨

[0231] X^{183}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 S이고, 이는 바람직하게는 N 또는 T로 대체됨

[0232] X^{188}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 V이고, 이는 바람직하게는 G로 대체됨

[0233] 일 실시양태에서, 표 F로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고/있거나, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고/있거나, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 일 실시양태에서, 표 F로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 일 실시양태에서, 표 F로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있다. 일 실시양태에서, 표 F로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 188에서의

이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 일 실시양태에서, 표 F로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인의 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다.

[0234] 특정 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이는 표 F로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{180}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 183에서의 이차 돌연변이는 표 F로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{183}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, CH1 도메인의 위치 188에서의 이차 돌연변이는 표 F로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{188}에 있다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{180}, X^{183} 및 X^{188} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 C의 상응하는 야생형 아미노산 서열로부터 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0235] 일 실시양태에서, 아미노산 서열은 X^{180} 및/또는 X^{183} 및/또는 X^{188}을 포함하고 표 F로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0236] 위에 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 아미노산 서열에서 돌연변이의 위치 지정은 수치 값을 참조하지만, 이는 이러한 특정 실시양태와 이러한 돌연변이를 추가로 논의하는 다른 실시양태 사이의 교차-참조를 허용한다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 개시된 아미노산 서열 내에 기재된 바와 같은 돌연변이는 또한 해당 서열의 맥락에서 포함될 수 있지만 연관된 번호에 의해 명시된 전체 위치에서는 포함될 수 없다는 것이 포괄된다. 따라서, 그리고 예로서, 아미노산 서열 AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVVEX^{188}PSSSLGTQTYICNV (서열번호 156)에서, CH1 도메인의 위치 180에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{180}에 있고/있거나, 위치 183에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{183}에 있고/있거나, 위치 188에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{188}에 있다는 것은, 이차 돌연변이가 아미노산 서열 AVLQSSGLXSLXSVVEXPSSSLGTQTYICNV (서열번호 156)의 위치 X 중 하나 이상에 있을 수 있다는 것이 또한 포함된다.

[0237] 참조로서, 돌연변이 세트 2 - 세트 2a 및 세트 2b에 나열된 돌연변이의 임의의 개별 및/또는 임의의 조합. 세트 2a - CH1에서의 돌연변이: Y180A, Y180G, Y180I, Y180N, Y180S, Y180T, Y180V 또는 Y180W, 및/또는 S183N 또는 S183T, 및/또는 V188G; 바람직하게는 Y180T 및/또는 S183T. 세트 2b - C카파 도메인에서의 돌연변이: A111R, A111T, A111W 또는 A111V, 및/또는 T109P; 바람직하게는 T109P 및/또는 A111V; 및/또는 가변 도메인 경쇄 (VL)에서의 돌연변이: I126A, I126G, I126H, I126N, I126P, I126Q, I126S, 또는 I126T.

[0238] 추가 실시양태에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인에서의 위치 185를 추가로 포함할 수 있다 (EU 넘버링 체계에 따름).

[0239] 추가 실시양태에서, 이차 돌연변이는 CH1 도메인에서의 V185X를 추가로 포함할 수 있다 (EU 넘버링 체계에 따름) *X는 임의의 아미노산을 지칭함.

[0240] 개선된 순도 돌연변이

[0241] 본원에 기재된 "개선된 순도 돌연변이"; 특히 "돌연변이 세트 1"은 "최적화된 RUBY™"의 돌연변이로서 또한 지칭될 수 있다.

[0242] "RUBY™ 포맷"의 이중특이적 폴리펩티드는 우수한 수준의 순도로 재현가능하게 생산될 수 있지만, "개선된 순도 돌연변이"를 갖는 "최적화된 RUBY™ 포맷"의 이중특이적 폴리펩티드는 훨씬 더 높은 수준의 순도로 재현가능하게 생산될 수 있다.

[0243] 개선된 순도 돌연변이가 본 발명의 폴리펩티드 (바람직하게는 이중특이적 폴리펩티드)에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 위에 기재된 일차 및/또는 이차 돌연변이 중 임의의 것과 조합하여 사용될 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0244] 본 발명의 일 실시양태에서 개선된 순도 돌연변이는 VH 도메인의 위치 65 (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있다.

[0245] 바람직한 실시양태에서, 개선된 순도 돌연변이는 VH 도메인의 X65E/A/I이다. 대안적인 바람직한 실시양태에서, 개선된 순도 돌연변이는 VH 도메인의 T65X이다.

[0246] 추가의 바람직한 실시양태에서, VH 도메인에서의 개선된 순도 돌연변이는 T65E 또는 T65A 또는 T65I이다.

[0247] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VH 도메인의 위치 65에서의 개선된 순도는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄, 바람직하게는 "H2" 쇄에 있다.

[0248] **표 G: 예시적인 IGHV3 생식계열 유전자 계열 구성원 IGHV3-23*01의 개선된 순도 돌연변이.** IMGT 넘버링 체계에 따른, VH 도메인의 위치 65는 X^{65}에 있다. CDR2에는 밑줄이 그어져 있다. X^{cn}은 X^{65} 이외의 CDR2의 아미노산이며, 여기서 X^{c}는 임의의 아미노산이고 n은 3 내지 12의 수, 바람직하게는 5 내지 10의 수, 가장 바람직하게는 7이며 - 예를 들어, n = 7인 CDR2의 경우, 서열은 $X^{c}X^{c}X^{c}X^{c}X^{c}X^{c}X^{c}X^{65}$이다.

[0249]

아미노산 서열	서열번호
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSX^{65}YYAISVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	167
PGKGLEWVSAISGSGGSX^{65}YYAISVKGRF	168
WVSAISGSGGSX^{65}YYAIS	169
AISGSGGSX^{65}Y	170
ISGSGGSX^{65}	171
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAX^{cn}X^{65}YYAISVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	172
PGKGLEWVSAX^{cn}X^{65}YYADSVKGRF	173
WVSAX^{cn}X^{65}YYADS	173
AX^{cn}X^{65}Y	175

[0250] X^{65}는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T이며, 이는 바람직하게는 E 또는 A 또는 I로 대체된다.

[0251] 일 실시양태에서, VH 도메인의 위치 65에서의 개선된 순도 돌연변이는 표 G로부터 선택된 아미노산 서열의 위치 X^{65}에 있다.

[0252] 일 실시양태에서, 아미노산 서열은 X^{65}를 포함하고 표 G로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0253] 제3 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0254] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0255] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0256] 여기서 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0257] 여기서 제2 중쇄 영역은 VH 도메인을 포함하고, 여기서 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위를 포함하고, 여기서 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 회피하는 돌연변이를 포함함.

[0258] 제3 양태의 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 본 발명의 제2 양태에 기재된 돌연변이 중 임의의 것뿐만 아니라, 그 안에 기재된 임의의 다른 특징부를 포함할 수 있다.

[0259] 본 발명의 제3 양태의 특정 실시양태는 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0260] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0261] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0262] 여기서 제2 경쇄 영역은 링커를 통해 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0263] 여기서 이중특이적 항체는 다음을 포함함: 각각이 면역글로불린의 제1 중쇄 영역, 링커 및 Fab의 제2 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 H1 쇄; 각각이 면역글로불린의 제1 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 L1 쇄; 및 Fab의 제2 중쇄

영역을 포함하는 2 개의 H2 쇄;

[0264] 여기서 2 개의 제2 중쇄 영역 (즉, H2)은 위치 65 (IMGT 넘버링 체계에 따름)에서의 돌연변이를 포함하는 VH 도메인을 포함함.

[0265] 참조로서, 돌연변이 세트 1 - 가변 도메인 중쇄 (VH)에서의 돌연변이: T65E, T65A, T65I.

[0266] 일차 돌연변이 및 "최적화된 RUBY™"의 돌연변이의 특히 바람직한 조합

[0267] 위에 논의된 바와 같이, 본원에 개시된 일차 돌연변이 중 임의의 것은 본원에 개시된 최적화된 RUBY™의 이차 돌연변이와 조합될 수 있고, 더욱이 최적화된 RUBY™의 개선된 순도 돌연변이와 조합될 수 있다. 그러나, 다음은 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이의 특히 바람직한 조합이다.

[0268] 위에 논의된 바와 같이, 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이의 임의의 조합, 예컨대, (c) 및 (d)의 다음의 이차 돌연변이 중 임의의 하나 이상, 또는 본원에 기재된 변이와 조합될, (a) 및 (b)의 일차 돌연변이 둘 모두 중 임의의 하나 이상은 동일한 폴리펩티드에서 사용될 수 있다:

[0269] (a) CH1 도메인의 T187E (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0270] (b) Cκ파 도메인의 S114A; 및

[0271] (c) CH1 도메인의 Y180T (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0272] (d) T109P 및/또는 A111V Cκ파 도메인 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름).

[0273] 따라서, 특정 실시양태에서, 일차 돌연변이 및 이차 돌연변이가 조합된 폴리펩티드는 다음의 돌연변이를 포함할 수 있다:

[0274] • CH1 도메인에서: Y180T 및 T187E (EU 넘버링 체계에 따름);

[0275] • Cκ파 도메인에서: T109P 및/또는 A111V, 및 S114A (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름).

[0276] 일 실시양태에서, 일차 돌연변이는 Cκ파 도메인의 위치 114 및/또는 CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이 쌍이고;

[0277] 이차 돌연변이는 다음으로 이루어진 목록으로부터 선택된 이차 돌연변이 쌍이다:

[0278] • VL 도메인의 위치 126 및/또는 CH1 도메인의 위치 180;

[0279] • VL 도메인의 위치 126 및/또는 CH1 도메인의 위치 183;

[0280] • VL 도메인의 위치 126 및/또는 CH1 도메인의 위치 188;

[0281] • Cκ파 도메인의 위치 109 및/또는 CH1 도메인의 위치 180;

[0282] • Cκ파 도메인의 위치 109 및/또는 CH1 도메인의 위치 183;

[0283] • Cκ파 도메인의 위치 109 및/또는 CH1 도메인의 위치 188;

[0284] • Cκ파 도메인의 위치 111 및/또는 CH1 도메인의 위치 180;

[0285] • Cκ파 도메인의 위치 111 및/또는 CH1 도메인의 위치 183; 및

[0286] • Cκ파 도메인의 위치 111 및/또는 CH1 도메인의 위치 188.

[0287] 바람직한 실시양태에서, 일차 돌연변이는 Cκ파 도메인의 S114A 및/또는 CH1 도메인의 T187E의 일차 돌연변이 쌍이고;

[0288] 이차 돌연변이는 다음을 포함하는 목록으로부터 선택된 이차 돌연변이 쌍이다:

[0289] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0290] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0291] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0292] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126A 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0293] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0294] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0295] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0296] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126G 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0297] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0298] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0299] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0300] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0301] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0302] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0303] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0304] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0305] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180I;

[0306] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 Y180W;

[0307] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T; 및

[0308] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G,

[0309] 바람직하게는:

[0310] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T

[0311] • VL 도메인에서의 돌연변이 I126S 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G

[0312] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T;

[0313] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G;

[0314] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T; 및

[0315] • C카파 도메인에서의 돌연변이 A111V 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 V188G, 가장 바람직하게는

[0316] • C카파 도메인에서의 돌연변이 T109P 및/또는 CH1 도메인에서의 돌연변이 S183T.

[0317] **표 H: 본 발명과 관련된 아미노산 서열인 C카파 및 VL, 또는 C카파/C람다에서의 일차 및 이차 돌연변이의 조합.**

C카파/C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 X^{109}에 있고, C카파/C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 X^{111}에 있고, C카파/C람다 도메인의 위치 114에서의 일차 돌연변이는 X^{114} (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름)에 있으며, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 X^{126} (IMGT 넘버링 체계에 따름)에 있다. 표 A에 대해 설명된 바와 같이, 마지막 VL 도메인 아미노산은 이탤릭체로 표시되어 있고, 제1 C카파/C람다 도메인 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다.

C카파+VL, 또는 C람다+VL	아미노산 서열	서열번호
C카파+VL	TFGQGTKVX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	176
C카파+VL	TFGQGTKLX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	177
C카파+VL	TFGPGTKVX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	178
C카파+VL	TFGQGTKVX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	179
C카파+VL	TFGQGTRLX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	180
C카파+VL	TFGAGTKLX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}VFIFPPSDEQL	288
C카파+VL	VX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}V	181
C카파+VL	LX^{138}IAXX^{109}VX^{111}APX^{114}V	182
C카파	XX^{109}VX^{111}APX^{114}V	183
C카파	VX^{111}APX^{114}V	184
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}NPX^{114}VTLFPPSSEEL	185
C람다+VL	VFGTGTKVTVLGQX^{109}KX^{111}APX^{114}VTLFPPSSEEL	186
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}NPX^{114}VTLFPPSSEEL	187
C람다+VL	VFGGGTKLTVLGQX^{109}KX^{111}APX^{114}VTLFPPSSEEL	188
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}NPX^{114}VTLFPPSSEEL	189
C람다+VL	VFGGGTQLIILGQX^{109}KX^{111}APX^{114}VTLFPPSSEEL	190
C람다+VL	VFGEGTELTVLGQX^{109}KX^{111}NPX^{114}VTLFPPSSEEL	191
C람다+VL	VFGEGTELTVLGQX^{109}KX^{111}APX^{114}VTLFPPSSEEL	192
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}NPX^{114}VTLFPPSSEEL	193
C람다+VL	VFGGGTQLTVLGQX^{109}KX^{111}APX^{114}VTLFPPSSEEL	194
C람다	GQX^{109}KX^{111}NPX^{114}V	195
C람다	GQX^{109}KX^{111}APX^{114}V	196
C람다	KX^{111}NPX^{114}V	197
C람다	KX^{111}APX^{114}V	198

[0318]

[0319] X^{114}는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T 또는 S이며, 이는 바람직하게는 A로 대체됨.

[0320] X^{109}는 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T이며, 이는 바람직하게는 P로 대체됨.

[0321] X^{111}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 A이며, 이는 바람직하게는 R 또는 T 또는 W 또는 V로 대체됨.

[0322] X^{126}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 I이며, 이는 바람직하게는 A 또는 G 또는 H 또는 N 또는 P 또는 Q 또는 S 또는 T로 대체됨.

[0323] 일 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고/있거나, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고/있거나, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 특정 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, C카파 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에

서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 추가 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다, 특정 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 109에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{109}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, C카파 또는 C람다 도메인의 위치 111에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{111}에 있다. 대안적인 특정 실시양태에서, 표 H로부터 선택된 아미노산 서열에서, 위치 114에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{114}에 있고, VL 도메인의 위치 126에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{126}에 있다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{109}, X^{111} 및 X^{126} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 A의 상응하는 야생형 아미노산 서열과 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0324] 일 실시양태에서, 아미노산 서열은 X^{114} 및 X^{109} 및/또는 X^{111} 및/또는 X^{126}을 포함하고 표 H로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{109}, X^{111} 및 X^{126} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 A의 상응하는 야생형 아미노산 서열과 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0325] **표 I: 본 발명과 관련된 CH1 아미노산 서열의 이차 돌연변이.** EU 넘버링 체계에 따르면, 위치 180은 X^{180}에 있고, 위치 183은 X^{183}에 있으며, 위치 188은 X^{188}에 있다.

[0326]

Fc 이소타입	아미노산 서열	서열번호
IgG1	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTQTYICNV	199
IgG2	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSNFGTQTYTCNV	200
IgG3	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTQTYTCNV	201
IgG4	AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$PSSSLGTKTYTCNV	202
IgG1/IgG2/ IgG3/IgG4	LX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}X^{188}$P	203

[0327] X^{187}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 T이며, 이는 바람직하게는 E 또는 D로 대체됨

[0328] X^{180}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 Y이며, 이는 바람직하게는 A 또는 G 또는 I 또는 N 또는 S 또는 T 또는 V 또는 W로 대체됨

[0329] X^{183}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 S이며, 이는 바람직하게는 N 또는 T로 대체됨

[0330] X^{188}은 임의의 아미노산이지만 바람직하게는 V이며, 이는 바람직하게는 G로 대체됨

[0331] 일 실시양태에서, 표 H로부터 선택되는 아미노산 서열에서, CH1 도메인에서의, 위치 187에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{187}에 있고, 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고/있거나, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고/있거나, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 표 H로부터 선택됨. 일 실시양태에서, 표 I로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인에서의, 위치 187에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{187}에 있고, 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 일 실시양태에서, 표 I로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인에서, 위치 187에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{187}에 있고, 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있다. 일 실시양태에서, 표 I로부터 선택된 아미노산 서열에

서, CH1 도메인에서, 위치 187에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{187}에 있고, 위치 180에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{180}에 있고, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 일 실시양태에서, 표 I로부터 선택된 아미노산 서열에서, CH1 도메인에서, 위치 187에서의 일차 돌연변이는 위치 X^{187}에 있고, 위치 183에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{183}에 있고, 위치 188에서의 이차 돌연변이는 위치 X^{188}에 있다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{180}, X^{183} 및 X^{188} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 C의 상응하는 야생형 아미노산 서열로부터 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0332] 일 실시양태에서, 아미노산 서열은 X^{187} 및 X^{180} 및/또는 X^{183} 및/또는 X^{188}을 포함하고 표 I로부터 선택된 아미노산 서열과 10% 이상; 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 이상; 또는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 인식될 것인 바와 같이, 돌연변이가 위치 X^{180}, X^{183} 및 X^{188} 중 하나 또는 2 개에 존재하지 않는 경우, 표 C의 상응하는 야생형 아미노산 서열로부터 동일한 위치에서의 아미노산이 포함될 것이다.

[0333] 위에 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 아미노산 서열에서 돌연변이의 위치 지정은 수치 값을 참조하지만, 이는 이러한 특정 실시양태와 이러한 돌연변이를 추가로 논의하는 다른 실시양태 사이의 교차-참조를 허용한다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 개시된 아미노산 서열 내에 기재된 바와 같은 돌연변이는 또한 해당 서열의 맥락에서 포함될 수 있지만 연관된 번호에 의해 명시된 전체 위치에서는 포함될 수 없다는 것이 포괄된다. 따라서, 그리고 예로서, 아미노산 서열 AVLQSSGLX^{180}SLX^{183}SVV$X^{187}$$X^{188}$PSSSLGTQTYICNV (서열번호 199)에서, CH1 도메인에서, 위치 187에서의 일차 돌연변이가 위치 X^{187}에 있고, 위치 180에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{180}에 있고/있거나, 위치 183에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{183}에 있고/있거나, 위치 188에서의 이차 돌연변이가 위치 X^{188}에 있다는 것은, 아미노산 서열 AVLQSSGLX^{S}SLX^{S}SVV$X^{P}$$X^{S}$PSSSLGTQTYICNV (서열번호 199)에서, 일차 돌연변이가 위치 X^{P}에 있고, 이차 돌연변이가 위치 X^{S} 중 하나 이상에 있을 수 있다는 것이 또한 포함된다.

[0334] 일 실시양태에서, 일차 돌연변이는 C카파 도메인의 위치 114 및 CH1 도메인의 위치 187에서의 일차 돌연변이 쌍이고/이거나;

[0335] 이차 돌연변이는 다음의 위치: CH1 도메인의 위치 180; CH1 도메인의 위치 183; CH1 도메인의 위치 188; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111; C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 109; VL 도메인의 위치 126 중 2 개 이상에 있고/있거나;

[0336] 폴리펩티드는 VH 도메인의 위치 65에서의 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0337] 제4 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0338] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0339] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0340] 여기서 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0341] 여기서 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키며; 그리고

[0342] 여기서 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 면역원성 반응 및/또는 면역원성을 유도할 예측된 위험을 감소시키거나 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함함.

[0343] 제4 양태의 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 본 발명의 제1 및/또는 제2 양태에 기재된 돌연변이 중 임의의 것뿐만 아니라 그 안에 기재된 임의의 다른 특징부를 포함할 수 있다.

[0344] 본 발명의 제4 양태의 특정 실시양태는 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0345] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린

분자; 및

[0346] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0347] 여기서 제2 경쇄 영역은 링커를 통해 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0348] 여기서 이중특이적 항체는: 각각이 면역글로불린의 제1 중쇄 영역, 링커 및 Fab의 제2 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 H1 쇄; 각각이 면역글로불린의 제1 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 L1 쇄; 및 Fab의 제2 중쇄 영역을 포함하는 2 개의 H2 쇄를 포함하고;

[0349] 여기서 이중특이적 항체는 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 및/또는 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 187 (EU 넘버링 체계에 따름)에서의 돌연변이를 포함하며; 그리고

[0350] 여기서 이중특이적 항체는 다음의 위치 중 2 개 이상의 돌연변이를 포함함: 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 180; 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 183; 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 188; 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111; 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 109; 및 2 개의 H1 쇄의 VL 도메인의 위치 126.

[0351] 제5 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0352] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0353] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0354] 여기서 제2 경쇄 영역은 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0355] 여기서 폴리펩티드는 중쇄 영역과 경쇄 영역의 회합을 촉진하기 위한 하나 이상의 일차 돌연변이를 포함하고, 여기서 이러한 돌연변이는 면역원성 반응을 유도할 예측된 위험을 증가시키고/시키거나, 폴리펩티드의 면역원성을 증가시키고;

[0356] 여기서 폴리펩티드는 하나 이상의 일차 돌연변이에 의해 유발되는 면역원성 반응 및/또는 면역원성을 유도할 예측된 위험을 감소시키거나 회피하기 위한 하나 이상의 이차 돌연변이를 포함하며; 그리고

[0357] 여기서 제2 중쇄 영역은 VH 도메인을 포함하고, 여기서 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위를 포함하고, 여기서 VH 도메인은 단백질 A 결합 부위에 대한 단백질 A의 결합을 감소시키거나 정지시키는 돌연변이를 포함함.

[0358] 제3 양태의 발명의 제5 실시양태에서, 폴리펩티드는 본 발명의 제1 및/또는 제2 양태에 기재된 돌연변이 중 임의의 것뿐만 아니라 그 안에 기재된 임의의 다른 특징부를 포함할 수 있다.

[0359] 본 발명의 제5 양태의 특정 실시양태는 다음을 포함하는, 이중특이적 항체를 제공한다:

[0360] (a) 제1 항원에 대한 특이성을 갖고, 2 개의 제1 중쇄 영역 및 2 개의 제1 경쇄 영역을 포함하는 면역글로불린 분자; 및

[0361] (b) 제2 항원에 대한 특이성을 갖고, 제2 중쇄 영역 및 제2 경쇄 영역을 포함하는, 2 개의 Fab 단편;

[0362] 여기서 제2 경쇄 영역은 링커를 통해 제1 중쇄 영역의 C-말단에 융합되어 있고;

[0363] 여기서 이중특이적 항체는: 각각이 면역글로불린의 제1 중쇄 영역, 링커 및 Fab의 제2 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 H1 쇄; 각각이 면역글로불린의 제1 경쇄 영역을 포함하는 2 개의 L1 쇄; 및 Fab의 제2 중쇄 영역을 포함하는 2 개의 H2 쇄를 포함하고;

[0364] 여기서 이중특이적 항체는 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 114 (EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름) 및/또는 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 187 (EU 넘버링 체계에 따름)에서의 돌연변이를 포함하고;

[0365] 여기서 이중특이적 항체는 다음의 위치: 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 180; 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 183; 2 개의 H2 쇄의 CH1 도메인의 위치 188; 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 111; 2 개의 H1 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 109; 및 2 개의 L1 쇄의 VL 도메인의 위치 126 중 2 개 이상에서의 돌연변이를 포함하며; 그리고

[0366] 여기서 2 개의 제2 중쇄 영역 (즉, H2)은 위치 65 (IMGT 넘버링 체계에 따름)에서의 돌연변이를 포함하는 VH 도메인을 포함함.

[0367] 본원에 기재된 돌연변이와 조합될 수 있는 추가적인 돌연변이

[0368] 본원에 기재된 "일차 돌연변이", "이차 돌연변이" 및 "개선된 순도 돌연변이" 외에, 다음의 "추가적인 돌연변이"는 또한 본 발명의 폴리펩티드에 포함될 수 있다. 이러한 추가적인 돌연변이는 계류 중인 영국 특허 출원 1820556.7 및 PCT 출원 WO 2020/127354에서 "RUBY™ 포맷"에 대해 기재된 돌연변이이며, 이는 여기에 기재된 일차 돌연변이가 아니다.

[0369] 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 면역글로불린의 중쇄 폴리펩티드와 면역글로불린의 경쇄 폴리펩티드의 회합을 촉진하고/하거나, Fab의 중쇄 폴리펩티드와 Fab의 경쇄 폴리펩티드의 회합을 촉진시키기 위한 하나 이상의 돌연변이이다.

[0370] 일 실시양태에서, 하나 이상의 추가적인 돌연변이는 응집체 및 Fab 부산물의 형성을 방지한다.

[0371] 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이가 입체 장애 및/또는 전하 간의 비양립성을 발생시킴으로써 응집체 및/또는 Fab 부산물의 형성을 방지할 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0372] "입체 장애"란, 입체적 벌크로 인한 반응의 저속화를 의미하며, 즉, 아미노산 분자의 크기는 더 작은 아미노산이 존재할 경우 달리 발생할 수 있는 2 개의 단백질 표면의 회합을 방지한다.

[0373] "전하 간의 비양립성"이란, 전하가 비양립되고 생성물이 형성되는 것을 방지하므로 원치 않은 생성물이 형성되지 않을 것임을 의미하며, 예컨대, 밀어내어, 원치 않은 생성물이 형성되는 것을 방지하는 2 개의 음으로 하전된 부분이 있을 수 있다.

[0374] 위에 기재된 바와 같이, 상기 추가적인 돌연변이는 예를 들어, 응집체 또는 부산물 Fab 단편의 형성을 제한하는 표면을 생성함으로써 Fab 부산물 및/또는 응집체의 형성을 제한한다. 일 실시양태에서, 일차 돌연변이는 입체 장애 및/또는 전하 간의 비양립성 (잘못된 쇄의 전하 비양립성을 야기함)을 생성함으로써 Fab 부산물의 형성을 방지한다. 일차 돌연변이는 또한 예를 들어, 염 또는 디설파이드 브릿지를 생성함으로써 올바른 쇄 사이 (즉, 제1 중쇄 폴리펩티드 및 제1 경쇄 폴리펩티드 사이 및/또는 제2 중쇄 폴리펩티드 및 제2 경쇄 폴리펩티드 사이)의 상호작용을 촉진할 수 있다.

[0375] 따라서, 추가적인 돌연변이는 이중특이적 폴리펩티드의 형성을 선호할 수 있다.

[0376] 일 실시양태에서, 제조 동안 형성된 응집체의 백분율은 25% 이하이다. 임의로, 응집체의 백분율은 20%, 17.5%, 15%, 13.5% 또는 10% 이하이다. 바람직하게는 응집체의 백분율은 10% 미만이다. 임의로, 이들 측정은 이중특이적 폴리펩티드의 쇄가 동일한 비, 예컨대, 생산 동안 3 개의 쇄가 사용되는 경우, 1:1:1 비로 형질주입될 때, 수행된다.

[0377] 대안적으로, 쇄 형질주입 비는 최적화될 수 있다. 임의로, 쇄 형질주입 비가 최적화될 때 응집체의 %는 3.5%, 3%, 2.5% 또는 2% 이하일 수 있다.

[0378] 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 각각이 2 개의 기능적으로 양립가능한 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 돌연변이 쌍을 포함한다.

[0379] "기능적으로 양립가능한 돌연변이"란, 돌연변이가 상보적인 기능을 가지고 있음을 의미하며, 예컨대, 쌍 중 하나의 돌연변이 (하나의 쇄에서)는 양으로 하전된 영역을 형성하는 돌연변이일 수 있고, 다른 돌연변이 (다른 쇄에서)는 음으로 하전된 영역을 형성한다. 이들 돌연변이는 함께 기능적으로 양립가능한 방식으로 작용하여 각각의 쇄의 회합을 촉진한다.

[0380] 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 다음의 영역 그룹 중 하나 이상에 하나 이상의 추가적인 돌연변이 쌍을 포함한다:

[0381] (a) 면역글로불린의 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역; 및/또는

[0382] (b) Fab의 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역; 및/또는

[0383] (c) 면역글로불린의 VL 및 VH 영역; 및/또는

[0384] (d) Fab의 VL 및 VH 영역.

[0385] 따라서, 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이 쌍은 Fab 및/또는 면역글로불린의 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역에 있고, 일차 돌연변이 쌍은 다음으로부터 선택된다:

[0386] (a) 공동 및 돌출 표면 돌연변이 (즉, 입체 돌연변이); 및/또는

[0387] (b) 소수성 스왑 돌연변이; 및/또는

[0388] (c) 하전된 돌연변이 (즉, 염 돌연변이); 및/또는

[0389] (d) 디설파이드 브릿지의 형성을 초래하는 돌연변이.

[0390] 추가적인 돌연변이 쌍은 대안적으로 또는 추가적으로 Fab 및/또는 면역글로불린의 VH 및 VL 영역에 있을 수 있으며, VH 및 VL 영역의 일차 돌연변이 쌍은 다음으로부터 선택된다:

[0391] (a) 하전된 돌연변이 (즉, 염 돌연변이); 및/또는

[0392] (b) 이중 하전된 돌연변이; 및/또는

[0393] (c) 디설파이드 브릿지의 형성을 초래하는 돌연변이.

[0394] 본 발명의 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0395] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 168, 170 및 145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0396] (b) C카파 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 132 내지 138, 위치 173 내지 179, 위치 130 내지 136, 위치 111 내지 117 및 위치 134 내지 140 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0397] (c) VL의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 117 내지 123 및 위치 46 내지 52 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0398] (d) VH의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 46 내지 52 및 위치 117 내지 123 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0399] 본 발명의 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0400] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 168, 170 및 145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0401] (b) C카파 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 132 내지 138, 위치 173 내지 179, 위치 130 내지 136, 위치 111 내지 117 및 위치 134 내지 140 (Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0402] (c) VL의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 117 내지 123 및 위치 46 내지 52 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0403] (d) VH의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 46 내지 52 및 위치 117 내지 123 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0404] 본 발명의 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0405] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 168, 170 및 145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0406] (b) C카파 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 132 내지 138, 위치 173 내지 179, 위치 130 내지 136, 위치 111 내지 117 및 위치 134 내지 140 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0407] (c) VL의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 117 내지 123 및 위치 46 내지 52 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0408] (d) VH의 다음의 위치 범위 중 하나 이상으로부터 선택된 위치: 위치 41 내지 47, 위치 46 내지 52 및 위치 117 내지 123 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0409] 위에 주어진 범위 각각의 하나의 돌연변이는 상응하는 도메인/쇄의 아미노산과 접촉하는 위치가 될 것이고 따라서 쇄 사이의 관련된 경계면이므로 관련된 기능적 돌연변이일 것이다.

[0410] 따라서, 관련된 기능적 특징은 위치가 다른 쇄의 상응하는 위치와 접촉하는지 여부, 즉, VL 쇄의 상응하는 위치와 접촉하는 VH 쇄의 위치가 관련된 위치이거나, CH1 쇄의 위치와 접촉하는 C람다의 위치가 관련된 위치이기 때문에, 위에 주어진 위치 범위의 추가적인 돌연변이가 적합하다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0411] 본 발명의 바람직한 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0412] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 168, 170 및 145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0413] (b) C카파 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 114, 133, 135, 137 및 176 (Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0414] (c) VL 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 44, 49 및 120 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0415] (d) VH 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 44, 49 및 120 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0416] 본 발명의 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0417] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 168, 170 및 145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0418] (b) C카파 또는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 114, 133, 135, 137 및 176 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0419] (c) VL 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 44, 49 및 120 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0420] (d) VH 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: 44, 49 및 120 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0421] 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0422] VH X44R/E/D/K, X49C, X120K

[0423] VL X44R/E/D/K, X49D X120C

[0424] CH1 X168A/G, X170G/A, 및 X145Q

[0425] C카파/C람다 X114A, X133T, X135Y/W, X137K/R/H, X176W/V/Y

[0426] *VH/VL 도메인의 경우 IMGT 체계에 따른 넘버링, 및 불변 도메인의 경우 EU 넘버링 체계에 따른 넘버링

[0427] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0428] 돌연변이를 논의하는 맥락에서 "/"의 사용은 대안의 가능한 아미노산을 예시하기 위한 것이며; 예를 들어, "X44R/E/D/K"는 R 또는 E 또는 D 또는 K가 위치 44에 아미노산 "X"에 대한 대체물로서 포함될 수 있음을 나타낸다.

[0429] 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0430] VH X44R/E/D/K, X49C, X120K

[0431] VL X44R/E/D/K, X49D X120C

[0432] CH1 X168A/G, X170G/A, X145Q

[0433] C카파/C람다 X114A, X133T, X135Y/W, X137K/R/H, X176W/V/Y

[0434] *VH/VL 도메인의 경우 IMGT 체계에 따른 넘버링, 및 불변 도메인의 경우 Kabat 넘버링 체계에 따른 넘버링

[0435] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0436] 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0437] VH Q44X, G49X, Q120X

[0438] VL Q44X, A49X, Q120X

[0439] CH1 H168X, F170X, L145X,

[0440] C카파/C람다 S/T114X, V133X, L135X, N/S137X, S176X

[0441] *VH/VL 도메인의 경우 IMGT 체계에 따른 넘버링, 및 불변 도메인의 경우 EU 넘버링 체계에 따른 넘버링

[0442] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0443] 일 실시양태에서 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0444] VH Q44X, G49X, Q120X

[0445] VL Q44X, A49X, Q120X

[0446] CH1 H168X, F170X, L145X

[0447] C카파/C람다 S/T114X, V133X, L135X, N/S137X, S176X

[0448] *VH/VL 도메인의 경우 IMGT 체계에 따른 넘버링, 및 불변 도메인의 경우 Kabat 넘버링 체계에 따른 넘버링

[0449] *X는 임의의 아미노산을 지칭함

[0450] 본 발명의 일 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있다:

[0451] (a) CH1 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: H168, F170 및 L145 (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0452] (b) C카파 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: L135, S176, V133 및 N137 (EU 넘버링 체계에 따름) 및/또는 C람다 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: L135, S176, V133 및 S137 (Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0453] (c) VL 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: Q44, Q120 및 A49 (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0454] (d) VH 도메인의 다음의 위치 중 하나 이상: Q44, G49 및 Q120 (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0455] 예를 들어, 추가적인 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0456] (a) CH1 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: H168A, F170G 및 L145Q (EU 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0457] (b) C카파 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: L135Y, S176W, V133T, S176V 및 N137K (EU 넘버링 체계에 따름) 및/또는 C람다 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: L135Y, S176W, V133T, S176V 및 S137K (Kabat 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0458] (c) VL 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: Q44R, Q44E, Q120C, Q44D 및 A49D (IMGT 넘버링 체계에 따름); 및/또는

[0459] (d) VH 도메인의 다음의 돌연변이 중 하나 이상: Q44E, Q44R, G49C, Q44K 및 Q120K (IMGT 넘버링 체계에 따름).

[0460] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VH 도메인의 위치 44에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0461] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VL 도메인의 위치 44에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄에 있다.

[0462] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VH 도메인의 위치 49에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0463] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VL 도메인의 위치 49에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄에 있다.

[0464] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VH 도메인의 위치 120에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0465] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 VL 도메인의 위치 120에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄에 있다.

[0466] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 168에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0467] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 170에서의 추가적인 돌연변이는

본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0468] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 CH1 도메인의 위치 145에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H2" 쇄에 있다.

[0469] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 133에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄에 있다.

[0470] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 135에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄에 있다.

[0471] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 176에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄에 있다.

[0472] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 137에서의 추가적인 돌연변이는 본원에 기재된 바와 같은 "H1" 쇄 및/또는 여기에 기재된 바와 같은 "L1" 쇄에 있다.

[0473] 특정 실시양태에서, 추가적인 돌연변이는 다음에 있다:

[0474] • VH 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44R 및/또는 Q44E)에;

[0475] • VL 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44R 및/또는 Q44E)에;

[0476] • CH1 도메인의 위치 168 및 170 (예컨대, H168A 및 F170G)에; 그리고

[0477] • C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 137, 135 및 176 (예컨대, N137K 또는 S137K, L135Y 및 S176W)에.

[0478] 특히 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 이중특이적 항체에서 추가적인 돌연변이는 다음에 있다:

[0479] • "H1" 쇄의 VH 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44R)에;

[0480] • "H1" 쇄의 VL 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44R)에;

[0481] • "H2" 쇄의 VH 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44E)에;

[0482] • "L1" 쇄의 VL 도메인의 위치 44 (예컨대, Q44E)에;

[0483] • "H1" 쇄의 CH1 도메인 위치 168 및 170 (예컨대, H168A 및 F170G)에;

[0484] • "H1" 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 137 (예컨대, N137K 또는 S137K)에; 그리고

[0485] • "L1" 쇄의 C카파 또는 C람다 (바람직하게는 C카파) 도메인의 위치 135 및 176 (예컨대, L135Y 및 S176W)에.

[0486] 폴리펩티드 결합 표적

[0487] 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 4가이며, 2 개의 항원 각각에 2가로 결합할 수 있다.

[0488] 일 실시양태에서, 이중특이적 폴리펩티드는 2 개의 아암을 갖고 따라서 제1 항원에 대한 2 개의 결합 부위를 갖는 항체로서 배열된 면역글로불린, 및 각각이 제2 항원에 대한 결합 부위를 제공하는 2 개의 Fab 단편을 포함한다. 따라서, 제1 항원에는 2 개의 결합 부위가 있고 제2 항원에는 2 개의 결합 부위가 있다.

[0489] 일 실시양태에서, 항원 (예컨대, 제1 및/또는 제2 항원)은 면역조정제이다.

[0490] "면역조정제"란, 면역 반응 또는 면역계의 기능을 변형시킬 수 있는 표적을 의미한다. 일 실시양태에서, 면역조

정제는 체크포인트 분자이다. "체크포인트 분자"란, 면역계의 조절자를 의미한다.

[0491] 체크포인트 분자 (예컨대, CD40)가 자극성 또는 억제성 체크포인트 분자일 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0492] 일 실시양태에서, 항원 (예컨대, 제1 및/또는 제2 항원)은 종양 세포-회합된 항원 (TAA)이다.

[0493] 따라서, 종양 세포-회합된 항원은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0494] a) 돌연변이된 종양유전자 및 종양 억압자 유전자의 산물;

[0495] b) 과발현되거나 비정상적으로 발현된 세포성 단백질;

[0496] c) 종양발생 바이러스에 의해 생산된 종양 항원;

[0497] d) 종양태아성 항원;

[0498] e) 변경된 세포 표면 당지질 및 당단백질;

[0499] f) 세포 유형별 분화 항원;

[0500] g) 저산소증-유도된 항원;

[0501] h) MHC 클래스 I에 의해 제시된 종양 펩티드;

[0502] i) 상피 종양 항원;

[0503] j) 혈액학적 종양-회합된 항원;

[0504] k) 암 정소 항원; 및

[0505] l) 흑색종 항원.

[0506] 일 실시양태에서, TAA는 EpCAM, 5T4 및/또는 CEACAM5이다.

[0507] 변이체

[0508] 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 이의 구성 결합 도메인 (예컨대, EpCAM- 또는 CD40-결합 도메인)은 본원에 인용된 특이적 아미노산 서열 중 임의의 것의 변이체 또는 단편을 포함할 수 있으며, 단, 폴리펩티드 또는 결합 도메인은 이의 표적에 대한 결합을 보유한다. 일 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 변이체는 본원에 인용된 서열의 CDR 서열을 보유할 수 있다.

[0509] 본원에 인용된 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열 중 어느 하나의 단편은 상기 아미노산 서열로부터 적어도 7 개, 적어도 8 개, 적어도 9 개, 적어도 10 개, 적어도 12 개, 적어도 15 개, 적어도 18 개, 적어도 20 개, 적어도 25 개, 적어도 50 개, 적어도 60 개, 적어도 70 개, 적어도 80 개, 적어도 90 개 또는 적어도 100 개의 연속 아미노산을 포함할 수 있다.

[0510] 본원에 인용된 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열 중 어느 하나의 변이체는 상기 서열의 치환, 결실 또는 첨가일 수 있다. 변이체는 상기 서열로부터의 1, 2, 3, 4, 5 개, 최대 10 개, 최대 20 개, 최대 30 개 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함할 수 있다. "결실" 변이체는 개별 아미노산의 결실, 아미노산의 작은 그룹, 예컨대, 2, 3, 4 또는 5 개의 아미노산의 결실, 또는 더 큰 아미노산 영역의 결실, 예컨대, 특이적 아미노산 도메인의 결실 또는 기타 특징부를 포함할 수 있다. "치환" 변이체는 바람직하게는 하나 이상의 아미노산의 동일한 수의 아미노산으로의 대체 및 보존적 아미노산 치환의 생성을 수반한다. 예를 들어, 아미노산은 유사한 특성을 갖는 대안의 아미노산, 예를 들어, 다른 염기성 아미노산, 다른 산성 아미노산, 다른 중성 아미노산, 다른 하전된 아미노산, 다른 친수성 아미노산, 다른 소수성 아미노산, 다른 극성 아미노산, 다른 방향족 아미노산 또는 다른 지방족 아미노산으로 치환될 수 있다. 적합한 치환체를 선택하기 위해 사용될 수 있는 20 가지 주요 아미노산의 일부 특성은 다음과 같다:

Ala, A	지방족, 소수성, 중성	Met, M	소수성, 중성
Cys, C	극성, 소수성, 중성	Asn, N	극성, 친수성, 중성
Asp, D	극성, 친수성, 하전된 (-)	Pro, P	소수성, 중성
Glu, E	극성, 친수성, 하전된 (-)	Gln, Q	극성, 친수성, 중성
Phe, F	방향족, 소수성, 중성	Arg, R	극성, 친수성, 하전된 (+)
Gly, G	지방족, 중성	Ser, S	극성, 친수성, 중성
His, H	방향족, 극성, 친수성, 하전된 (+)	Thr, T	극성, 친수성, 중성
Ile, I	지방족, 소수성, 중성	Val, V	지방족, 소수성, 중성
Lys, K	극성, 친수성, 하전된(+)	Trp, W	방향족, 소수성, 중성
Leu, L	지방족, 소수성, 중성	Tyr, Y	방향족, 극성, 소수성

[0511]

[0512] 본원의 아미노산은 완전한 명칭, 3글자 코드 또는 단일 글자 코드에 의해 지칭될 수 있다.

[0513] 바람직한 "유도체" 또는 "변이체"는 자연 발생 아미노산 대신에 서열에 나타나는 아미노산이 이의 구조적 유사체인 것들을 포함한다. 서열에 사용된 아미노산은 또한 유도체화 또는 변형, 예컨대, 라벨링될 수 있으며, 단, 항체의 기능은 유의하게 유해하게 영향받지 않는다.

[0514] 위에 기재된 바와 같은 유도체 및 변이체는 항체의 합성 동안에 또는 생산-후 변형에 의해 제조될 수 있거나, 항체가 부위-지시된 돌연변이유발, 무작위 돌연변이유발, 또는 핵산의 효소적 절단 및/또는 결찰의 알려진 기법을 사용하여 재조합 형태일 때 제조될 수 있다.

[0515] 바람직하게는, 변이체는 본원에 개시된 서열에 나타낸 바와 같은 서열과 60% 초과, 또는 70% 초과, 예컨대, 75 또는 80%, 바람직하게는 85% 초과, 예컨대, 90 또는 95% 초과의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 수준의 아미노산 동일성은 전장 폴리펩티드의 크기에 따라, 관련된 서열번호 서열의 전장 전체에 걸쳐 또는 서열의 일부에 걸쳐, 예컨대, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 개 이상의 아미노산 전체에 걸쳐 보일 수 있다.

[0516] 아미노산 서열과 관련하여, "서열 동일성"은 다음의 매개변수와 함께 ClustalW를 사용하여 평가할 때 언급된 값을 갖는 서열을 지칭한다 (Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* **22**(22):4673-80; 이의 개시내용은 본원에서 참고로 포함됨):

[0517] 쌍별 정렬 매개변수 - 방법: 정확한, 매트릭스: PAM, 갭 개방 페널티: 10.00, 갭 확장 페널티: 0.10;

[0518] 다중 정렬 매개변수 - 매트릭스: PAM, 갭 개방 페널티: 10.00, 지연에 대한 동일성%: 30, 페널티를 부과한 말단 갭: on, 갭 분리 거리: 0, 음의 매트릭스: no, 갭 확장 페널티: 0.20, 잔기-특이적 갭 페널티: on, 친수성 갭 페널티: on, 친수성 잔기: GPSNDQEKR. 특정 잔기에서 서열 동일성은 단순히 유도체화된 동일한 잔기를 포함하는 것으로 의도된다.

[0519] 기능적 특성

[0520] 또한, 본 발명의 폴리펩티드가 이의 기능적 특성 및 효과와 관련하여 정의될 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0521] 일 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC), 항체-의존적 세포성 식세포작용 (ADCP), 보체-의존적 세포독성 (CDC) 및/또는 아폽토시스를 유도할 수 있다.

[0522] 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 다음을 유도할 수 있다:

[0523] (a) B 세포의 활성화; 및/또는

[0524] (b) 수지상 세포의 활성화; 및/또는

[0525] (c) 세포독성 T 세포, 즉, CD8+ T 세포의 활성화; 및/또는

[0526] (d) 헬퍼 T 세포, 즉, CD4+ T 세포의 활성화; 및/또는

[0527] (e) 수지상 세포에 의한 개선된 종양 항원 교차-제시; 및/또는

[0528] (f) 종양 항원-특이적 T 세포의 확장; 및/또는

[0529] (g) ADCC 및/또는 종양 성장 및 생존 신호의 억제를 통한 직접적인 종양 세포 살해; 및/또는

[0530] (h) 내피 및/또는 간질 세포와의 상호작용을 통한 항혈관신생 효과; 및/또는

[0531] (i) 자연 살해 세포의 활성화; 및/또는

[0532] (j) Treg 고갈; 및/또는

[0533] (k) Treg의 이펙터 T 세포로의 재프로그래밍; 및/또는

[0534] (l) 종양 골수 세포 집단의 고갈; 및/또는

[0535] (m) 종양 골수 세포 집단의 재프로그래밍; 및/또는

[0536] (n) 항원-제시 세포에 의한 종양 잔해의 내재화; 및/또는

[0537] (o) 종양 세포외 소포의 내재화, 예컨대, 항원-제시 세포에 의한 엑소좀; 및/또는

[0538] (p) 종양 세포에 결합함으로써 종양 조직으로의 국소화.

[0539] 폴리펩티드가 위에 나열된 기능적 효과를 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 방법론은 당업자에게 알려져 있으며, 본 출원의 실시예에 또한 예시되어 있다.

[0540] 폴리펩티드는 T 세포 표적을 발현하는 세포의 활성을 조정할 수 있으며, 여기서 상기 조정은 상기 세포의 활성의 증가 또는 감소이다. 세포는 전형적으로 T 세포이다. 항체는 CD4+ 또는 CD8+ 이펙터 세포의 활성을 증가시킬 수 있거나, 조절 T 세포 (Treg)의 활성을 감소시킬 수 있다. 두 경우 중 어느 하나에서, 항체의 순 효과는 이펙터 T 세포의 활성의 증가일 것이다.

[0541] 이펙터 T 세포의 활성의 변화를 결정하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 대조군의 존재 하의 T 세포 IL-2 또는 IFN-γ 생산 및/또는 T 세포 증식의 수준에 비해 항체의 존재 하의 T 세포 IL-2 또는 IFN-γ 생산의 수준의 증가 또는 T 세포 증식의 증가를 측정하기 위한 단계를 포함한다. 세포 증식 및/또는 IL-2 또는 IFN-γ 생산에 대한 검정은 잘 알려져 있으며, 검정은 실시예에 또한 예시되어 있다. 이펙터 T 세포의 활성의 변화를 결정하는 추가적인 방법은 예컨대, T 세포에 의한 CD25, CD69, ICOS, EOMES, CD107a 및/또는 그랜자임 B의 발현의 변화를 측정하거나, 예컨대, CFSE를 사용하거나 Ki67의 수준을 측정하여 T 세포의 증식의 변화를 측정하는 것을 포함하며, 이들 둘 모두는 유세포 분석법-기반 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0542] Treg 세포의 활성의 변화를 결정하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, TGF-β 및 IFN-γ의 생산을 평가함으로써, CD3/CD28-자극된 CD4+ T 세포가 Treg 세포와 함께 공동-배양되고 CD4+ T 세포의 증식이 CFSE 또는 기타 유사한 증식 염료를 사용하여 평가되는 생체 외 검정에서 Treg 세포 억압 역량을 측정함으로써, 또는 CD4+ T 세포가 유도성 Treg (iTreg) 세포에 대한 분극화를 촉진하는 조건에서 배양되고 CD127저 FoxP3+ iTreg 세포의 빈도가 측정되는 생체 외 검정에서 Treg 세포 분화의 수준을 측정함으로써 생체 외 검정에서 Treg 세포의 Th 세포로의 재프로그래밍을 측정하는 단계를 포함한다. 항체에 의해 유도된 Treg 세포의 활성의 변화를 결정하기 위한 추가적인 방법은 Treg 세포의 고갈을 결정하기 위한 ADCC 리포터 검정, 또는 Treg 세포가 NK 세포 또는 대식세포와 함께 공동-배양되고 LDH 방출 또는 다양한 생존력 염색이 Treg 세포의 고갈을 결정하는 데 사용되는 기타 ADCC 리포터 검정을 포함한다.

[0543] NK 세포의 활성의 변화를 결정하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 유세포 분석법-기반 방법에 의해, 또는 항체가 NK 세포의 기능성에 미치는 영향이 사이토카인 및 용해 효소, 예컨대, IFN-γ, TNF-α 또는 퍼포린의 방출에 의해 측정될 수 있는 생체 외 검정에서 예컨대, CD25, CD107a, 그랜자임 B 또는 NKG2D의 발현의 변화를 측정하는 단계를 포함한다.

[0544] 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 이펙터 T 세포의 활성의 증가를 유도할 수 있으며, 임의로 여기서 상기 증가는 별도의 분자로서 T 세포에 투여된 면역글로불린 분자 및 Fab 단편의 조합에 의해 유도된 이펙터 T 세포의 활성의 증가보다 적어도 1.5-배, 4.5-배 또는 7-배 더 높다. 이는 T 세포 활성화 검정으로, 예컨대, IL-2 또는 IFN-γ 생산을 측정함으로써 생체 외에서 테스트될 수 있다. 이펙터 T 세포의 활성화는 종양-특이적 T 세포 반응이 생체 내에서 달성될 수 있음을 의미할 것이다. 추가로, 마우스 모델과 같은 생체 내 모델에서의 항-종양 반응은 종양에 대한 성공적인 면역 반응이 달성되었음을 의미할 것이다. 따라서, 이는 이중특이적 항체가 종양 면역을 유도할 수 있음을 나타낼 것이다.

[0545] 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 B 세포 또는 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포의 활성화의 증가를 유도한다.

[0546] 상기 활성화의 증가는 공동-자극 분자 CD80 또는 CD86의 발현의 증가, 또는 증가된 IL-12 생산, 또는 T-세포에 대해 MHC 클래스 I 또는 II 상의 항원, 예컨대, 종양 항원을 제시하는 증가된 능력 (또한 이중특이적 항체에 의해 유도된 (예를 들어, 예시적인 이중특이적 CD40-EPCAM 항체에 의해 유도된 바와 같은) 내재화에 의해 흡수되는 항원이 MHC 클래스 I 분자 상에 제시되는 소위 교차 제시라고 함)일 수 있으며, 이는 항원-제시 세포에 의해 상기 항원을 인식하는 T-세포의 향상된 활성화를 생성한다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다.

[0547] 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 B 세포 또는 수지상 세포와 같은 항원-제시 세포에 의한 종양 잔해 또는 종양 세포외 소포의 흡수의 증가를 유도한다.

[0548] 상기 흡수의 증가는 항원-제시 세포에 의한 종양 잔해 또는 종양 세포외 소포의 공동-국소화 또는 내재화에 의해 측정될 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 항원-제시 세포에 의한 종양 잔해 또는 종양 세포외 소포의 증가된 흡수는 후속적으로 더 넓은 T 세포 레퍼토리를 초래할 것이고, 따라서 더 효과적인 T 세포-매개 종양 근절을 초래할 것이다. 종양-항원 특이적 T 세포의 확장을 결정하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, MHC-펩티드 다합체, 예컨대, 사합체 또는 오합체의 사용을 포함한다. 이러한 확장은 특이적 종양 항원을 발현하는 종양 또는 종양 모델 항원 (예컨대, 난알부민)으로 형질주입된 종양을 마우스에 접종하거나, 대안적으로 괴사를 유도하기 위해 열 충격을 가한 동일한 세포를 마우스에 접종한 후, 유세포 분석법-기반 방법에 의해 다양한 MHC-종양 (모델) 항원 펩티드 사합체 또는 오합체를 사용하여 종양 항원-특이적 T 세포의 확장을 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0549] 일 실시양태에서, 폴리펩티드는 $100x10^{-9}$ M 미만, 또는 $50x10^{-9}$ M 미만, 또는 $25x10^{-9}$ M 미만, 바람직하게는 10, 9, 8, 7 또는 $6x10^{-9}$ M 미만, 보다 바람직하게는 5, 4, 3, 2 또는 $1x10^{-9}$ M 미만, 가장 바람직하게는 $9x10^{-10}$ M 미만의 K_D로 항원 (예컨대, 제1 및/또는 제2 항원)에 결합한다.

[0550] 표적에 대한 리간드의 결합 능력을 평가하기 위한 표준 검정은 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA 및 유세포 분석법을 포함하여 당업계에 잘 알려져 있다. 이중특이적 항체의 결합 동역학 (예컨대, 결합 친화도)은 또한 표면 플라스몬 공명 분석 (SPR)과 같은 당업계에 알려진 표준 검정에 의해 평가될 수 있다. 이러한 검정은 또한 본 출원의 실시예 내에서 입증된다.

[0551] 용어 "결합 활성" 및 "결합 친화도"는 폴리펩티드 분자가 표적에 결합하거나 결합하지 않는 경향을 지칭하는 것으로 의도된다. 결합 친화도는 폴리펩티드 및 그의 표적에 대한 해리 상수 (Kd)를 결정함으로써 정량화될 수 있다. Kd가 낮을수록 표적에 대한 친화도가 더 높다는 것을 나타낸다. 유사하게, 폴리펩티드의 그의 표적에 대한 결합의 특이성은 폴리펩티드 및 다른 비-표적 분자에 대한 해리 상수와 비교하여 그의 표적에 대한 폴리펩티드의 비교 해리 상수 (Kd)로 정의될 수 있다.

[0552] 이 해리 상수의 값은 잘 알려진 방법에 의해 직접 결정될 수 있으며, 복잡한 혼합물에 대해서도 예를 들어, Caceci *et al*. (Byte 9:340-362, 1984; 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 제시된 것들과 같은 방법에 의해 계산될 수 있다. 예를 들어, Kd는 Wong & Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993)에 의해 개시된 것과 같은 이중-필터 니트로셀룰로스 필터 결합 검정을 사용하여 확립될 수 있다. 표적에 대한 항체와 같은 리간드의 결합 능력을 평가하기 위한 다른 표준 검정은 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯, RIA 및 유세포 분석법을 포함하여 당업계에 알려져 있다. 항체의 결합 동역학 (예컨대, 결합 친화도)은 또한 Biacore™ 시스템 분석과 같은 당업계에 알려진 표준 검정에 의해 평가될 수 있다.

[0553] 표적에 대한 폴리펩티드의 결합을 해당 표적의 다른 알려진 리간드, 예컨대, 다른 항체에 의한 표적의 결합과 비교하는 경쟁적 결합 검정을 실시할 수 있다. 50% 억제가 발생하는 농도는 Ki로서 알려져 있다. 이상적인 조건하에서, Ki는 Kd와 동일하다. Ki 값은 결코 Kd보다 작지 않을 것이므로, Ki의 측정은 Kd의 상한치를 제공하는 데 편리하게 대체될 수 있다.

[0554] 결합 친화도의 대안적인 측정은 EC50 또는 IC50을 포함한다. 이러한 맥락에서 EC50은 폴리펩티드가 고정된 수량의 표적에 대한 최대 결합의 50%를 달성하는 농도를 나타낸다. IC50은 폴리펩티드가 고정된 수량의 표적에 대한 고정된 수량의 경쟁자의 최대 결합의 50%를 억제하는 농도를 나타낸다. 두 경우 모두에서, EC50 또는 IC50의 더 낮은 수준은 표적에 대한 더 높은 친화도를 나타낸다. 그의 표적에 대한 리간드의 EC50 및 IC50 값 둘 모두는 잘 알려진 방법, 예를 들어, ELISA에 의해 결정될 수 있다. 폴리펩티드의 EC50 및 IC50을 평가하기 위한 적합한 검정은 실시예에 제시되어 있다.

[0555] 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 다른 비-표적 분자와의 결합에 대한 친화도보다 적어도 2-배, 10-배, 50-

배 또는 100-배 이상의 친화도로 그의 표적 중 하나에 결합할 수 있다.

[0556] 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 세포

[0557] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드의 모두 또는 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 폴리펩티드 쇄를 코딩할 수 있다. 용어 "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중 하나의 임의의 길이의 뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예는 유전자, 유전자 단편, 전령 RNA (mRNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단리된 또는 실질적으로 단리된 형태로 제공될 수 있다. 실질적으로 단리된이란, 실질적이지만, 전체는 아닌, 임의의 주변 배지로부터의 폴리펩티드의 단리가 있을 수 있다는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 이들의 의도된 사용을 방해하지 않고 여전히 실질적으로 단리된으로서 고려될 것인 담체 또는 희석제와 혼합될 수 있다.

[0558] 선택된 폴리펩티드를 "코딩하는" 핵산 서열은 적절한 조절 서열의 제어 하에 놓일 때 생체 내에서 폴리펩티드로 (DNA의 경우에) 전사되고 (mRNA의 경우에) 번역되는 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5' (아미노) 말단에서 시작 코돈 및 3' (카복시) 말단에서 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 본 발명의 목적을 위해, 이러한 핵산 서열은 바이러스, 원핵 또는 진핵 mRNA로부터의 cDNA, 바이러스 또는 원핵 DNA 또는 RNA로부터의 게놈 서열, 및 심지어 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 전사 종결 서열은 코딩 서열에 대해 3'에 위치될 수 있다.

[0559] 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 이를 코딩하고 발현할 수 있는 폴리뉴클레오티드로부터 생산되거나 그 형태로 전달될 수 있다.

[0560] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 Green & Sambrook (2012, Molecular Cloning - a laboratory manual, 4th edition; Cold Spring Harbor Press; 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 예로서 기재된 바와 같이 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 합성될 수 있다.

[0561] 본 발명의 핵산 분자는 삽입된 서열에 작동가능하게 연결된 제어 서열을 포함하는 발현 카세트의 형태로 제공될 수 있으며, 이에 따라 생체 내에서 본 발명의 폴리펩티드의 발현이 가능해진다. 결과적으로, 이들 발현 카세트는 전형적으로 벡터 (예컨대, 플라스미드 또는 재조합 바이러스 벡터) 내에서 제공된다. 이러한 발현 카세트는 숙주 대상체에 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 숙주 대상체에 투여될 수 있다. 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드는 유전자 벡터를 사용하여 제조되고/되거나 투여된다. 적합한 벡터는 충분한 양의 유전자 정보를 운반할 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 임의의 벡터일 수 있다.

[0562] 따라서, 본 발명은 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 이러한 발현 벡터는 분자생물학의 분야에서 일상적으로 작제되고, 본 발명의 펩티드의 발현을 가능하게 하기 위해, 예를 들어, 플라스미드 DNA 및 적절한 개시제, 프로모터, 인핸서 및 기타 요소, 예컨대, 예를 들어, 필요할 수 있는, 정확한 배향으로 위치될 수 있는 폴리아데닐화 신호의 사용을 수반할 수 있다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 분명할 것이다 (상기 Green & Sambrook 참고).

[0563] 본 발명은 또한 본 발명의 이중특이적 항체 또는 구성요소 폴리펩티드를 발현시키도록 변형된 세포를 포함한다. 이러한 세포는 일시적인, 또는 바람직하게는 안정한 더 고등 진핵 세포주, 예컨대, 포유동물 세포 또는 곤충 세포, 하등 진핵 세포, 예컨대, 효모 또는 원핵 세포, 예컨대, 박테리아 세포를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 벡터 또는 발현 카세트의 삽입에 의해 변형될 수 있는 세포의 특정 예는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, NS0 및 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는, 선택된 세포주는 안정할 뿐만 아니라 폴리펩티드의 성숙한 글리코실화 및 세포 표면 발현을 가능하게 하는 것일 것이다.

[0564] 본 발명의 이러한 세포주는 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위한 일상적인 방법을 사용하여 배양될 수 있거나, 대상체에 본 발명의 항체를 치료적으로 또는 예방적으로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 또는 벡터는 엑스 비보에서 대상체로부터의 세포에 투여될 수 있고, 이어서, 세포는 대상체의 신체로 되돌아갈 수 있다.

[0565] 추가 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 폴리펩티드 및/또는 이중특이적 항체 중 임의의 것을 제조하는 방법을

제공한다.

[0566] 약학 제형, 치료적 용도 및 환자 그룹

[0567] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 세포와 같은 본 발명의 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드와 같은 본 발명의 하나 이상의 분자, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0568] 본원에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리학적으로 양립가능한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 및 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 (예컨대, 주사 또는 주입에 의한) 비경구, 예컨대, 정맥내, 근육내 또는 피하 투여에 적합하다. 투여의 경로에 따라, 폴리펩티드는 산, 및 폴리펩티드를 비활성화하거나 변성시킬 수 있는 기타 자연 조건의 작용으로부터 폴리펩티드를 보호하기 위해 재료로 코팅될 수 있다.

[0569] 바람직한 약학적으로 허용가능한 담체는 수성 담체 또는 희석제를 포함한다. 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 담체의 예는 물, 완충수 및 식염수를 포함한다. 다른 담체의 예는 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대, 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 재료, 예컨대, 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예컨대, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다.

[0570] 본 발명의 조성물은 또한 약학적으로 허용가능한 항산화제를 포함할 수 있다. 이들 조성물은 또한 아쥬반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 방지는 상기 멸균 절차에 의해 그리고 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 및 페놀 솔르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 또한 등장화제, 예컨대, 당, 및 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약학 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 약제의 포함에 의해 이루어질 수 있다.

[0571] 치료적 조성물은 전형적으로 제조 및 저장의 조건 하에서 멸균이며 안정하여야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다.

[0572] 멸균 주사가능한 용액은 필요에 따라 위에 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성제 (예컨대, 폴리펩티드)를 혼입한 후, 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 염기성 분산 매질 및 위에 열거된 것들로부터의 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성제를 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이며, 이는 이전에 이의 멸균-여과된 용액으로부터 활성제 + 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성한다.

[0573] 특히 바람직한 조성물은 전신 투여용 또는 국소 투여용으로 제형화된다. 국소 투여는 종양의 부위에 또는 종양-배출 림프절 내에 있을 수 있다. 조성물은 바람직하게는 일정 기간에 걸쳐 지속 방출되도록 제형화될 수 있다. 따라서, 조성물은 지속 방출을 용이하게 하는 매트릭스 내에 또는 그 일부로서 제공될 수 있다. 바람직한 지속 방출 매트릭스는 몬타나이드 또는 ɣ-폴리글루탐산 (PGA) 나노입자를 포함할 수 있다. 임의로 지속 기간에 걸친, 본 발명의 폴리펩티드의 국소화된 방출은 CTLA-4 길항제의 투여와 연관된 잠재적인 자가면역 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0574] 본 발명의 조성물은 추가적인 활성 성분뿐만 아니라 본 발명의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 위에 언급된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이들은 또한 추가적인 치료제 또는 예방제를 포함할 수 있다.

[0575] 또한 본 발명의 범주 내에는 본 발명의 폴리펩티드 또는 다른 조성물 및 사용을 위한 지침서를 포함하는 키트가 있다. 키트는 위에 논의된 바와 같은 추가적인 치료제 또는 예방제와 같은 하나 이상의 추가적인 시약을 추가로 함유할 수 있다.

[0576] 본 발명에 따른 폴리펩티드는 요법 또는 예방에 사용될 수 있다. 치료적 적용에서, 폴리펩티드 또는 조성물은 이미 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체에 병태 또는 이의 증상 중 하나 이상을 치유하거나, 완화시키거나, 부분적으로 저지시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 치료적 치료는 질환 증상의 중증도의 감소, 또는 증상

이 없는 기간의 빈도 또는 지속기간의 증가를 초래할 수 있다. 이를 달성하기에 적절한 양은 "치료적 유효량"으로서 정의된다. 예방적 적용에서, 폴리펩티드 또는 조성물은 아직 장애 또는 병태의 증상을 나타내지 않은 대상체에 증상의 발달을 예방하거나 지연시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효량"으로서 정의된다. 대상체는 임의의 적합한 수단에 의해 질환 또는 병태가 발달할 위험이 있는 것으로서 식별되었을 수 있다.

[0577] 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 암의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 또한 개체에 본 발명의 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드를 제공한다.

[0578] 암은 전립선암, 유방암, 결장직장암, 췌장암, 난소암, 폐암, 자궁경부암, 횡문근육종, 신경아세포종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 흑색종, 방광암, 위암, 두경부암, 간암, 피부암, 림프종 또는 교모세포종일 수 있다.

[0579] 본 발명의 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 당업계에 알려진 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 것인 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 전신 투여 또는 국소 투여가 바람직하다. 국소 투여는 종양의 부위에서 또는 종양-배출 림프절 내에 있을 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물에 대한 바람직한 투여 방식은 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수, 또는 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 기타 비경구 투여 방식을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "비경구 투여"는 보통 주사에 의한, 장 이외의 투여 및 국부 투여 방식을 의미한다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물은 비-경구 방식, 예컨대, 국부, 상피 또는 점막 투여 방식을 통해 투여될 수 있다.

[0580] 본 발명의 폴리펩티드의 적합한 투여량은 숙련된 의사에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에 대한 독성 없이, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료적 반응을 달성하는 데 유효한 활성 성분의 양을 수득하기 위해 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 특정 폴리펩티드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 폴리펩티드의 배출 속도, 치료의 지속기간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 재료, 치료 중인 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반적 건강상태 및 이전의 의료 병력, 및 의학 분야에 잘 알려진 유사한 인자를 포함하는 다양한 약동학적 인자에 좌우될 것이다.

[0581] 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물의 적합한 용량은 치료 중인 환자의, 예를 들어, 약 0.1 μg/kg 내지 약 100 ㎎/㎏ 체중의 범위에 있을 수 있다. 예를 들어, 적합한 투여량은 1 일당 약 1 μg/kg 내지 약 10 ㎎/㎏ 체중 또는 1 일당 약 10 g/kg 내지 약 5 ㎎/㎏ 체중일 수 있다.

[0582] 최적의 원하는 반응 (예컨대, 치료적 반응)을 제공하기 위해 투여량 양생법은 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있으며, 시간이 지남에 따라 몇몇 분할된 용량이 투여될 수 있거나, 치료적 상황의 긴급성에 의해 나타나는 바와 같이 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 유닛 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여량 유닛 형태는 치료될 대상체에 대한 일원화된 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개의 유닛을 지칭하고; 각각의 유닛은 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료적 효과를 생산하도록 계산된 활성 화합물의 소정의 수량을 함유한다.

[0583] 폴리펩티드 또는 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 다중 용량은 동일하거나 상이한 경로를 통해 그리고 동일하거나 상이한 위치에 투여될 수 있다. 대안적으로, 폴리펩티드 또는 조성물은 위에 기재된 바와 같이 지속 방출 제형으로서 투여될 수 있으며, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서의 폴리펩티드의 반감기 및 원하는 치료의 지속기간에 따라 달라질 수 있다. 투여 용량 및 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서, 상대적으로 낮은 투여량이 긴 기간에 걸쳐 상대적으로 빈번하지 않은 간격으로 투여될 수 있다. 치료적 적용에서, 예를 들어, 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 완전한 호전을 보일 때까지 상대적으로 높은 투여량이 투여될 수 있다.

[0584] 2 개 이상의 약제의 병용 투여는 다수의 상이한 방법으로 달성될 수 있다. 일 실시양태에서, 폴리펩티드 및 다른 약제는 단일 조성물 중에서 함께 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 폴리펩티드 및 다른 약제는 병용 요법의 일부로서 별도의 조성물로 투여될 수 있다. 예를 들어, 조정제는 다른 약제 이전, 이후 또는 동시에 투여될

수 있다.

[0585] 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물은 또한 제1 및 제2 항원을 발현하는 세포의 집단의 활성화를 증가시키는 방법에 사용될 수 있으며, 이 방법은 본 발명의 상기 세포와 폴리펩티드 사이의 상호작용을 허용하기에 적합한 조건 하에서 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물을 상기 세포의 집단에 투여하는 단계를 포함한다. 세포의 집단은 전형적으로 제1 항원을 발현하는 적어도 일부 세포, 및 제2 항원을 발현하는 적어도 일부 세포를 포함한다. 이 방법은 전형적으로 엑스 비보에서 수행된다.

[0586] 또한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 "항체들"을 포함하고, "항원"에 대한 언급은 2 개 이상의 이러한 항원을 포함하며, "대상체"에 대한 언급은 2 명 이상의 이러한 대상체를 포함하는 등이다.

[0587] 본원에 인용된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원은 상기 또는 아래에 관계없이, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0588] 본 명세서에서 명백하게 이전에 공개된 문서의 나열 또는 논의는 반드시 해당 문서가 최신 기술의 일부이거나 일반적인 일반 지식이라는 것을 인정하는 것으로서 간주해서는 안 된다.

[0589] 본 발명은 추가의 제한으로서 해석되어서는 안 되는 다음의 실시예에 의해 추가로 예시된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 도면 및 모든 참조, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에서 참조로서 명시적으로 포함된다.

[0590] ***실시예***

[0591] ***실시예 1 - 인실리코 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시키는 돌연변이의 식별. 단일 돌연변이체에 대한 연구.***

[0592] **목표 및 배경**

[0593] 이 연구의 목적은 제조가능성 또는 표적 결합에 부정적인 영향을 주지 않으면서 이중특이적 항체 (bsAb)에서 코어 펩티드의 예측된 MHC 클래스 II 결합을 제거할 수 있는 돌연변이 (불변 경쇄에서의 S114A 돌연변이 및/또는 CH1 불변 중쇄 도메인에서의 T187E 돌연변이를 운반함 - 본원에 기재된 바와 같이 소위 '일차' 돌연변이라고 함)를 식별하고 평가하는 것이었다.

[0594] **재료 및 방법**

[0595] 코어 펩티드 예측

[0596] 불변 경쇄에서의 돌연변이 S114A 및 불변 중쇄에서의 T187E를 포함하는 선택된 펩티드의 코어 펩티드는 NetMHCIIpan 3.4 도구를 사용하여 예측되었다. AbEpi분석기 도구 (EIR Sciences)에 의해 정의된 세계 평균 집단에서 가장 일반적인 20 개의 대립유전자를 기본 소프트웨어 설정과 함께 예측에 사용하였다.

[0597] 잠재적으로 감소된 MCH II 결합을 갖는 돌연변이 변이체의 설계

[0598] 식별된 코어 펩티드에 기반하여, S114A 및 T187E 돌연변이를 커버하기 위한 광범위한 돌연변이 펩티드의 세트를 설계하였다. 20 개의 아미노산은 모두 T187E 돌연변이를 포함하는 코어 펩티드의 접촉 잔기 1, 4, 6 및 9, 및 S114 A 돌연변이를 포함하는 코어 펩티드의 위치 1, 4 및 6에 도입되었다 (S114는 코어 펩티드의 p9에 있고, 이에 따라 달라질 수 없음).

[0599] 인실리코 펩티드-MHC 클래스 II 결합 예측 도구

[0600] 인실리코 예측을 AbEpi분석기 도구에 아미노산 서열을 제출함으로써 수행하였다. 간략하게, 제출된 서열의 각각의 15-mer 펩티드에 대해, 무작위로 선택된 대규모 15-mer 세트의 친화도에 대해 예측된 친화도를 비교함으로써 백분위수 순위가 생성된다. 상이한 대립유전자가 높은 또는 낮은 결합 친화도에 대한 편향을 나타내기 때문에 순위 임계치는 친화도보다 선호된다. IEDB에 의해 권장된 바와 같이, 백분위수 순위가 < 10인 펩티드가 결합 예측에 포함되었다. AbEpi분석기는 먼저 NetMHCII3.1 알고리즘을 사용하여 각각의 15-mer 펩티드의 인간 MHC 클래스 II 대립유전자의 대규모 패널에 대한 결합을 예측하고 후속적으로 위치-별 위험 점수를 계산함으로써 항체 및 서열-변형된 단백질의 잠재적인 면역원성을 분석한다. 점수는 정의된 집단에서 주어진 위치와 중첩되는 HLA-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ 결합 서브-펩티드의 빈도를 반영한다. 위치-별 위험 점수는 각각의 서열에 걸쳐 합산된다. 위치-별 위험 점수에 대한 컷오프 값은 0.1로 설정된다 (즉, 모든 위치-별 위험 점수 < 0.1은 0으로

설정됨).

[0601] 항체의 분석을 위해, 프로그램은 blastp를 사용하여, 중쇄 및 경쇄 V-유전자의 데이터베이스로부터의 생식계열 유전자를 식별하고 정렬한다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 각각 중쇄 및 경쇄의 다중 정렬에 기반하여 개발된 경쇄 및 중쇄 숨겨진 마르코 모델을 사용함으로써 식별된다. 서열-변형된 단백질의 경우, 야생형 서열은 사용자가 별도로 제출한다. 생식계열 또는 야생형 단백질의 HLA 결합 특성을 빼면, 잠재적인 T-세포 신생-에피토프가 식별된다.

[0602] HLA 대립유전자의 세계 평균 집단을 사용하였으며, 여기서 북미 집단은 52.7%, 유럽 집단은 25.3%, 동북아 집단은 9.2%, 동남아시아 집단은 5.9%, 중남미 집단은 1.7%, 오세아니아 집단은 1.3%, 서아시아 집단은 1.3%, 사하라 이남 아프리카 집단은 1.0%, 남아시아 집단은 0.7%, 북아프리카 집단은 0.6%, 그리고 호주 집단은 0.1%의 비중을 가지고 있다. 결과는 위치-별 위험 점수로서 그리고 대립유전자 결합 및 고-주파 (즉, 무차별 (promiscuous)) 신생-에피토프의 존재를 식별하기 위한 열 플롯으로서 제시된다.

[0603] 아미노산 서열

[0604] 단백질 백본으로서 RUBY™ bsAb AC_05293을 사용하여 단일 돌연변이체를 생성하였다. 잠재적인 탈면역화된 돌연변이 외에도, 이 항체는 RUBY™ 특이적 돌연변이의 세트를 운반한다 (표 1).

[0605] 표 1. AC_05293의 RUBY™ 특이적 돌연변이

[0606]

RUBY™ ID	가변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이*	불변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이**
AC_05293	쇄 H1의 VH 및 VL에서의 Q44R 쇄 L1의 VL에서의 Q44E 쇄 H2의 VH에서의 Q44E	쇄 H1의 CH1에서의 H168A + F170G 쇄 H2의 CH1에서의 T187E 쇄 H1의 C카파에서의 S114A + N137K 쇄 L1의 C카파에서의 L135Y + S176W

[0607] *IMGT 넘버링 체계에 따름

[0608] **EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름

[0609] 구조적 검토

[0610] 항체의 CH1 및 Cκ의 3D 구조는 PyMOL (버전 1.8.2.0) 및 RCSB 단백질 데이터 뱅크로부터 다운로드한 항체 구조 5I18 및 3ZHK를 사용하여 수행되었다.

[0611] 유전자 합성 및 클로닝

[0612] 식별된 관심 있는 탈면역화된 돌연변이를 혼입하는 유전자 단편은 Twist Bioscience로부터 수득되었고, 표준 유형 IIS 클로닝을 사용하여 bsAb AC_05293의 추가적인 부분을 코딩하는 유전자 단편과 함께 Alligator의 pCDNA3.4 발현 벡터 내로 클로닝되었다.

[0613] 단백질 생산 및 정제

[0614] 제조업체의 지침에 따라 일시적 Expi293 (Life technologies) 배양물을 사용하여 항체를 발현시켰다. 상층액의 정제는 예측기 MabSelectSure 50 μl 96 웰 플레이트 (GE Healthcare)에서 이루어졌다. bsAb를 구성하는 3 개의 공동-발현된 폴리펩티드 쇄 각각에 대해 별도로 코딩하는 3 개의 상이한 벡터로 세포를 형질주입시켰다.

[0615] 이중 ELISA

[0616] 플레이트를 0.5 μg/mL의 PBS 중 CD40으로 밤새 4℃에서 코팅하였다. PBS/0.05% Tween 20 (PBST)으로 세척한 후, 플레이트를 PBS/2% BSA로 실온에서 적어도 30 분 동안 차단한 후, 다시 세척하였다. 이어서, PBS/0.5% BSA에 연속적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 실온에서 적어도 1 시간 동안 결합되도록 두었다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 적어도 1 시간 동안 0.5 μg/mL 비오티닐화된 EpCAM과 함께 항온처리하였다. CD40 및 EpCAM을 포함하는 이중 복합체화된 bsAb를 HRP-라벨링된 스트렙타비딘으로 검출하였다. SuperSignal Pico Luminescent를 기질로서 사용하였고, Fluostar Optima를 사용하여 발광 신호를 측정하였다.

[0617] **결과 및 결론**

[0618] 코어 펩티드의 식별

[0619] 인실리코 예측을 사용하여, 증가된 MHC II 결합을 갖는 펩티드를 야기할 수 있는 돌연변이를 식별하는 것이 가능하였다. 이들은 첨부된 Fab의 경쇄에서 돌연변이 S114A, 및 첨부된 Fab의 중쇄에서 T187E를 포함하는 펩티드였다. 추가로 인실리코 분석에서는 예측된 MHC II 펩티드 상의 아미노산 중 코어 아미노산일 가능성이 있는 아미노산 (즉, MHC II 복합체 또는 T 세포 수용체 (TCR)와의 상호작용에 관여하는 아미노산)을 식별할 수 있으며, 이로부터 MHC 클래스 II 복합체와 상호작용할 가능성이 있는 잔기 (코어 펩티드의 위치 1, 4, 6 및 9)를 식별할 수 있다. MHC 클래스 II 복합체와 접촉할 것으로 예측되는 코어 아미노산은 표 2에서 X로 마킹되어 있다.

[0620] 표 2. RUBY 돌연변이 S114A 및 T187E에 대한 코어 펩티드 서열

[0621]

RUBY 돌연변이	**서열 유형**	**서열 및 코어 아미노산**
T187E	Seq A*	AVLQSSGL**X**SL**X**S**X**VE**X**PSSSLGTQTYICNV (서열번호 204)
	Seq B‡	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV (서열번호 76)
S114A	Seq A	TFGAGTKLE**X**KR**X**V**X**APAVFIFPPSDEQL (서열번호 205)
	Seq B	TFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL (서열번호 206)

[0622] **Seq A 서열은 RUBY 유래된 서열임. RUBY에서 최적의 쇄의 쌍을 이루는 데 필요한 돌연변이에 밑줄 그어져 있음. X는, MHC II 단백질과 상호작용할 것으로 예측되고 돌연변이되어 면역원성 위험을 감소시킬 수 있는 코어 아미노산을 마킹함.*

[0623] ‡*Seq B는 야생형 (WT) 참조 서열임*

[0624] Seq A 및 Seq B의 서열은 C카파 도메인 및 VL 도메인 둘 모두를 포함한다 - Seq B **TFGAGTKLEIK**RTVAAPSVFIFPPSDEQL (서열번호 206)을 참조하면, C카파 도메인은 밑줄이 그어져 있고 VL은 볼드체로 표시되어 있다.

[0625] 탈면역화된 RUBY 변이체의 식별

[0626] 예측된 코어 아미노산을 사용하여, 더 낮은 예측된 MHC 클래스 II 결합을 갖는 잠재적인 돌연변이를 인실리코 MHC 클래스 II 펩티드 결합 분석을 사용하여 평가하였다. 결과에서는 첨부된 Fab의 경쇄에서 S114A 돌연변이 및 첨부된 Fab의 중쇄에서 T187E의 예측된 위험 점수를 0 또는 0에 가깝게 감소시키는 여러 돌연변이가 밝혀졌다.

[0627] RUBY의 면역원성을 감소시킬 잠재력이 있는 식별된 각각의 돌연변이의 상세한 검토를 수행하여, 바람직하지 않은 제조가능성 특질을 갖는 아미노산 또는 부위를 도입할 것인 돌연변이뿐만 아니라 3D 구조에서의 이들의 위치에 기반하여 기능적이고 안정한 단백질을 생성할 가능성이 매우 낮은 돌연변이를 제거하였다. 추가의 평가를 위해 선택된 나머지 탈면역화된 돌연변이의 전체 목록은 표 3에서 찾아볼 수 있다.

[0628] 표 3. 단백질 생산 및 평가를 위해 선택된 서열 ID 및 돌연변이.

	SEQ_ID	돌연변이
C카파 경쇄 상의 S114A*에 의해 유발되는 예측된 MHC II 결합을 감소시키는 돌연변이	4109	VL에서의 I126A**
	4110	VL에서의 I126G**
	4111	VL에서의 I126H**
	4112	VL에서의 I126N**
	4113	VL에서의 I126P**
	4114	VL에서의 I126Q**
	4115	VL에서의 I126S**
	4116	VL에서의 I126T**
	4117	C카파에서의 T109P*
	4118	A111R* C카파
	4119	A111T* C카파
	4120	A111V* C카파
	4121	A111W* C카파
CH1 상의 T187E*에 의해 유발되는 예측된 MHCII 결합을 감소시키는 돌연변이	4124	Y180A* C카파
	4125	Y180G* C카파
	4126	Y180I* C카파
	4127	Y180N* C카파
	4128	Y180S* C카파
	4129	Y180T* C카파
	4130	Y180V* C카파
	4131	Y180W* C카파
	4132	S183N* C카파
	4133	S183T* C카파
	4134	V188G* C카파

[0629]

[0630] *EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름

[0631] **IMGT 넘버링 체계에 따름

[0632] **단일 부위 돌연변이체의 평가**

[0633] 클로닝 및 생산

[0634] 표 3에 나열된 추가적인 돌연변이 중 하나를 운반하는 RUBY 변이체를 조작하고, 고 처리량의 96-웰 포맷으로 생산하였다 (HT 생산). 돌연변이 변이체의 일시적인 배양물로부터의 생산성은 일반적으로 양호하였고, 야생형 bsAb와 비슷한 수준이었다 (데이터는 도시되지 않음).

[0635] 이중 ELISA

[0636] 이중 ELISA 설정을 사용하여 두 표적 모두 (CD40 및 EpCAM)에 대한 동시 결합을 평가하였다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 평가된 돌연변이체의 대다수는 야생형 bsAb와 비슷한 수준으로 두 표적 모두에 대한 결합을 유지하였다. 이중 ELISA로부터의 결과를 두 표적 모두에 대한 단일 ELISA에 의해 추가로 확인하였다 (데이터는 도시되지 않음).

[0637] 전체적으로, 제조가능성 또는 표적 결합에 부정적인 영향을 주지 않으면서 돌연변이 S114A 또는 T187E를 운반하

는 RUBY™ bsAb 유래된 펩티드의 인실리코 예측된 면역원성 위험을 감소시키는 다양한 단일 아미노산 돌연변이의 세트를 식별할 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

[0638] ***실시예 2 - 인실리코 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시키는 돌연변이 조합의 평가 - 이중 돌연변이에 대한 연구.***

[0639] **목표 및 배경**

[0640] 이 연구의 목적은 인실리코 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시키는 돌연변이 조합을 평가하고, 항원 결합, 안정성 또는 발달성에 부정적인 영향을 주지 않으면서 RUBY™ bsAb에서 코어 펩티드의 예측된 MHC 클래스 II 결합을 감소시킬 수 있는 돌연변이의 쌍 (불변 경쇄 도메인에서 S114A 돌연변이 및/또는 CH1 불변 중쇄 도메인에서 T187E 돌연변이를 보유함)을 식별하는 것이었다.

[0641] **재료 및 방법**

[0642] 구조적 검토

[0643] 항체의 CH1 및 Cκ의 3D 구조는 PyMOL (버전 1.8.2.0) 및 RCSB 단백질 데이터 뱅크로부터 다운로드한 항체 구조 5I18 및 3ZHK를 사용하여 수행되었다.

[0644] 아미노산 서열

[0645] AC_05293 bsAb를 단백질 백본으로서 사용하여 이중 돌연변이체를 생성하였다. 잠재적으로 탈면역화된 돌연변이 외에도, 이 항체는 RUBY™ 특이적 돌연변이의 세트를 운반한다 (표 4). 표 5에 나열된 세트 A 및 세트 B 돌연변이의 20 개의 가능한 이중 돌연변이체 조합 모두를 생성하였다.

[0646] 표 4. AC_05293의 RUBY™ 특이적 돌연변이

[0647]

RUBY™ ID	가변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이*	불변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이**
AC_05293	쇄 H1의 VH 및 VL에서의 Q44R 쇄 L1의 VL에서의 Q44E 쇄 H2의 VH에서의 Q44E	쇄 H1의 CH1에서의 H168A + F170G 쇄 H2의 CH1에서의 T187E 쇄 H1의 C카파에서의 S114A + N137K 쇄 L1의 C카파에서의 L135Y + S176W

[0648] *IMGT 넘버링 체계에 따름

[0649] **EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름

[0650] 유전자 합성 및 클로닝

[0651] 식별된 관심 있는 탈면역화된 돌연변이를 혼입하는 유전자 단편은 Twist Bioscience로부터 수득되었고, 표준 유형 IIS 클로닝을 사용하여 bsAb AC_05293의 추가적인 부분을 코딩하는 유전자 단편과 함께 Alligator의 pCDNA3.4 발현 벡터 내로 클로닝되었다.

[0652] 단백질 생산 및 정제

[0653] 항체는 제조업체의 지침에 따라 상이한 부피 (고 처리량 1.2 mL 또는 30 mL)의 일시적 Expi293 (Life technologies) 배양물을 사용하여 발현되었다. 30 mL 배양물로부터의 상층액의 정제는 고 처리량 발현으로부터의 상층액에 대해 NGC 시스템 (BioRad) 또는 예측기 MabSelectSure 50 µl 96 웰 플레이트 (GE Healthcare)를 사용하여 단백질 A에서 이루어졌다. bsAb를 구성하는 3 개의 공동-발현된 폴리펩티드 쇄 각각을 별도로 코딩하는 3 개의 상이한 벡터로 세포를 형질주입시켰다.

[0654] SEC-HPLC

[0655] TSK 겔 Super SW mAB HTP 4 µm, 4,6x150 mm 컬럼 (TOSOH Bioscience) 및 100 mM 인산나트륨, pH 6.8, 주변 온도 및 0.35 ml/분의 유속에서 이동상으로서의 300 mM NaCl을 사용하여 1260 Infinity II 시스템 (Agilent Technologies)에서 SE-HPLC로 응집을 측정하였다.

[0656] LabCHIP

[0657] 모든 샘플의 분석을 제조업체 및 다음의 당사의 일상적인 가이드라인 DOCID-371837740-15에 의해 기재된 바와 같이 LabChip GXII (PerkinElmer)에서 수행하였다. 간략하게, (환원된 또는 비-환원된) 2 μL의 각각의 단백질 샘플를 90℃에서 5 분 동안 변성시킨 후, 원심분리하고 미세유체 칩에 로딩하였다.

[0658] 단일 ELISA

[0659] 플레이트를 0.5 μg/mL의, PBS 중 CD40 또는 EpCAM으로 밤새 4℃에서 코팅하였다. PBS/0.05% Tween 20 (PBST)으로 세척한 후, 플레이트를 PBS/2% BSA로 실온에서 적어도 30 분 동안 차단한 후, 다시 세척하였다. 이어서, PBS/0.5% BSA에 연속적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 실온에서 적어도 1 시간 동안 결합되도록 두었다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 적어도 1 시간 동안 이차 항 카파 항체와 함께 항온처리하였다. 세척 후, SuperSignal Pico Luminescent를 기질로서 사용하였고, Fluostar Optima를 사용하여 발광 신호를 측정하였다.

[0660] 이중 ELISA

[0661] 플레이트를 0.5 μg/mL의, PBS 중 CD40으로 밤새 4℃에서 코팅하였다. PBS/0.05% Tween 20 (PBST)으로 세척한 후, 플레이트를 PBS/2% BSA로 실온에서 적어도 30 분 동안 차단한 후, 다시 세척하였다. 이어서, PBS/0.5% BSA에 연속적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 실온에서 적어도 1 시간 동안 결합되도록 두었다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 적어도 1 시간 동안 0.5 μg/mL 비오티닐화된 EpCAM과 함께 항온처리하였다. CD40 및 EpCAM을 포함하는 이중 복합체화된 bsAb를 HRP-라벨링된 스트렙타비딘으로 검출하였다. SuperSignal Pico Luminescent를 기질로서 사용하였고, Fluostar Optima를 사용하여 발광 신호를 측정하였다.

[0662] Octet

[0663] Octet RED96 플랫폼 (ForteBIo)을 사용하여 동역학 측정을 수행하였다. 비오티닐화된 항원은 0.25 μg/mL CD40 또는 0.5 μg/mL EpCAM의 항원 농도에서 스트렙타비딘 센서 (ForteBio)에 커플링되었다. 항체를 시작 농도가 10 nM CD40 또는 25 nM EpCAM인 1x 동역학 완충액 (ForteBio)에 $^{1}/_{2}$로 연속 희석하고, 항원-커플링된 센서에 대한 결합을 분석하였다. 300 초 동안의 회합이 뒤따른 후, 1x 동역학 완충액에서 300 초 동안의 해리가 뒤따랐다. 센서 팁은 10 mM 글리신, pH 1.7을 사용하여 재생시켰다. 생성된 데이터는 병렬 완충액 블랭크를 빼서 참조하였고, 기준선은 y-축에 정렬되었으며, 해리에 대한 정렬에 의한 단계-간 상관관계를 수행하였고, 데이터 분석 소프트웨어 (v.9.0.0.14)의 사비츠키-골레이 필터를 사용하여 데이터를 평활화하였다. 피팅 정확도의 측정으로서 X2를 이용한 1:1 Langmuir 결합 모델을 사용하여 가공된 데이터를 피팅하였다.

[0664] 열안정성

[0665] 용융 온도 (Tm1) 및 응집 온도 (Tagg)는 UNCle 시스템 (UNchained labs)을 이용하여 측정되었다. 고유 형광은 0.4℃/분의 속도로 20℃로부터 95℃까지 선형 온도 상승 동안 측정되었다. 데이터 분석은 기본 설정을 사용하여 UNcle 분석 소프트웨어 버전 2.0으로 수행되었다.

[0666] 안정성

[0667] 비-최적화된 완충액 (PBS)의 샘플을 2-8℃ 및 40℃에서 1, 2 및 4 주 동안 항온처리하거나, 3 라운드 (24, 48 및 72 시간)의 냉동 해동을 실시하였다. 육안 검사를 수행하고, SE-HPLC, LabChip 및 이중 ELISA를 이용하여 단백질 분해를 측정하였다.

[0668] 전단 응력 안정성

[0669] 3 회 반복실험의 샘플을 96-웰 플레이트 진탕기 MixMate (Eppendorf)에서 30 분 동안 2000 rpm으로 강하게 교반하는 형태로 전단 응력을 가하였다. 3000 g에서 10 분 동안 원심분리하여 단백질 침전물을 제거하고, BigLunatic을 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0670] 콜로이드성 안정성

[0671] 샘플을 4%-36%로부터의 범위의 상이한 PEG 농도를 갖는 PBS/PEG 용액과 혼합하고, 2 회 반복실험으로 96-웰 필터 플레이트에 첨가하고, 실온에서 밤새 항온처리하였다. 12000 g에서 15 분 동안 원심분리하여 수득된 여과액을 수집하고, 스핀다운한 후, BigLunatic (단백질의 손실을 결정함)을 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하고, 대조군과 비교하였다.

[0672] **결과 및 결론**

[0673] 신규한 탈면역화된 RUBY 변이체 내로 조합될 돌연변이의 선택

[0674] 단일 부위 돌연변이체의 생산 및 ELISA 평가로부터 수득된 매우 유망한 결과에 기반하여, 이들 부위를 둘러싼 3D 구조를 검토한 후 각각의 위험 부위에 대한 유망한 돌연변이의 세트를 선택하였다. 생물리학적 특성, 예컨대, 소수성, 전하 및 크기와 주변 아미노산 측쇄와의 유익한/해로운 상호작용의 가능성을 고려하였으며, 선택된 돌연변이체의 세트가 표 5에 나열되어 있다.

[0675] 표 5. 단백질 생산 및 평가를 위해 선택된 서열 ID 및 돌연변이.

[0676]

		ID No.	돌연변이
세트 A	Cκ카파 경쇄 상의 S114A*에 의해 유발되는 예측된 MHCII 결합을 감소시키는 돌연변이	4109	I126A**
		4110	I126G**
		4115	I126S**
		4117	T109P*
		4120	A111V*
세트 B	CH1 상의 T187E*에 의해 유발되는 예측된 MHCII 결합을 감소시키는 돌연변이	4126	Y180I*
		4131	Y180W*
		4133	S183T*
		4134	V188G*

[0677] *EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름

[0678] **IMGT 넘버링 체계에 따름

[0679] 제조가능성

[0680] BsAb 이중 돌연변이체를 일시적인 배양물로부터 생산하였다. Expi293의 30 mL 배양물로부터 발현을 수행하였다. MabSelectSure 정제 후 BigLunatic에 의해 결정된 A280 측정을 사용하여 발현 수율을 계산하였다. 단백질 크기, 응집 및 단편화를 확인하기 위해 SEC-HPLC 분석을 수행하였다. 또한, 응집 및 단편화를 추가로 평가하기 위해 LabCHIP (환원된 및 비-환원된 조건)을 수행하였다. 20 개의 변이체 중 16 개는 100 mg/L 초과의 수율 (표 6) 및 98% 초과의 순도를 가졌다. 전반적으로, 야생형 bsAb와 비슷한 양호한 수율 및 순도를 수득하였다.

[0681] 표 6. 이중 bsAb 돌연변이체에 대한 발현 수율 및 SEC-HPLC 데이터.

[0682]

BsAb 변이체	수율 (mg/L)	HMWS* (%)	주요 피크 면적 (%)	LMWS** (%)
AM_4109-4126	68	2	98	0.1
AM_4109-4131	121	2	98	0.2
AM_4109-4133	148	1	99	0.1
AM_4109-4134	123	2	98	0.2
AM_4110-4126	118	2	98	0.2
AM_4110-4131	136	2	97	0.2
AM_4110-4133	125	2	98	0.1
AM_4110-4134	93	3	97	0.2
AM_4115-4126	73	5	95	0.2
AM_4115-4131	79	5	95	0.2
AM_4115-4133	128	2	98	0.1
AM_4115-4134	110	3	97	0.1
AM_4117-4126	160	2	98	0.1
AM_4117-4131	152	2	98	0.1
AM_4117-4133	155	1	99	0.1
AM_4117-4134	155	2	98	0.1
AM_4120-4126	147	1	99	0.1
AM_4120-4131	141	1	99	0.1
AM_4120-4133	153	1	99	0.1
AM_4120-4134	120	2	98	0.1
wt bsAb (AC_05293)	159	1	99	0.1

[0683] *고분자량 종

[0684] **저분자량 종

[0685] 이중 ELISA

[0686] 상이한 이중 돌연변이 변이체의 표적에 대한 결합을 평가하기 위해 단일 및 이중 ELISA를 수행하였다. 단일 ELISA 데이터는 모든 변이체의 이들의 단일 표적 (CD40 또는 EpCAM)에 대한 양호한 결합을 보여주었다 (데이터는 도시되지 않음). 감소된 결합을 나타내는 변이체 AM_4115-4126 및 AM_4115-4131 (도 2)을 제외하고 이중 ELISA에서도 유사한 경향이 관찰되었다.

[0687] Octet

[0688] Octet (Pall ForteBio)을 사용하여 모든 변이체의 결합 친화도를 결정하였다. 비오티닐화된 항원 (CD40 또는 EpCAM)을 스트렙타비딘 바이오센서에 고정시키고, 용액 중 변이체 및 야생형 bsAb에 대한 결합을 측정하였다. CD40에 대한 모든 변이체 및 야생형 bsAb 결합에 대해 유사한 KD가 관찰되었다. 약간 더 높은 KD를 나타내는 I126S 돌연변이 (ID 번호 4115)를 운반하는 모든 돌연변이체를 제외하고, EpCAM에 결합할 때 유사한 경향이 표시되었다 (표 7). I126S 돌연변이체에 대한 EpCAM 친화도의 감소는 ELISA에서 수득된 결과를 따른다 (도 2).

[0689] 표 7. Octet에 의한 결합 친화도 측정.

[0690]

	CD40			EpCAM		
BsAb 변이체	KD (M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
AM_4109-4126	1.2E-09	4.8E+05	6.0E-04	4.3E-09	1.8E+05	7.7E-04
AM_4109-4131	8.9E-10	8.0E+05	7.2E-04	4.4E-09	1.8E+05	8.1E-04
AM_4109-4133	7.3E-10	1.4E+06	1.0E-03	4.6E-09	2.0E+05	9.2E-04
AM_4109-4134	8.3E-10	1.1E+06	9.2E-04	4.7E-09	2.1E+05	9.8E-04
AM_4110-4126	1.5E-09	3.5E+05	5.1E-04	5.1E-09	1.7E+05	9.0E-04
AM_4110-4131	1.2E-09	4.5E+05	5.6E-04	4.7E-09	2.0E+05	9.5E-04
AM_4110-4133	1.1E-09	6.8E+05	7.5E-04	4.9E-09	1.9E+05	9.6E-04
AM_4110-4134	8.8E-10	8.6E+05	7.5E-04	5.3E-09	2.0E+05	1.1E-03
AM_4115-4126	1.1E-09	7.4E+05	8.5E-04	6.9E-09	1.7E+05	1.1E-03
AM_4115-4131	9.7E-10	9.2E+05	8.9E-04	7.2E-09	1.8E+05	1.3E-03
AM_4115-4133	1.0E-09	1.1E+06	1.1E-03	7.0E-09	1.8E+05	1.3E-03
AM_4115-4134	1.1E-09	9.3E+05	1.0E-03	6.9E-09	1.9E+05	1.3E-03
AM_4117-4126	1.2E-09	4.0E+05	4.8E-04	4.6E-09	2.2E+05	1.0E-03
AM_4117-4131	1.0E-09	6.3E+05	6.6E-04	4.5E-09	2.6E+05	1.2E-03
AM_4117-4133	9.3E-10	7.5E+05	7.0E-04	4.6E-09	2.6E+05	1.2E-03
AM_4117-4134	9.7E-10	7.4E+05	7.2E-04	5.2E-09	2.3E+05	1.2E-03
AM_4120-4126	8.6E-10	1.2E+06	1.0E-03	5.6E-09	2.3E+05	1.3E-03
AM_4120-4131	1.1E-09	9.2E+05	9.7E-04	5.3E-09	2.8E+05	1.5E-03
AM_4120-4133	9.0E-10	1.2E+06	1.1E-03	5.7E-09	2.4E+05	1.4E-03
AM_4120-4134	9.1E-10	1.2E+06	1.1E-03	5.8E-09	2.5E+05	1.4E-03
wt bsAb (AC_05293)	9.3E-10	1.1E+06	1.0E-03	4.8E-09	2.3E+05	1.2E-03

[0691] 안정성

[0692] 변이체의 안정성을 평가하기 위해, 용융 온도 (Tm), 전단 응력, 콜로이드성 안정성 및 상이한 온도에서의 저장 안정성을 평가하였다.

[0693] 열안정성

[0694] 변이체의 용융 온도 (Tm1) 및 응집 온도 (Tagg)를 결정하기 위해 UNcle 기기 (UNchained Biolabs)를 사용하여 분석을 수행하였다. 돌연변이 I126A (4109), I126G (4110) 및 I126S (4115)를 운반하는 변이체는 wt bsAb와 비교하여 Tm1이 약간 낮았지만 (<65℃), T109P (4117) 및 A111V (4120) 변이체는 Tm1 >65℃를 가졌다 (도 3). 반면에, 응집 온도, 즉, 약 75℃, ± 1-2℃는 모든 bsAb 이중 돌연변이체에 대해 매우 유사하였고, WT bsAb와 비슷하였다.

[0695] 상승된 온도 및 냉동/해동 안정성

[0696] 상승된 온도에서의 안정성은 단백질을 40℃에서 최대 4 주 동안 항온처리함으로써 수행되었다. LabCHIP 및 이중 ELISA 분석은 4 주 항온처리 후 모든 샘플에 대해 수행되었으며, SEC-HPLC 분석은 1 주차, 2 주차 및 4 주차에 샘플에 대해 수행되었다. 냉동-해동 안정성은 단백질을 -80℃에서 항온처리하고, 24, 48 및 72 시간 후에 37℃로 설정된 물 배쓰에서 이들을 해동함으로써 평가하였다. SEC-HPLC 분석은 24 시간 및 72 시간 후에 해동된 샘플에 대해서만 수행되었다. 또한, 모든 샘플을 3 회 시점 각각에서 임의의 입자에 대해 육안으로 검사하였다. 4 주 항온처리 후에도 40℃에서 저장한 후 모든 변이체에 대해 최소 응집 (HMW의 <3% 변화)이 관찰되었으며, 이는 모든 이중 돌연변이체에 대해 매우 높은 온도 안정성을 나타낸다 (도 4). WT bsAb와 비교하여 I126A (4109) 및 I126G (4110)에 대해 3 라운드의 냉동/해동 후 약간의 응집이 관찰되었다. 놀랍게도, I126S (4115), T109P (4117) 및 A111V (4120)를 운반하는 모든 돌연변이체는 WT bsAb와 비교하여 개선된 냉동-해동을 나타냈는데 (도 5), 이는 돌연변이가 예측된 MHCII 결합을 잠재적으로 감소시킬 뿐만 아니라 안정성도 개선시켰음을 나타낸다.

[0697] 전단 응력

[0698] 전단 응력으로 인한 분해를 견딜 수 있는 모든 변이체의 능력의 평가는 Alligator에서 자체 개발한 전단 응력

검정을 사용하여 수행되었다. 검정은 주어진 진탕 속도 및 시간에서의 교반을 기반으로 한다. 교반 전후의 A280의 변화를 계산함으로써 단백질 손실량을 결정한다. 모든 변이체는 교반 전후의 단백질 농도 간의 차이가 작기 때문에 고도의 전단 응력 안정성이 있는 것으로 나타났다 (도 6). 전반적으로, 교반으로 인한 10% 미만의 단백질 손실이 모든 작제물에 대해 등록되었다.

[0699] 콜로이드성 안정성

[0700] PEG 침전 검정을 사용하여 콜로이드성 안정성에 대해 변이체를 추가로 평가하였다. 단백질 용액에 대한 상이한 농도의 PEG의 첨가는 배제 부피 효과의 결과로서 침전을 야기한다. 장쇄 중합체인 PEG는 유사한 분자 질량의 단백질보다 용액에서 더 많은 공간을 차지하고, 이는 단백질 용해도를 낮춰, 단백질 침전이 발생한다. 검정은 샘플 중 단백질 양의 50%를 침전시키는 데 필요한 PEG의 농도로서 측정된 콜로이드성 안정성의 상대적 측정치를 제공한다. PEG 농도가 높을수록 더 높은 콜로이드성 안정성이 필요하였다. 값은 높은 콜로이드성 안정성을 갖는 것으로 간주되고 50% 단백질 침전을 수득하기 위해 8-9% PEG가 필요한 것으로 알려진 대조군과 비교된다. 모든 이중 돌연변이 변이체는 WT bsAb와 비슷한 콜로이드성 안정성을 나타냈으며, 대조군보다 우수한 성능을 보였다 (도 7).

[0701] 대체로, 테스트된 이중 변이체 중 몇몇은 일시적인 배양물에서 일반적으로 양호한 결합, 안정성 및 제조가능성을 나타냈다. 불변 경쇄의 돌연변이 I126S, T109P, A111V, 및 불변 중쇄 도메인 CH1의 돌연변이 S183T 및 V188G는 안정성의 측면에서 특히 유익하였으며, 불변 경쇄의 돌연변이 T109P, A111V, 및 불변 중쇄 도메인 CH1의 돌연변이 S183T 및 V188G의 조합은 전반적으로 양호한 표적 결합, 높은 열안정성, 콜로이드성 안정성 및 일반적으로 높은 응력 (응력, 예컨대, 상승된 온도, 냉동/해동 및 전단 응력 포함) 안정성을 초래하였다.

[0702] ***실시예 3 - MHC 회합된 펩티드 단백질체학 (MAPP) 검정을 사용한 MHC 클래스 II 결합 펩티드의 식별***

[0703] **목표**

[0704] 현재 연구의 목표는 자연적으로 가공되고 항원 제시 세포에 의해 MHC 클래스 II 상에 제시되는, 쇄 H2의 CH1에서의 최적화 돌연변이 S183T, 및 쇄 H1의 C카파에서의 T109P가 있거나 없는 RUBY™ 이중특이적 항체 (bsAb)로부터 유래된 비-자기 펩티드를 식별하는 것이었다. MHC 클래스 II 상에 표시되는 이러한 비-자기 펩티드는 면역원성 반응 및 원하지 않은 항-약물 항체의 유도를 촉발할 잠재력을 가지고 있다. 따라서, 이중특이적 항체와 같은 단백질 약물에서 이러한 펩티드의 수를 감소시키는 것은 유익하며, 임상 환경에서 우수한 안전성 프로파일로 전환될 수 있다.

[0705] **재료 & 방법**

[0706] 검정에 포함된 2 개의 RUBY™ bsAb 및 포함된 최적화 돌연변이의 세트가 표 8에 기재되어 있다. 표 8에 나열된 돌연변이 외에도, RUBY™ bsAb 둘 모두는 쇄 H1의 가변 중쇄 (VH) 도메인 및 가변 경쇄 (VL) 도메인에서의 돌연변이 Q44R, 쇄 L1의 VL 도메인에서의 Q44E, 및 쇄 H2의 VH에서의 Q44E를 운반한다. 그러나, 가변 도메인의 돌연변이를 포함하는 임의의 펩티드는 해당 특이적인 가변 도메인의 특이적인 아미노산 서열에 의해 영향을 받을 가능성이 있고 RUBY™ bsAb 포맷의 고유한 특징부가 아니기 때문에 bsAb의 불변 도메인에 혼입된 RUBY™ 특이적 돌연변이만이 이 평가에서 고려된다.

[0707] *표 8. MAPP 검정에서 평가된 RUBY™ bsAb의 불변 도메인의 돌연변이의 요약*

RUBY™ ID	불변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이	추가적인 최적화 돌연변이
AC_05293	쇄 H1의 CH1에서의 H168A + F170G 쇄 H2의 CH1에서의 T187E 쇄 H1의 C카파에서의 S114A + N137K 쇄 L1의 C카파에서의 L135Y + S176W	-
멀티 46		쇄 H2의 CH1에서의 S183T 쇄 H1의 C카파에서의 T109P

[0708]

[0709] 간략하게, 단핵구-유래된 수지상 세포 (MoDC)는 10 명의 건강한 공여자 (표 8에서 이용가능한 HLA 유형지정 (typing)))의 코호트로부터 유래되었으며, 테스트 샘플과 함께 항온처리되었다. 이어서, MoDC를 용해시키고, HLA-DR/펩티드 복합체를 면역포획하고, 펩티드를 용리하고, 질량 분석법 (MS)에 의해 시퀀싱하였다. MS 데이터 분석에서는 개별 공여자에게 고유하고 다중 공여자 전체에 걸쳐 공통된 펩티드를 식별하였다. 식별된 펩티드를 추가로 분석하여, 최종 데이터 세트로부터의 자기-펩티드 서열을 필터링하였다. 자기-펩티드 서열은 흉선 선택

또는 말초 T 세포 내성으로 인해 항-약물 항체 (ADA) 반응을 유도할 수 있는 T 세포 에피토프를 함유할 가능성이 없는 것으로 간주된다.

[0710] *표 9. MAPP 검정에 포함된 공여자에서 식별된 HLA 일배체형.*

공여자 번호	일배체형									
	DRB1	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQA1	DQB1	DQB1
1	04:05	07:01			01:03		02:01	03:03	02:02	03:02
2	01:01	04:01			01:03		01:01	03:03	03:01	05:01
3	07:01	15:02			01:03	01:02	01:03	02:01	02:02	06:01
4	03:01	13:02	01:01	03:01			01:02			
5	04:01	11:01	02:02		01:03		03:03	05:05	03:01	
6	11:01		02:02				05:05		03:01	
7	04:07	08:01			01:03		03:03	04:01	03:01	04:02
8	03:01	04:01	01:01		01:03		03:01	05:01	02:01	03:02
9	09:01	13:01	02:02		01:03		01:03	03:02	03:03	06:03
10	03:01	11:04	02:02				05:01	05:05	02:01	03:01

[0711]

[0712] 또한, 식별된 모든 비-자기 펩티드에 대한 인실리코 분석은 iTope-AI 알고리즘 (Abzena Ltd)을 사용하여 수행되었으며, 46 개의 가장 일반적인 MHC 클래스 II 대립유전자에 결합하는 것으로 예측되었다. 각각의 동종이형에 대한 예측된 결합의 합계를 나타내는 "위치 위험 점수"가 계산된다.

[0713] **결과 및 결론**

[0714] AC_05293 및 멀티46에 대한 MAPP 검정 및 인실리코 예측으로부터의 결과는 표 10 및 표 11에 요약되어 있다. 일반적으로, RUBY™ 특이적 돌연변이에 의해 생성된 식별된 펩티드의 수는 적었으며, 이러한 펩티드를 제시하는 공여자의 빈도는 30% 이하였다. AC_05293에 대해, H1 쇄의 CH1에서의 돌연변이 H168A 또는 H170G, 또는 L1 쇄의 C카파에서의 돌연변이 L135Y를 포함하는 펩티드는 공여자 중 어느 누구에서도 식별되지 않았다. 쇄 H1의 C카파에서의 돌연변이 S114A 및 N137L, 쇄 H2의 CH1에서의 T187E뿐만 아니라 쇄 L1의 C카파에서의 S176W를 함유하는 다양한 수의 펩티드가 1 내지 3 명의 공여자에서 식별되었으며, 이들 펩티드의 총 위치 위험 점수는 4 내지 81의 범위였다 (합산한 bsAb 위치 위험 점수 = 122). 멀티46의 분석에서는 새로운 펩티드 클러스터가 식별되지 않았지만, 쇄 H1의 C카파에서의 최적화 돌연변이 T109P 및 쇄 H2의 CH1에서의 S183T가 도입되면서, 식별된 펩티드의 수 및 총 위치 위험 점수 둘 모두가 감소하였다. 최적화 돌연변이 T109P의 도입 후, H1의 C카파에서 RUBY™ 특이적 돌연변이 S114A를 커버하는 펩티드는 10 명의 공여자 중 어느 누구에서도 식별되지 않았는데, 이는 AC_05293의 분석에서 2 명의 공여자에서 식별된 이 돌연변이를 커버하는 2 개의 펩티드와 비교된다. 최적화 돌연변이 S183T의 도입이 쇄 H2의 CH1에서의 돌연변이 T187E를 커버하는 제시된 펩티드의 수를 감소시키지는 않았지만, 이러한 펩티드를 제시하는 공여자의 빈도는 3으로부터 2까지 감소하였고, 이들 펩티드에 대한 총 위치 위험 점수는 12로부터 8까지 감소하였다. 전체적으로, 합산된 bsAb 위치 위험 점수는 H1 쇄의 C카파 및 H2 쇄의 CH1에 2 개의 최적화 돌연변이를 도입함으로써 122으로부터 37까지 극적으로 감소하였다.

[0715] *표 10. AC_05293의 MAPP 및 인실리코 분석으로부터의 결과의 요약*

쇄	돌연변이	펩티드 서열	공여자(들) 제시 펩티드	빈도 (%)	총 위치 위험 점수
H1	H168A (CH1)	-	-	-	
	F170G (CH1)	-	-	-	
	S114A (C 카파)	TKLEIKRTVAAPAVFI (서열번호 207)	2, 4	20	81
		TKLEIKRTVAAPAVFIFPP (서열번호 208)	4		
	N137L (C 카파)	SGTASVVCLLKNFYPREA (서열번호 209)	10	10	4
		GTASVVCLLKNFYPR (서열번호 210)	10		
		TASVVCLLKNFYPR (서열번호 211)	10		
H2	T187E (CH1)	SSGLYSLSSVVEVPS (서열번호 212)	2, 4, 9	30	12
		SSGLYSLSSVVEVPSS (서열번호 213)	2, 4, 9		
		SGLYSLSSVVEVPS (서열번호 214)	2, 4, 9		
		SGLYSLSSVVEVPSS (서열번호 215)	2, 4		
L1	L135Y (C 카파)	-	-	-	
	S176W (C 카파)	EQDSKDSTYSLWSTLTLSK (서열번호 216)	2	20	25
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 217)	2		
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 218)	2		
		QDSKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 219)	2		
		DSKDSTYSLWSTLTLSK	2		

[0716]

[0717]

		(서열번호 220)			
		DSKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 221)	2, 3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 222)	3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKADY (서열번호 223)	3		
		SKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 224)	2		
		SKDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 225)	3		
		KDSTYSLWSTLTL (서열번호 226)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSK (서열번호 227)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 228)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 229)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSKADY (서열번호 230)	3		
		DSTYSLWSTLTLSK (서열번호 231)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 232)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 233)	3		

[0718] *표 11. 멀티46의 MAPP 및 인실리코 분석으로부터의 결과의 요약*

쇄	돌연변이 (볼드체의 최적화 돌연변이)	펩티드 서열	공여자(들) 제시 펩티드	빈도 (%)	총 위치 위험 점수
H1	H168A (CH1)	-	-	-	
	F170G (CH1)	-	-	-	
	T109P + S114A (C 카파)	-	-	-	
	N137L (C 카파)	SGTASVVCLLKNFYPR (서열번호 234)	10	20	4
		SGTASVVCLLKNFYPRE (서열번호 235)	10		
		SGTASVVCLLKNFYPREA (서열번호 236)	10		
		SGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKV (서열번호 237)	3		
		GTASVVCLLKNFYPR (서열번호 238)	10		
		TASVVCLLKNFYPR (서열번호 239)	10		
H2	**S183T** + T187E (CH1)	SSGLYSLSSVVEVPS (서열번호 240)	2, 4	20	8
		SSGLYSLSSVVEVPSS (서열번호 241)	2, 4		
		SSGLYSLSSVVEVPSSS (서열번호 242)	4		
		SGLYSLSSVVEVPS (서열번호 243)	2, 4		
L1	L135Y (C 카파)	-	-	-	
	S176W (C 카파)	EQDSKDSTYSLWSTLTLSK (서열번호 244)	2	20	25
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 245)	2		
		EQDSKDSTYSLWSTLTLSKAD	2		

[0719]

		(서열번호 246)			
		DSKDSTYSLWSTLTLSK (서열번호 247)	2		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 248)	2, 3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKAS (서열번호 249)	3		
		DSKDSTYSLWSTLTLSKADY (서열번호 250)	3		
		SKDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 251)	2		
		SKDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 252)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSK (서열번호 253)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 254)	2, 3		
		KDSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 255)	3		
		KDSTYSLWSTLTLSKADY (서열번호 256)	3		
		DSTYSLWSTLTLSK (서열번호 257)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKA (서열번호 258)	2, 3		
		DSTYSLWSTLTLSKAD (서열번호 259)	3		
		TYSLWSTLTLSKA (서열번호 260)	3		

[0720]

[0721] 대체로, H1 쇄의 C카파에서의 최적화 돌연변이 T109P 및 H2 쇄의 CH1에서의 S183T가 있거나 없는 2 개의 RUBY™ bsAb에 대해 수행된 MAPP 및 인실리코 예측은 이들 돌연변이의 도입이 표시된 펩티드의 총 수, 이들 펩티드를 표시하는 공여자의 빈도뿐만 아니라 표시된 펩티드의 예측된 위험 점수를 감소시켰음을 명확하게 보여준다. 따라서, RUBY™ bsAb에 대한 이러한 최적화 돌연변이의 첨가는 면역원성 반응의 유도의 위험을 감소시킬 수 있는 잠재력을 보유한다.

[0722] ***실시예 4 - RUBY™ 이중특이적 항체 정제 공정에서 공동-정제된 Fab 단편의 수준을 감소시키는 돌연변이 전략***

[0723] **배경 & 목표**

[0724] RUBY™ 이중특이적 항체 (bsAb) 포맷의 복잡한 설계는 임의의 정확한 크기의 부산물(biproduct)의 형성을 가능하게 하지 않지만, 쇄 2 (L1) 및 쇄 3 (H2)의 잘못된-쌍형성에 의한 Fab 단편의 형성이 발생할 수 있다. 이러한 가용성 Fab 단편이 IGHV3 생식계열 유전자 계열에서 기원된 중쇄 가변 (VH) 도메인을 운반하는 경우, 이들은 자연적으로 VH에 위치하는 단백질 A 결합 부위를 가지며, 이 부위는 이러한 Fab 단편의 원치 않은 공동-정제를 가능하게 한다. 이 단백질 A 결합 부위는 VH의 프레임워크 영역 1, 3 및 CDRH2의 보존된 부분으로 정확히 지정되었다 (Bach, Lewis et al. 2015). RUBY™의 제조가능성을 추가로 개선시키기 위해, 원치 않은 Fab 부산물이 단백질 A에 결합하는 능력이 없으므로 분자를 조작하여, 정확한 크기의 RUBY™ 생성물과 공동-정제되는 이의 역량을 억제하는 것이 바람직할 것이다.

[0725] 이 연구의 목표는 IGHV3 기원의 VH를 운반하는 H2 쇄에서 발견되는 단백질 A 결합 부위를 파괴할 잠재력이 있는 돌연변이의 세트 (n=3)(표 12 참고)를 평가하는 것이었다. H2 쇄에 이러한 IGHV3 기원하는 VH를 갖는 3 개의 상이한 RUBY™ bsAb에 돌연변이의 세트를 도입하고, 제조가능성 및 항원 결합의 측면에서 평가하였다.

[0726] **재료 & 방법**

[0727] RUBY™ bsAb의 생산 및 정제

[0728] 표 12에 나열된 RUBY™ bsAb의 세트는 3 개의 모체 bsAb AC_05332, AC_05330 및 AC_05302와 함께 발현되었다. 이 연구에 포함된 모든 RUBY™ bsAb는 표 13에 나열된 포맷별 돌연변이의 세트를 또한 운반한다. 총 12 개의

bsAb 세트는 제조업체의 프로토콜에 따라 30 또는 60 mL 배양물에서 일시적 Expi293 HEK (Life Technologies) 세포를 사용하여 발현되었다. 생산된 RUBY bsAb의 정제는 제조업체의 프로토콜에 따라 MabSelect SuRe, 1 mL, 컬럼 (GE Healthcare)을 사용하여 NGC10 (BioRad) 시스템에서 수행되었다.

[0729] *표 12. 생산된 및 평가된 모체 및 돌연변이된 RUBY™ bsAb의 목록.*

모체 RUBY™	H2 쇄 돌연변이*	새로운 RUBY ID	특이성
AC_05332	T65E	AC_05370	5T4xCD40
AC_05332	T65A	AC_05371	5T4xCD40
AC_05332	T65I	AC_05372	5T4xCD40
AC_05330	T65E	AC_05373	CD40x5T4
AC_05330	T65A	AC_05374	CD40x5T4
AC_05330	T65I	AC_05375	CD40x5T4
AC_05302	T65E	AC_05376	CD40x5T4
AC_05302	T65A	AC_05377	CD40x5T4
AC_05302	T65I	AC_05378	CD40x5T4

[0730]

[0731] *IGMT 넘버링에 따름

[0732] *표 13. 평가된 bsAb의 세트에 포함된 RUBY™ 특이적 돌연변이*

가변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이*	불변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이**
쇄 H1의 VH 및 VL에서의 Q44R	쇄 H1의 CH1에서의 H168A + F170G
쇄 L1의 VL에서의 Q44E	쇄 H2의 CH1에서의 T187E
쇄 H2의 VH에서의 Q44E	쇄 H1의 C카파에서의 S114A + N137K
	쇄 L1의 C카파에서의 L135Y + S176W

[0733]

[0734] *IMGT 넘버링 체계에 따름

[0735] **EU 또는 Kabat 넘버링 체계에 따름

[0736] 제조가능성의 평가

[0737] 단백질 A 정제 후 Lunatic (UNchained Labs)에 의해 결정된 A280 측정치를 사용하여 발현 수율을 계산하였다. 가용성 Fab 단편과 같은 저분자량 (MW) 오염물질의 응집 및 존재는 TSK 겔 Super SW mAB HTP 4 μm, 4,6x150 mm 컬럼 (TOSOH Bioscience) 및 100 mM 인산나트륨, pH 6.8, 주변 온도 및 0.35 ml/분[6]의 유속에서 이동상으로서 300 mM NaCl을 사용하여 1260 Infinity II 시스템 (Agilent Technologies)에서 SE-HPLC로 측정되었다. 제조업체의 지침에 따라 LabChip GXII Touch 모세관 전기영동 시스템을 사용하여 단백질 품질을 평가하였다.

[0738] 이중 표적 ELISA 및 유세포 분석법을 사용한 항원 결합의 평가

[0739] 이중 표적 ELISA에 의해 항원 결합을 평가하였다. 간략하게, 관련 항원을 ELISA 플레이트에서 PBS 중 0.5 μg/ml으로 4℃에서 밤새 코팅하였다. PBS/0.05% Tween 20 (PBST)으로 세척한 후, 플레이트를 PBST/2% BSA로 실온에서 적어도 30 분 동안 차단한 후, 다시 세척하였다. 이어서, PBST/0.5% BSA에 연속적으로 희석된 샘플을 첨가하고, 실온에서 적어도 1 시간 동안 결합되도록 두었다. 세척 후, 플레이트를 실온에서 적어도 1 시간 동안 0.5 μg/mL 비오티닐화된 제2 항원과 함께 항온처리하였다. HRP-라벨링된 스트렙타비딘을 이용하여 이중 복합체화된 bsAb를 검출하였다. SuperSignal Pico Luminescent를 기질로서 사용하였고, Fluostar Optima를 사용하여 발광 신호를 측정하였다. 모체와 돌연변이된 RUBY 쌍 간에 결합을 비교하였다.

[0740] 세포 상에 발현된 각각의 표적에 대한 결합을 유세포 분석법을 사용하여 평가하였다. 간략하게, 5T4를 발현하도록 변형된 CHO 세포, CD40을 발현하도록 변형된 B16 세포뿐만 아니라 야생형 CHO 및 B16 세포주를 적정 농도의 RUBY™ bsAb와 함께 항온처리하였다. 형광색소-컨쥬게이션된 항-인간 IgG를 사용하여 항체의 결합을 검출하고,

유세포 분석법을 사용하여 분석하였다.

[0741] **결과 & 결론**

[0742] 12 개의 RUBY™ bsAb를 14 내지 181 mg/L 범위의 수율로 다양한 수준에서 생산하였다 (표 14). 둘 모두 모체 변이체보다 유의하게 더 적게 생산되는 AC_05375 (T65I) 및 AC_05376 (T65E)을 제외하고, 모체 bsAb 및 돌연변이된 bsAb 간에는 사소한 차이만 관찰될 수 있었다. 모든 돌연변이된 RUBY™ bsAb는 단백질 A 정제 후 모체 bsAb와 비교하여 Fab 단편과 같은 저분자량 종의 유의하게 더 적은 양을 함유하였다. 모체 bsAb와 돌연변이된 bsAb 간에는 응집 수준 (HMW 종)의 작은 차이만 관찰될 수 있었다.

[0743] *표 14. 12 개의 RUBY™ bsAb의 제조가능성 데이터 요약.*

BsAb ID	수율 (mg/L)	단량체 분획 (%)	LMWS* (%)	HMWS* (%)
AC_05332	173	81.8	13.1	5.1
AC_05370	181	92.8	0.5	6.7
AC_05371	144	92.4	0.7	7
AC_05372	124	89.2	2.4	8.4
AC_05330	68	85	14.5	0.5
AC_05373	77	99.1	0	0.9
AC_05374	69	98.9	0	1.1
AC_05375	14	95.9	0	4.1
AC_05302	169	71.1	26.5	2.4
AC_05376	23	94.6	0.2	5.2
AC_05377	106	95	1.4	3.6
AC_05378	109	95.8	0.3	3.9

[0744]

[0745] *LMWS = 저분자량 종; HMWS = 고분자량 종

[0746] 다음으로, LabChip 분석을 사용하여 단백질 품질 및 공동-정제된 Fab 단편의 수준을 평가하였다. 표 15에서 볼 수 있는 바와 같이, T65E, T65A 또는 T65I 돌연변이 중 임의의 것의 도입은 단백질 정제 후 공동-정제된 Fab 단편의 수준을 극적으로 감소시켰다. 돌연변이를 파괴하는 단백질 A 부위의 도입에 의해 유도된 온전한 RUBY™ bsAb (주 피크 수준, Fab 단편의 변화에 대해 보정됨)의 수준의 변화는 생산된 bsAb의 품질에 극적인 영향을 미친 AC_05332에 대한 돌연변이 T65A 및 T65I를 제외하고는 일반적으로 적었다.

[0747] *표 15. 온전한 RUBY™ bsAb의 수준을 요약하고 가용성 Fab 단편을 공동-정제한 LabChip 데이터.*

단백질 ID	주요 피크 (~250kDa, %)	Fab 단편 (~50kDa, %)
AC_05332	80.1	11.6
AC_05370	92.1	0
AC_05371	62.6	0.2
AC_05372	11.8	0.2
AC_05330	86.1	14.0
AC_05373	92.5	0
AC_05374	88.3	0
AC_05375	98.9	1.2
AC_05302	71.4	27.1
AC_05376	95.0	0
AC_05377	98.6	1.4
AC_05378	97.8	0.6

[0748]

[0749] 이중 표적 ELISA 분석으로부터의 결과는 도 8에 요약되어 있다. AC_05332의 두 표적 항원 모두 (5T4 및 CD40)에 대한 동시 결합은 평가된 3 개의 돌연변이 모두의 도입에 의해 감소하였지만, T65I (AC_05372)보다 T65E (AC_05370) 및 T65A (AC_05371)에 의한 정도는 훨씬 적다. 모체 AC_05332와 이의 돌연변이된 변이체 간에 나타나는 이러한 차이는 또한 부분적으로 특히 T65A 및 T65E 돌연변이체에서 나타나는 감소된 단백질 품질에 기인할 수 있다 (표 15 참고). AC_05330의 항원 결합 역량은 돌연변이 T65E (AC_05373)의 도입에 의해 영향을 받지 않는 것처럼 보였지만, AC_05374 및 AC_05374에 도입된 돌연변이는 두 표적 항원 모두에 동시에 결합하는 이들 bsAb의 능력을 폐지하였다. AC_05302는 돌연변이 T65A (AC_05377) 및 T65I (AC_05378)의 도입 후에는 항원 결합을 유지하였지만, T65E (AC_05376) 돌연변이 도입 후에는 그렇지 않았다.

[0750] 돌연변이를 파괴하는 단백질 A 부위의 도입에 의한 표적 결합에 대한 영향을 추가로 평가하기 위해, 2 개의 표적을 발현하는 세포에 대한 결합을 유세포 분석법을 사용하여 평가하였다 (AC_05371 및 AC_05372는 차선의 단백질 품질로 인해 제외됨). 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 5T4 발현 CHO 세포에 대한 결합은 예상할 수 있는 바와 같이, AC_05332의 CD40 결합 도메인에서의 돌연변이의 도입에 의해 영향을 받지 않는다. AC_05330, AC_05302 및 이의 돌연변이 버전의 세포 상의 5T4에 대한 결합은 이 검정에서 AC_05302의 모든 변이체가 5T4 결합을 유지한다는 점을 제외하고, 위에 기재된 이중 ELISA 결과와 상관관계가 있다. 반면에, 또한 이 검정에서 AC_05330 돌연변이체는 T65E 돌연변이와만 항원 결합을 유지하는 것으로 보인다. 5T4를 발현하지 않는 CHOwt 세포에 대한 결합은 연구된 돌연변이 중 임의의 것의 도입에 영향을 받지 않는다.

[0751] 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, AC_05332 및 이의 T65E 변이체에 대한 CD40 발현 B16 세포의 결합은 T65E 돌연변이에 의해 도입된 표적 결합의 약간의 감소와 함께 ELISA 결과와 잘 상관된다. 예상된 바와 같이, 모든 AC_05330 및 이의 돌연변이체 버전은 B16 세포에 대해 유사한 결합을 표시하는데, 이는 이들 RUBY™ bsAb의 CD40 결합 도메인에 돌연변이가 도입되지 않았기 때문이다. AC_05376 (AC_05302의 T65E 돌연변이체)에 의한 예상치 못한 CD40 결합의 결여 외에도, AC_05302 및 이의 T65I 및 T65A 돌연변이체 버전은 또한 이들 bsAb의 5T4 결합 도메인에서 돌연변이를 파괴하는 단백질 A 부위의 도입에 영향을 받지 않는다. 평가된 RUBY bsAb 중 임의의 것에 대해 CD40을 발현하지 않는 wtB16 세포에 대한 결합이 검출되지 않는다.

[0752] 중요한 것은, 3 개의 돌연변이 모두 (RUBY™ H2 쇄의 VH에서의 T65E, T65A 및 T65I)가 이 연구에서 평가된 3 개의 bsAb 모두에서 공동정제된 Fab 단편의 양을 극적으로 감소시킨다는 결론을 내릴 수 있으며, 이는 이들 돌연변이가 실제로 이들 분자의 VH에서의 단백질 A 결합 부위를 파괴한다는 것을 확인한다. 일반적으로, T65A 및 T65I가 단백질 품질에 유의한 영향을 미치는 AC_05332를 배제하고, 생산성, 응집체의 양 및 단백질 품질에 대한 영향은 제한적이다. 이중 표적 ELISA 및 FACS를 이용한 세포 결합 둘 모두를 사용하여 평가된 바와 같이, 표적 결합에 대한 영향은 AC_05332, AC_05330 및 AC_05302에 도입된 상이한 돌연변이마다 다양하지만, 3 개의 bsAb

모두에 대해 공동-정제된 Fab 단편의 양을 유의하게 감소시키면서 표적 결합에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는 적어도 하나의 돌연변이를 식별할 수 있었다.

[0753] 대체로, 이들 연구는 돌연변이를 파괴하는 평가된 단백질 A 부위가 RUBY bsAb의 정제 단계에서 공동-정제된 Fab 단편의 양을 효율적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다. 평가는 또한 생산성, 단백질 품질 또는 표적 결합에 유의하게 영향을 주지 않으면서 이러한 돌연변이를 도입하는 것이 가능하다는 것을 보여준다.

[0754] **실시예 5**

[0755] 표 16에 도시된 바와 같이, 치료적 효험의 검정에서 최적화된 RUBY™ 돌연변이를 테스트하기 위해 CD40 x CEACAM5 이중특이적 항체를 개발하였다.

[0756] *표 16. 치료적 효험에 대해 검정에서 평가된 RUBY™ ffAC 05337의 돌연변이의 요약*

RUBY™ ID	불변 도메인에서의 RUBY™ 돌연변이	추가적인 최적화 돌연변이
AC_05337	쇄 H1의 CH1에서의 H168A + F170G 쇄 H2의 CH1에서의 T187E 쇄 H1의 C람다에서의 T114A + S137K 쇄 L1의 C카파에서의 L135Y + S176W	-
ffAC_05337		쇄 H2의 CH1에서의 S183T

[0757]

[0758] **재료 및 방법**

[0759] 제조업체의 지침에 따라 형광 염료 PKH26 (Sigma-Aldrich)으로 MB49 CEA 과발현 세포를 라벨링하였다. 라벨링된 MB49-CEA 세포를 45℃에서 10 분 동안 열 충격을 가하여 괴사를 유도한 후, 밤새 37℃에서 항온처리하였다. 이어서, 열-충격을 받은 세포를 원심분리하고, 괴사성 종양 세포주 잔해를 함유하는 상층액을 수집하였다. Raji 세포를 핵 염료 Hoechst 33342 (Thermo Scientific)로 라벨링하고, 괴사성 잔해 및 적정 항체 (ffAC_05337 또는 1132)와 함께 배양하였다. Cytation 5 라이브 셀 이미저 (BioTek)를 사용하여 이미지를 캡처하고, Hoechst-염색된 Raji 세포와 공동-국소화된 PKH26-염색된 종양 잔해의 수를 Gen5 소프트웨어 (BioTek)를 사용하여 정량화하였다.

[0760] **결과**

[0761] CD40xCEA 표적화 ffAC_05337 bsAb가 첨가되었을 때 Raji 세포를 포함하는 CEA-형질주입된 MB49 종양 세포주로부터의 괴사성 잔해의 클러스터의 용량-의존적 증가가 나타났으나, 단일특이적 CD40 Ab 1132에서는 그렇지 않았다 (도 12에서 도시된 바와 같음).

[0762] ***실시예 6 - 원발성 인간 결장직장암 환자로부터 수득된 세포를 사용한 기능적 검정***

[0763] 결장직장암 환자로부터의 해리된 일차 세포를 Discovery Life Sciences (Huntsville, AL)로부터 구입하였다. 해동 직후, NucleoCounter® NC-200™ (Chemometec, Denmark)을 사용하여 DTC를 카운팅하고, 20,000 개의 생존 가능한 세포를 각각의 웰에 피펫팅하였다. 암세포를 사용하여, CD40 생물검정에서 기능성을 평가하거나, 대안적으로 동일한 종양 샘플에서 면역 세포를 활성화하는 원발성 암세포의 능력을 분석하였다. 200,000 개의 생존가능한 세포를 Nunc UpCell 96-웰 플레이트 (Thermo Scientific, 174897) 내로 피펫팅하였다. 다음으로, ATOR-4066 또는 대조군을 웰 내로 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO2 항온처리기에서 48 시간 동안 항온처리하였다. 다음으로, 세포를 수확하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

[0764] *표 17 - 활성화 염색을 위한 FAC 패널 (22 개의 튜브를 염색함)*

CD40	APC	555591	BD Pharmingen
CD86	PE	555658	BD Pharmingen
CD45	V450	560367	BD Horizon
CD14	PerCP-Cy5.5	562692	BD Pharmingen
CD83	PE-Cy7	561132	BD Pharmingen
CD3	FITC	555332	BD Pharmingen
CD56	FITC	562794	BD Pharmingen

[0765]

[0766] **결과**

[0767] 첫째로, 환자 유래된 종양에서의 CEA 밀도가 리포터 세포 검정을 사용하여 가교를 제공하고 CD40 자극을 유도하기에 충분하다는 것이 입증되었다. 결과는 환자 유래된 암세포가 세포주와 유사한 가교 및 CD40 활성화를 유도할 수 있다는 것을 입증하였다 (도 13). 둘째로, 환자 유래된 결장 종양으로부터의 해리된 세포를 배양할 때, CD40xCEA bsAb (ffAC_05337)가 종양 침윤 면역 세포를 활성화할 수 있다는 것이 입증되었다 (도 13).

[0768] ***실시예 7***

[0769] **재료 및 방법**

[0770] 인간 샘플

[0771] 룬드 대학 병원에서의 편도암 샘플의 수집은 스웨덴 윤리 검토 기관 (참조 번호 2017/580)의 승인을 받았으며, 참여 환자는 서면 동의서를 받았다.

[0772] 세포 단리 및 공동배양

[0773] 편도암 생검을 0.1 mg/mL 겐타마이신 (Sigma-Aldrich)이 보충된 RPMI 1640 배지 (ThermoFisher Scientific)에서 작은 단편으로 절단하였다. 조직 단편을 콜라게나제 IV (Sigma-Aldrich)(2.0 mg/mL) 및 DNase I (Sigma Aldrich)(200 K유닛/mL)을 이용하여 37℃에서 20 분 동안 효소적으로 소화시켰다. 세포를 70 μm 세포 여과기 (BD Biosciences)를 사용하여 여과하고, FACSAria IIu (BD Biosciences)를 사용하여 세포 분류를 위해 CD3-PerCPCy5.5, VS620-PECF594, CD45-APCH7 및 HLA-DR-BV711로 염색하였다. 104 개의 생존가능한 CD45+ HLA-DR+ CD3- 세포를 웰당 6x104 개의 UV-조사된 CHO-CEA 세포로 미리-시딩된 96-웰 편평-바닥 플레이트 (Nunc UpCell, ThermoFisher Scientific) 내로 직접 분류하였다. 19 nM의 CD40xCEA bsAb, CD40 mAb 또는 이소타입 대조군을 13 시간 동안 공배양물에 첨가한 후, 상층액을 수집하고, 세포를 세척하고, ChromPure 마우스 IgG (Jackson ImmunoResearch)와의 비-특이적 결합을 위해 15 분 동안 실온에서 차단시켰다. FACSAria IIu 기기 (BD Biosciences)를 사용하여 유세포 분석법 분석을 위해 세포를 형광색소-커플링된 항체 (보충 표 1)로 즉시 염색하였다. Bio-PlexR 200 시스템 (Bio-Rad Lab)에서 Bio-Plex Pro 인간 사이토카인 17-플렉스 검정을 사용하여 사이토카인 분석을 수행하였다.

[0774] *표 18 - 유세포 분석법에 사용된 항체*

[0775]

항원	형광단	클론	회사
인간 세포			
CD45	APCH7	2D1	BD Biosciences
HLA-DR	BV711	G46-6	BD Biosciences
CD11c	BV510	B-ly6	BD Biosciences
XCR1	PE	S15046E	BioLegend
CD1C	BV786	L161	BioLegend
CD14	FITC	TÜK4	Invitrogen
CCR2	APC	K036C2	BioLegend
CD123	AF700	6H6	BioLegend
CD19	PerCP Cy5.5	HIB19	BD Biosciences
CD20	PerCP Cy5.5	2H7	BD Biosciences
CD86	BV605	IT2.2	BioLegend
CD40	PE-Cy7	5C3	BD Biosciences
CCR7	BV421	2-L1-A	BD Biosciences

[0776] **결과**

[0777] 도 14에 도시된 바와 같이, CD40xCEA bsAb (ffAC_05337)에 의한 CD40 및 CEA의 동시 결합은 생체 외에서 편도암 APC의 활성화를 매개한다.

[0778] ***실시예 8: CD40-CEACAM5 이중특이적 항체 ffAC_05337의 항-종양 효과***

[0779] **배경 및 목표**

[0780] ffAC_05337은 RUBY™ 포맷의 CD40-CEA 이중특이적 항체이다. 항체는 Fcg 수용체 결합을 침묵하기 위해 LALA-돌

연변이되었다.

[0781] 이 연구의 목표는 MC38-CEACAM5 2라고 하는 CEACAM5-형질주입된 뮤린 종양 세포주를 접종한 인간 CD40 트랜스제닉 (hCD40tg) 마우스에서 ffAC_05337 및 CD40 mAb의 항-종양 효과를 평가하는 것이었다.

[0782] **재료 및 방법**

[0783] 9 주령의 암컷 hCD40tg 마우스에 $1x10^6$ 개의 MC38-CEACAM5 2 세포 (Kerafast로부터 수득됨)를 우측 옆구리에 s.c.로 접종하였다. 접종 후 7, 10, 13 일차에, 마우스에 i.p.로 100 μg의 야생형 CD40 단일특이적 항체, 1132 또는 167 μg의 CD40-CEACAM5 bsAb ffAC_05337을 투여하였다. 비히클-치료된 마우스의 그룹이 또한 포함되었다. 종양은 너비 (w), 길이 (l) 및 높이 (h)를 캘리퍼로 빈번하게 측정하였으며, 종양 부피는 다음의 식을 사용하여 계산되었다: (w/2 x l/2 x h/2 x π x (4/3)).

[0784] **결과 및 결론**

[0785] 데이터는 CD40 mAb 1132가 아닌 CD40-CEACAM5 bsAb ffAC_05337을 이용한 치료가 비히클-치료된 마우스와 비교하여 MC38-CEACAM5 종양 부피를 감소시켰다는 것을 입증하였다 (도 15). 추가로, 1132가 아닌 ffAC_05337로의 치료는 비히클-치료된 마우스와 비교하여 개선된 생존율을 야기하였다 (도 15).

[0786] ***실시예 9 - 원발성 인간 위암 환자로부터 수득된 세포를 사용한 기능적 검정***

[0787] 위암 환자로부터의 해리된 일차 세포는 Discovery Life Sciences (Huntsville, AL)로부터 구입하였다. 해동 직후, NucleoCounter® NC-200™ (Chemometec, Denmark)을 사용하여 DTC를 카운팅하고, 20,000 개의 생존가능한 세포를 각각의 웰 내로 피펫팅하였다. 암세포를 사용하여, CD40 생물검정에서 기능성을 평가하거나, 대안적으로 동일한 종양 샘플에서 면역 세포를 활성화하는 원발성 암세포의 능력을 분석하였다. 200,000 개의 생존가능한 세포를 Nunc UpCell 96-웰 플레이트 (Thermo Scientific, 174897) 내로 피펫팅하였다. 다음으로, CD40xCEA bsAb (ffAC_05337) 또는 대조군을 웰 내로 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO2 항온처리기에서 48 시간 동안 항온처리하였다. 다음으로, 세포를 수확하고, 유세포 분석법으로 분석하였다.

[0788] *표 19 - 활성화 염색을 위한 FAC 패널*

[0789]

CD40	APC	555591	BD Pharmingen
CD86	PE	555658	BD Pharmingen
CD45	V450	560367	BD Horizon
CD14	PerCP-Cy5.5	562692	BD Pharmingen
CD83	PE-Cy7	561132	BD Pharmingen
CD3	FITC	555332	BD Pharmingen
CD56	FITC	562794	BD Pharmingen

[0790] **결과**

[0791] 첫째로, 환자 유래된 종양의 CEA 밀도가 리포터 세포 검정을 사용하여 가교를 제공하고 CD40 자극을 유도하기에 충분하다는 것이 입증되었다. 결과는 환자 유래된 암 세포가 세포주와 유사한 가교 및 CD40 활성화를 유도할 수 있음을 입증하였다 (도 32). 둘째로, 환자 유래된 위 종양으로부터의 해리된 세포를 배양할 때, CD40xCEA bsAb (ffAC_05337)가 종양 침윤 면역 세포를 활성화할 수 있음이 입증되었다 (도 16).

[0792] ***실시예 10 - CD40 리포터 검정을 사용하여 가용성 CEA의 존재 하에 CD40 작용성 기능의 평가.***

[0793] **목표 및 배경**

[0794] 이 연구의 목표는 CEA 발현 세포 및 생리학적 관련된 가용성 CEA 농도의 존재 하에 CD40 리포터 검정을 사용하여 이중특이적 항체 ffAC_05337의 CD40 작용성 기능을 평가하는 것이었다. CD40 가교는 CD40 리포터 세포 상에 발현되는 CD40, 및 CHO 세포 또는 CEA 발현 인간 종양 세포 상에 발현되는 CEA의 동시 결합에 의해 매개될 것이다. 또한, 높은 수준의 가용성 CEA가 암 환자에서 전신적으로 검출될 수 있기 때문에, 생리학적 관련된 농도의 가용성 CEA의 존재 하에 작용성 기능을 평가하였다.

[0795] **재료 및 방법**

[0796] ffAC_05337의 작용성 기능은 CD40 리포터 검정 (Promega, CD40 생물검정 키트 CS JA2155)을 사용하여 평가되었다. 검정을 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 간략하게, CD40 리포터 세포 및 적정 농도의 ffAC_05337을

10% FCS를 함유하는 RPMI에 희석하고, 검정 플레이트에 첨가한 후, CEA 형질주입된 CHO, CHO wt 또는 CEA 발현 인간 종양 세포를 첨가하였다. 또한, 검정을 0.5, 1, 5, 25 또는 50 ug/ml의 가용성 CEA의 존재 하에 수행하였다. Bio-GloTM 루시퍼라제 검정 검출 용액을 첨가할 때까지 검정 플레이트를 37℃에서 6 시간 동안 항온처리하고, BMG ELISA 플레이트 리더에서 분석하였다.

[0797] **결과 및 결론**

[0798] 결과는 이중특이적 항체 ffAC_05337이 CEA의 존재 하에 CD40 활성화를 유도하고 효능 및 효험이 배양물 중 가용성 CEA의 존재에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다 (도 17 및 18). ffAC_05337의 효험의 약간의 감소는 25 및 50 ug/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 관찰될 수 있다 (도 18).

[0799] **본 발명과 관련된 추가적인 서열**

[0800] AC_05293

[0801] 쇄 H1 (서열번호 261)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKGGGGSGGGGSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ
RKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGT
KLEIKRTVAAPAVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
[0802] DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0803] 쇄 H2 (서열번호 262)

EVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKERPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNE
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVE
[0804] VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0805] 쇄 L1 (서열번호 263)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLTLSKADYEKHKVYA
[0806] CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0807] **멀티46**

[0808] 쇄 H1 (서열번호 264)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAP
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSSHGPLLTFGQGTKLEIKRP
VAAPAVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLKNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
[0809] YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0810] 쇄 H2 (서열번호 265)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFGYYAIHWVREAPGQGLEWMGGIGSIFGTANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAWSSDHMDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLTSVVEVP
[0811] SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0812] 쇄 L1 (서열번호 266)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLTLSKADYEKHKVYA
[0813] CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0814] AC_05332

[0815] 쇄 H1 (서열번호 267)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
[0816] ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPAVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLKNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
[0817] EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0818] 쇄 L1 (서열번호 268)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGYLHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLT
[0819] LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0820] 쇄 H2 (서열번호 269)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVREAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

[0821] SLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0822] AC_05330

[0823] 쇄 H1 (서열번호 270)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRRAPGKGLEWLSYISGGSSYIFY
ADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQTYGYLHTFGQGTKLEIKRTVAAPAVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
KNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV

[0824] THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0825] 쇄 L1 (서열번호 271)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYWYQELPGTAPKLLIYGNINRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCYISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAW

[0826]

[0827] SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0828] 쇄 H2 (서열번호 272)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVREAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

[0829] SGLYSLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0830] AC_05302

[0831] 쇄 H1 (서열번호 273)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQSISSYLNWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQTYGYLHTFGQGTKLEIKRTVAAPAVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLKN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
[0832] QGLSSPVTKSFNRGEC

[0833] 쇄 L1 (서열번호 274)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLT
[0834] LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0835] 쇄 H2 (서열번호 275)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVREAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
[0836] SGLYSLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0837] ffAC_05337

[0838] 쇄 H1 (서열번호 276)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYMGWVRRAPGKGLEWVSSIGSGSYSTSY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYPSVPFPLHLDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP
GQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYWYQRLPGTAPKLLIYGNINRPSGVPDRFSGSKSGTSAS
LAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLGQPKAAPAVTLFPPSSEELQANK
ATLVCLIKDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAWSYLSLTPEQWKSHR
[0839] SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0840] 쇄 L1 (서열번호 277)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGNPHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLTL
[0841] SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0842] 쇄 H2 (서열번호 278)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVREAPGKGLEWLSYISGGSSYIFY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

[0843] LYSLTSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0844] AC_05337 (ffAC_05337의 모)

[0845] 쇄 H1 (서열번호 279)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYMGWVRRAPGKGLEWVSSIGSGSYSTSY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYPSVPFPLHLDYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP

[0846] GQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYWYQRLPGTAPKLLIYGNINRPSGVPDRFSGSKSGTSAS

LAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLGQPKAAPAVTLFPPSSEELQANK
ATLVCLIKDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAWSYLSLTPEQWKSHR

[0847] SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0848] 쇄 L1 (서열번호 280)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAGNPHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCYLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLWSTLTL

[0849] SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0850] 쇄 H2 (서열번호 281)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVREAPGKGLEWLSYISGGSSYIFY
ADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

[0851] LYSLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0852] 1132

[0853] 중쇄 (서열번호 282)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0854] K

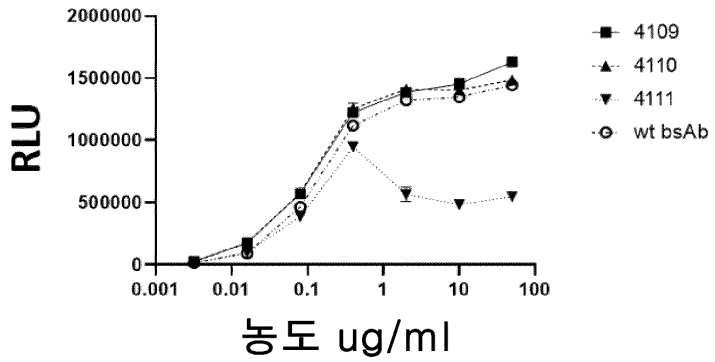
[0855] 경쇄 (서열번호 283)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA

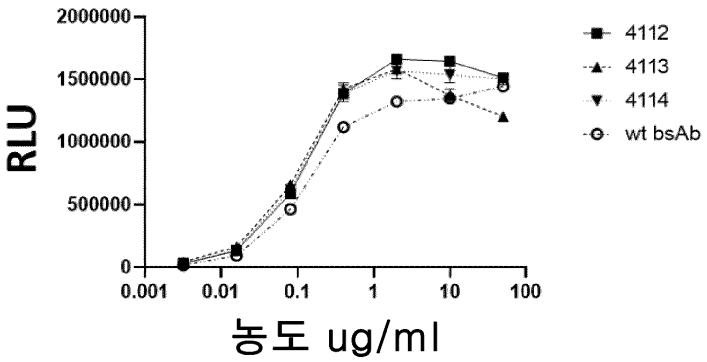
[0856] CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

도면

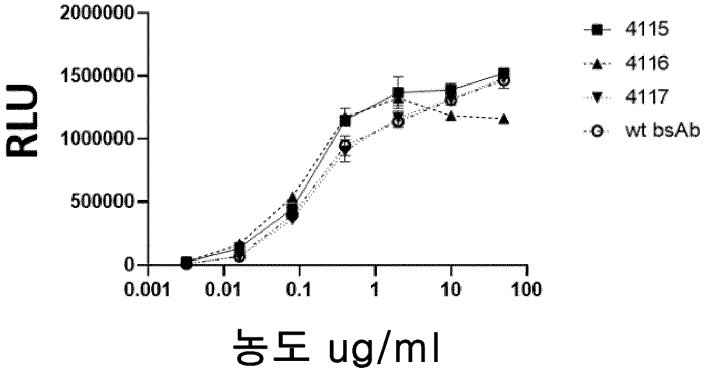
도면1a



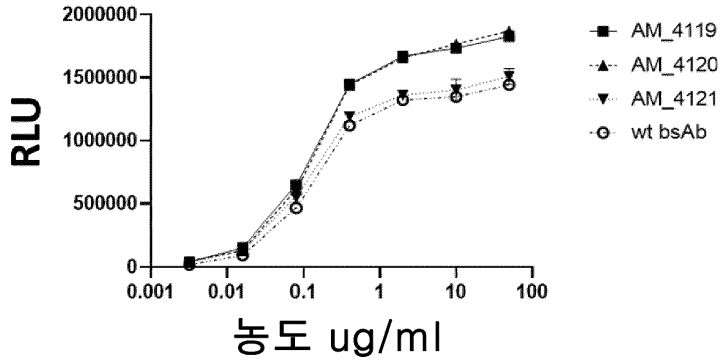
도면1b



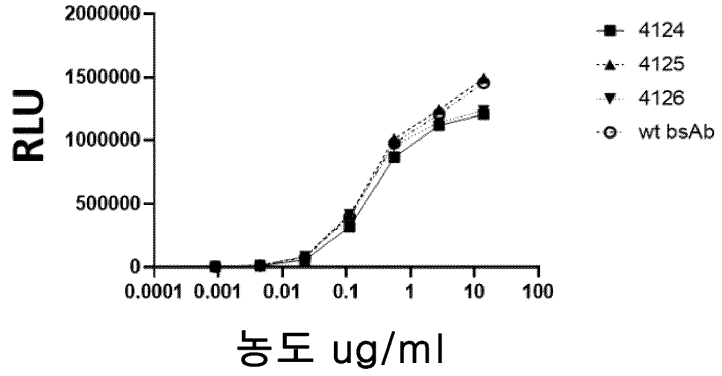
도면1c



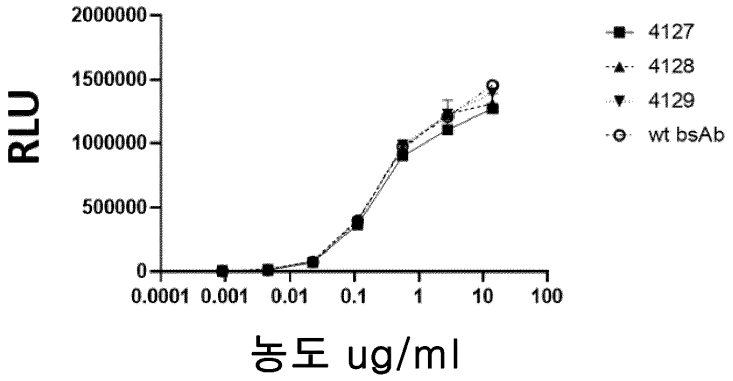
도면1d



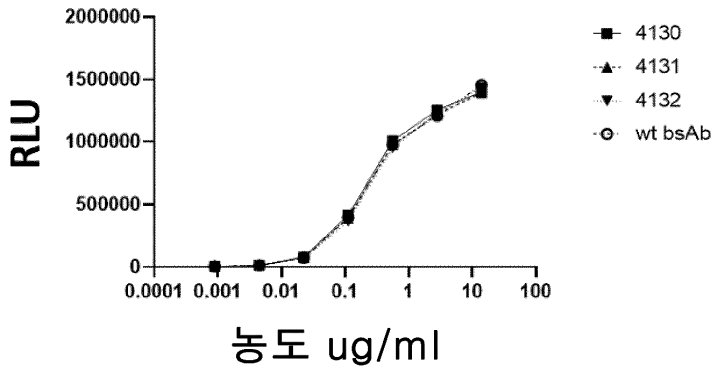
도면1e



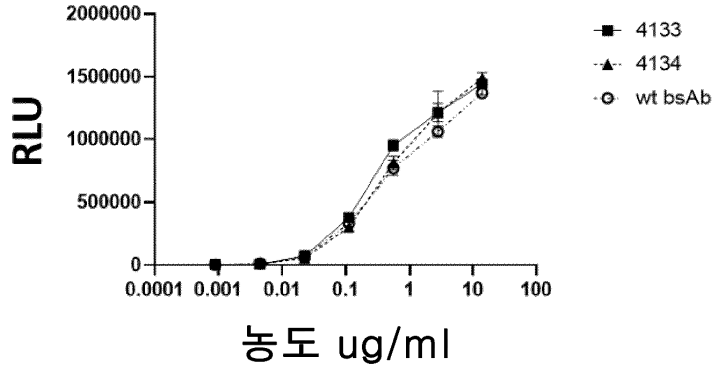
도면1f



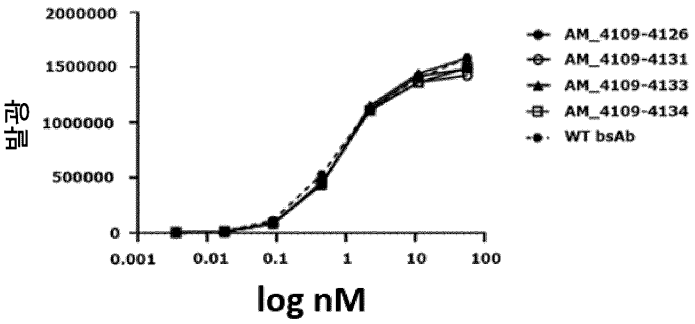
도면1g



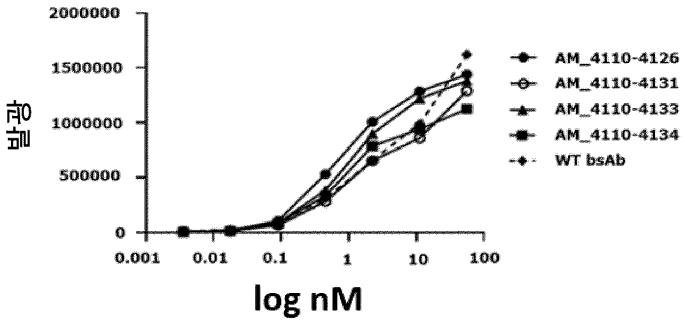
도면1h



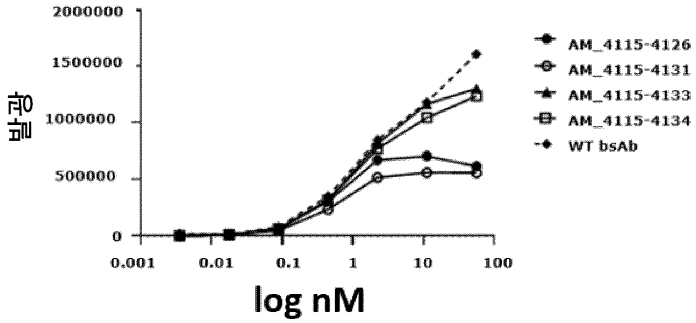
도면2a



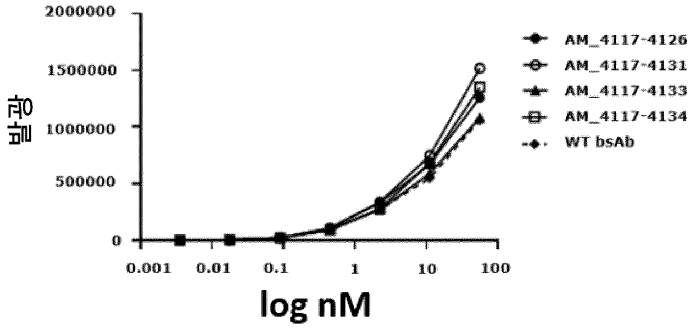
도면2b



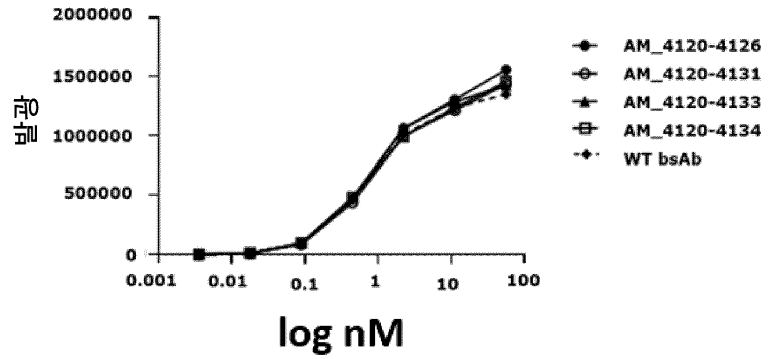
도면2c



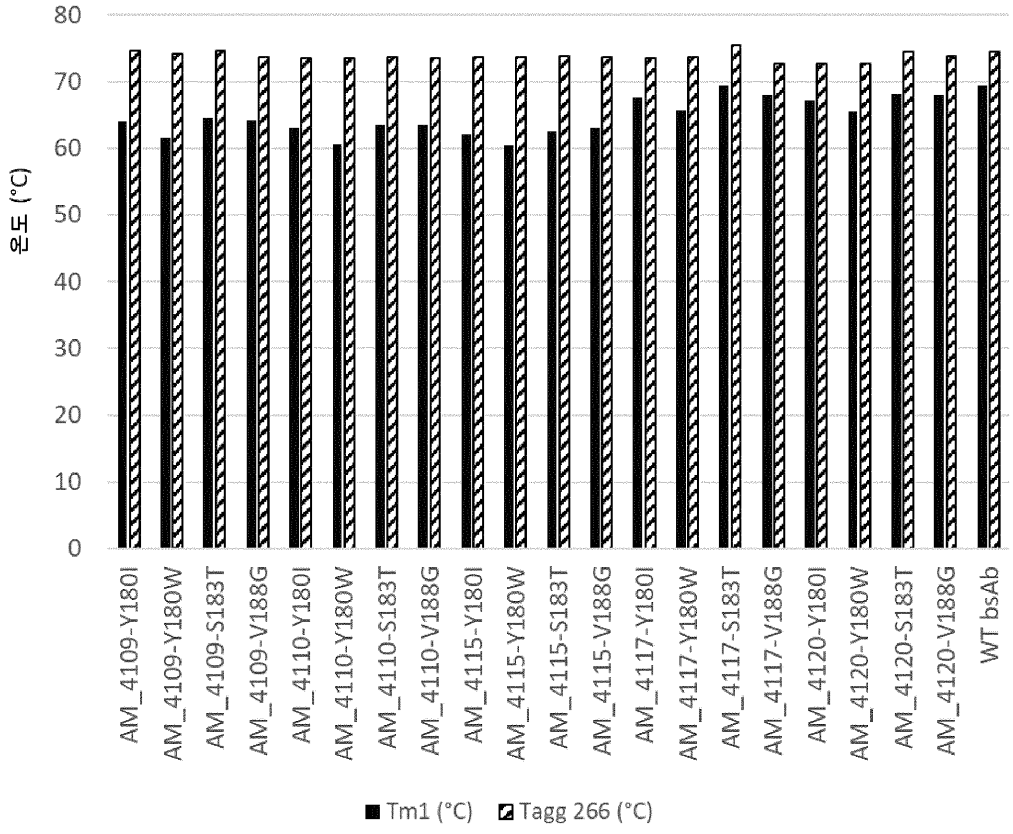
도면2d



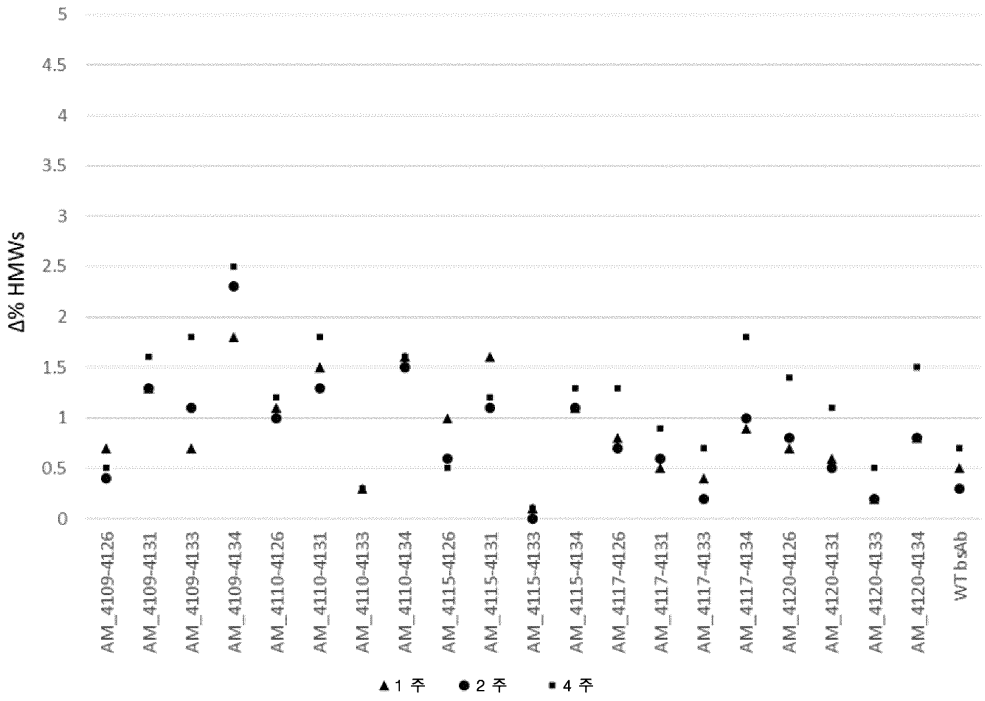
도면2e


2000000
1500000
1000000
500000
0
발광
0.001
0.01
0.1
1
10
100
log nM
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb

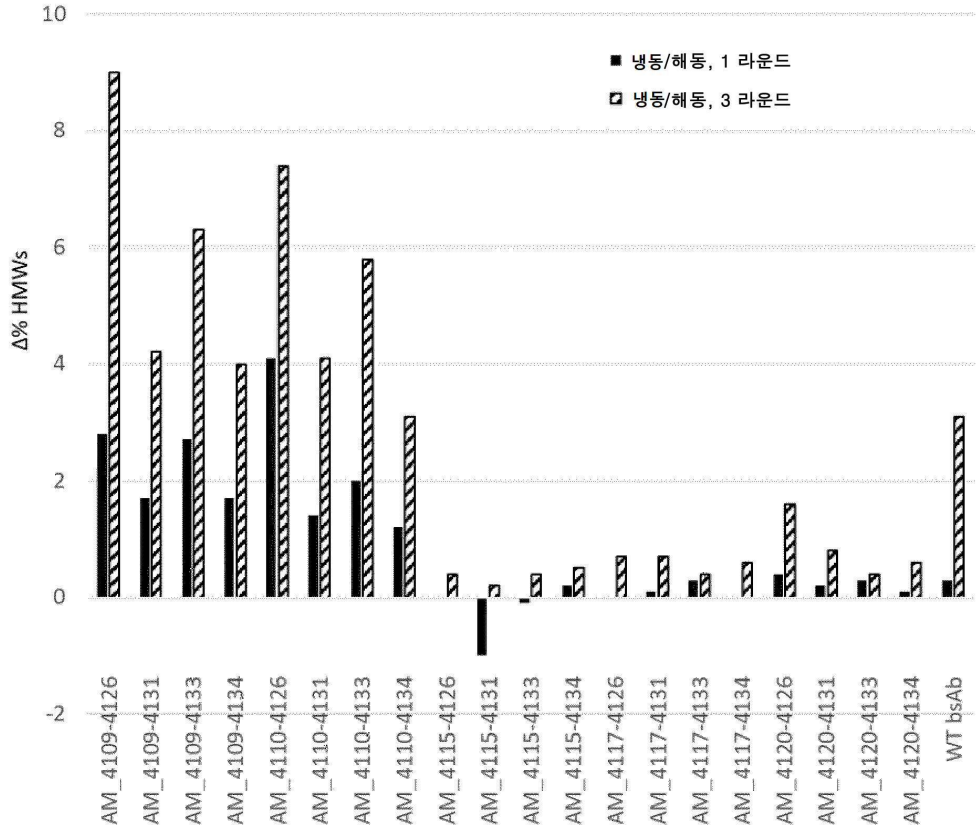
도면3


80
70
60
50
40
30
20
10
0
온도 (°C)
AM_4109-Y180I
AM_4109-Y180W
AM_4109-S183T
AM_4109-V188G
AM_4110-Y180I
AM_4110-Y180W
AM_4110-S183T
AM_4110-V188G
AM_4115-Y180I
AM_4115-Y180W
AM_4115-S183T
AM_4115-V188G
AM_4117-Y180I
AM_4117-Y180W
AM_4117-S183T
AM_4117-V188G
AM_4120-Y180I
AM_4120-Y180W
AM_4120-S183T
AM_4120-V188G
WT bsAb
Tm1 (°C)
Tagg 266 (°C)

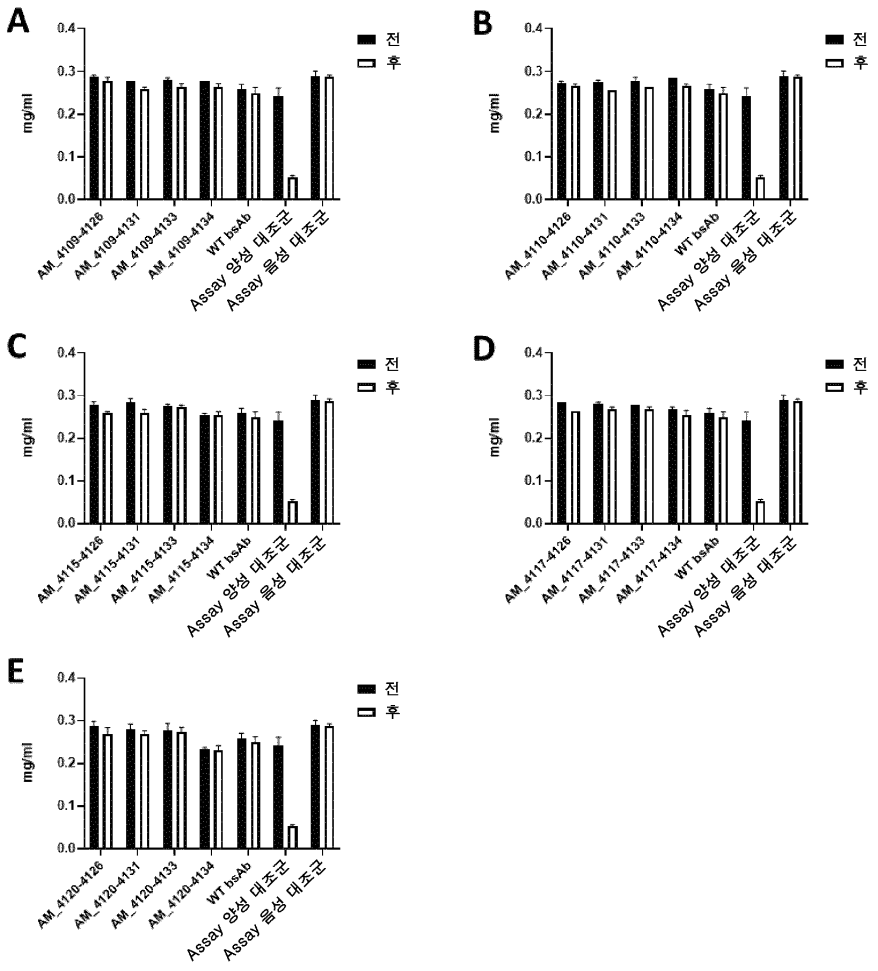
도면4


Δ% HMWs
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
AM_4109-4134
AM_4110-4126
AM_4110-4131
AM_4110-4133
AM_4110-4134
AM_4115-4126
AM_4115-4131
AM_4115-4133
AM_4115-4134
AM_4117-4126
AM_4117-4131
AM_4117-4133
AM_4117-4134
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb
▲1 주
● 2 주
■ 4 주

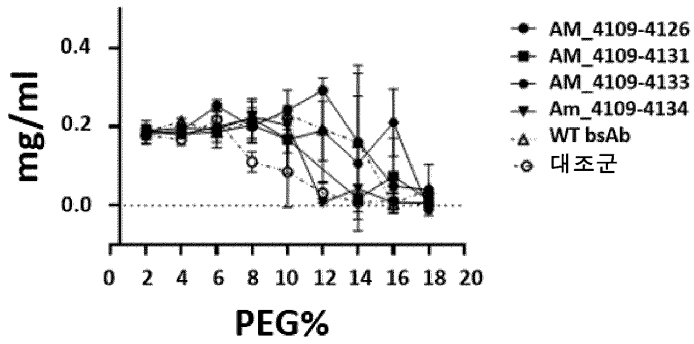
도면5


Δ% HMWs
10
8
6
4
2
0
-2
■ 냉동/해동, 1 라운드
▨ 냉동/해동, 3 라운드
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
AM_4109-4134
AM_4110-4126
AM_4110-4131
AM_4110-4133
AM_4110-4134
AM_4115-4126
AM_4115-4131
AM_4115-4133
AM_4115-4134
AM_4117-4126
AM_4117-4131
AM_4117-4133
AM_4117-4134
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb

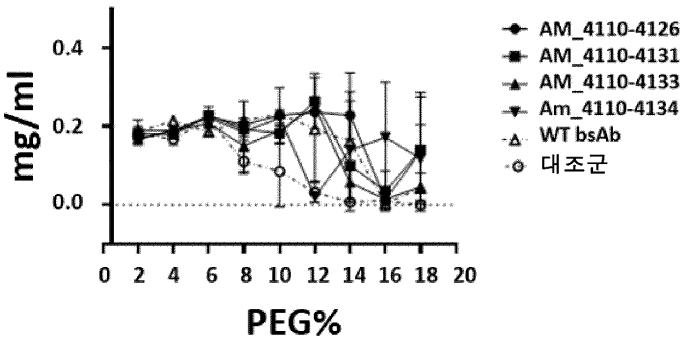
도면6


A
B
C
D
E
mg/ml
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
전
후
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
AM_4109-4134
AM_4110-4126
AM_4110-4131
AM_4110-4133
AM_4110-4134
AM_4115-4126
AM_4115-4131
AM_4115-4133
AM_4115-4134
AM_4117-4126
AM_4117-4131
AM_4117-4133
AM_4117-4134
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
AM_4120-4134
WT bsAb
Assay 양성 대조군
Assay 음성 대조군

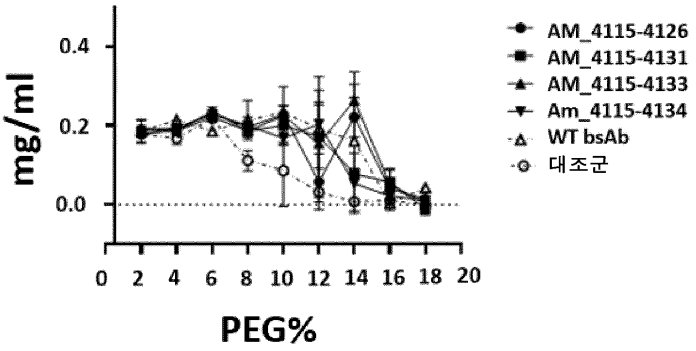
도면7a


mg/ml
0.4
0.2
0.0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
PEG%
AM_4109-4126
AM_4109-4131
AM_4109-4133
Am_4109-4134
WT bsAb
대조군

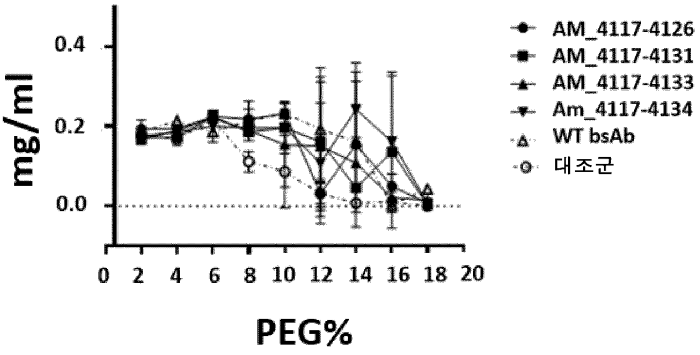
도면7b



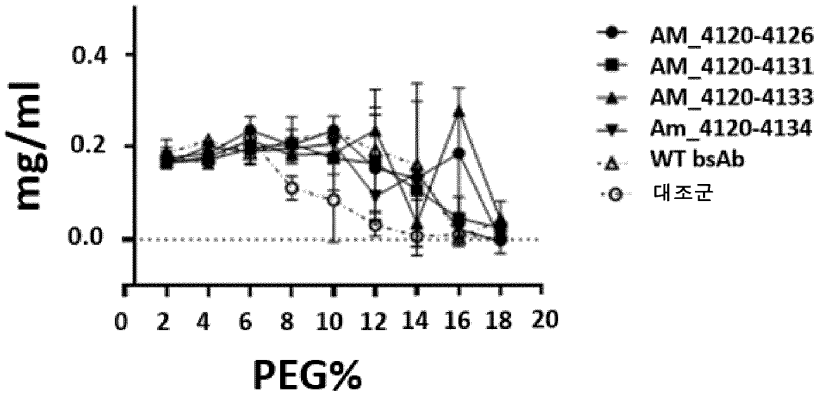
도면7c



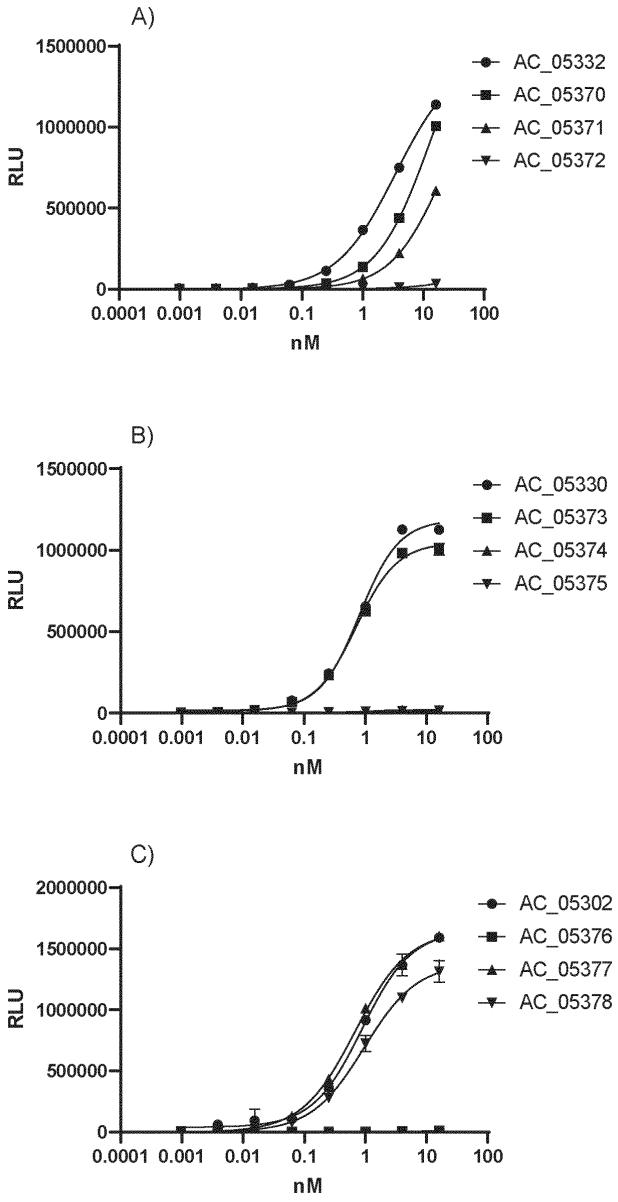
도면7d



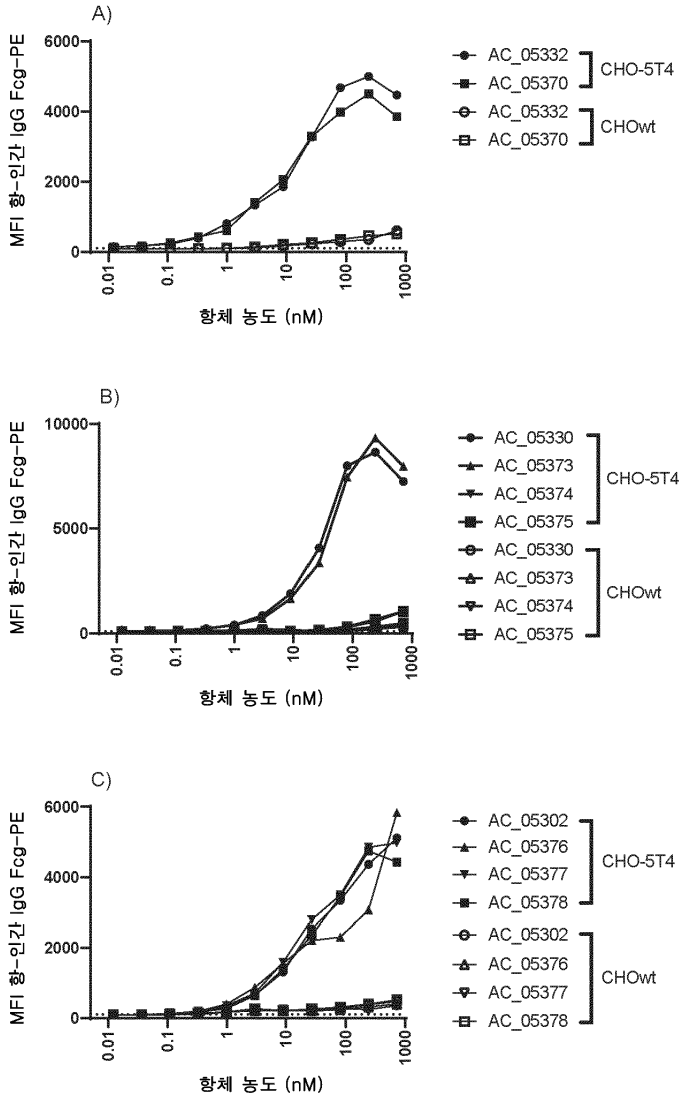
도면7e


0.4
0.2
0.0
mg/ml
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
PEG%
AM_4120-4126
AM_4120-4131
AM_4120-4133
Am_4120-4134
WT bsAb
대조군

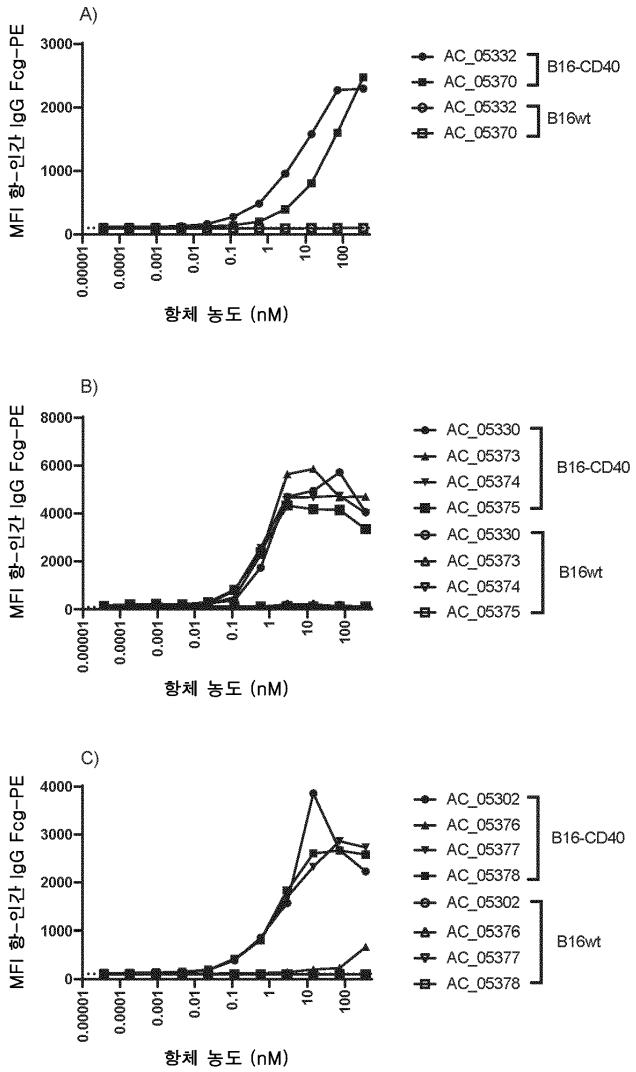
도면8


A)
1500000
1000000
500000
0
RLU
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
nM
AC_05332
AC_05370
AC_05371
AC_05372
B)
1500000
1000000
500000
0
RLU
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
nM
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
C)
2000000
1500000
1000000
500000
0
RLU
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
nM
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378

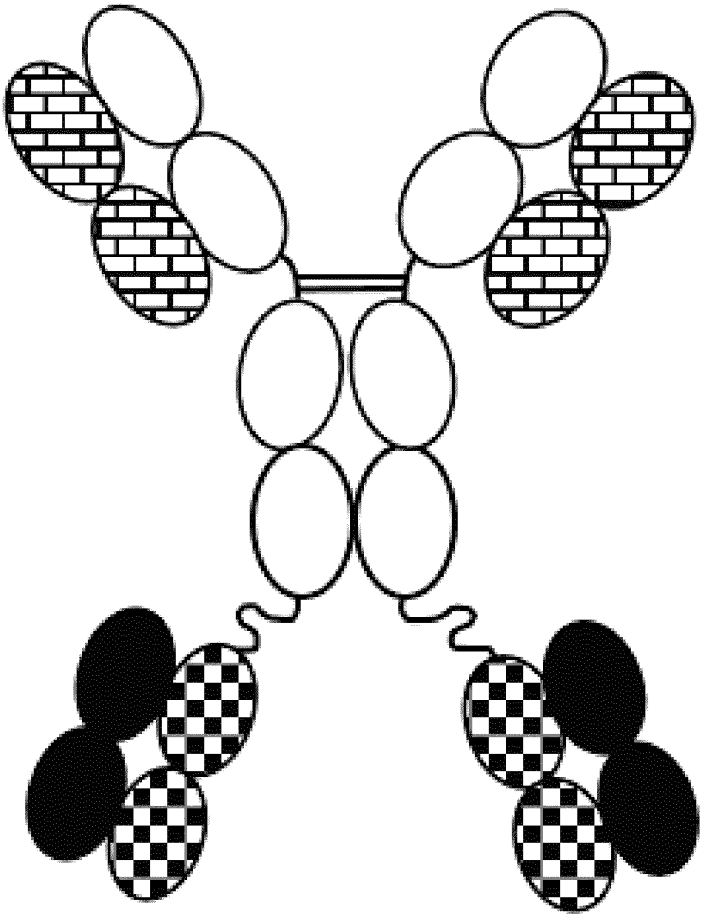
도면9


A)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
AC_05332
AC_05370
CHO-5T4
AC_05332
AC_05370
CHOwt
B)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
CHO-5T4
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
CHOwt
C)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
CHO-5T4
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
CHOwt

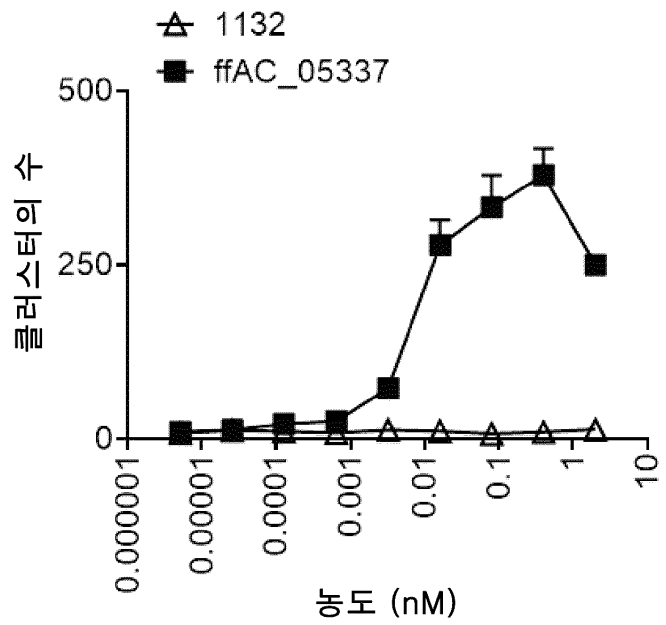
도면10


A)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
3000
2000
1000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
항체 농도 (nM)
AC_05332
AC_05370
B16-CD40
AC_05332
AC_05370
B16wt
B)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
8000
6000
4000
2000
0
항체 농도 (nM)
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
B16-CD40
AC_05330
AC_05373
AC_05374
AC_05375
B16wt
C)
MFI 항-인간 IgG Fcg-PE
4000
3000
2000
1000
0
항체 농도 (nM)
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
B16-CD40
AC_05302
AC_05376
AC_05377
AC_05378
B16wt

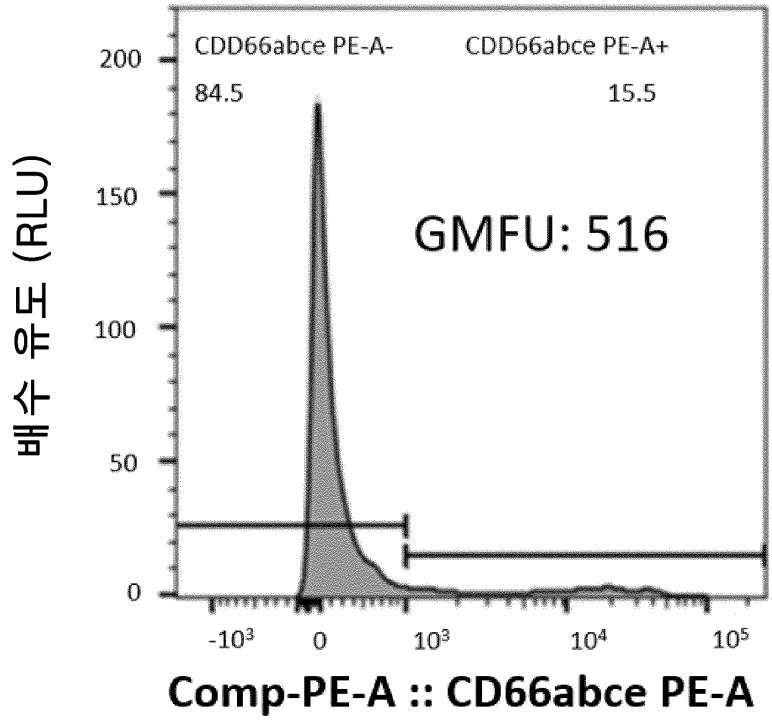
도면11



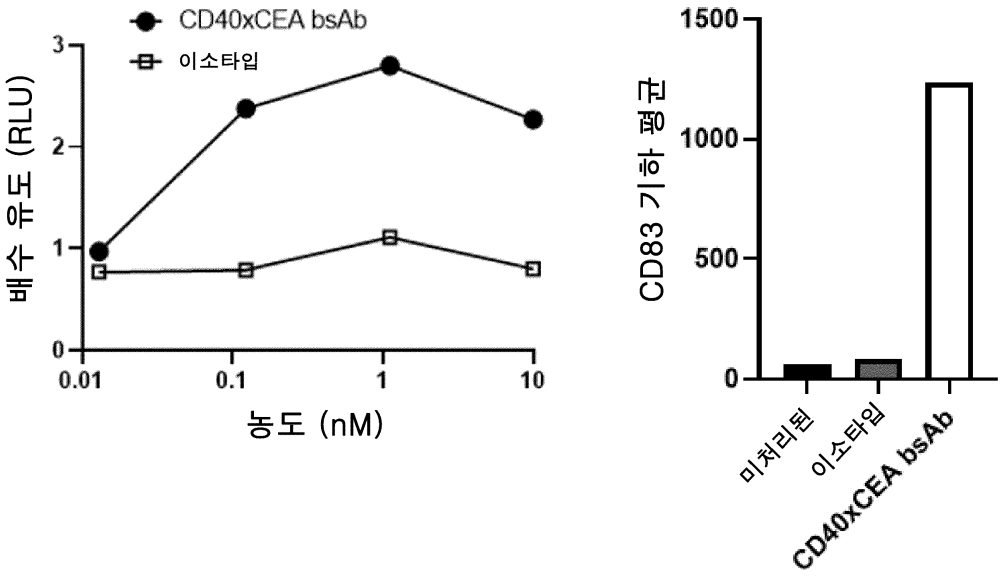
도면12


1132
ffAC_05337
500
250
0
클러스터의 수
0.000001
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
농도 (nM)

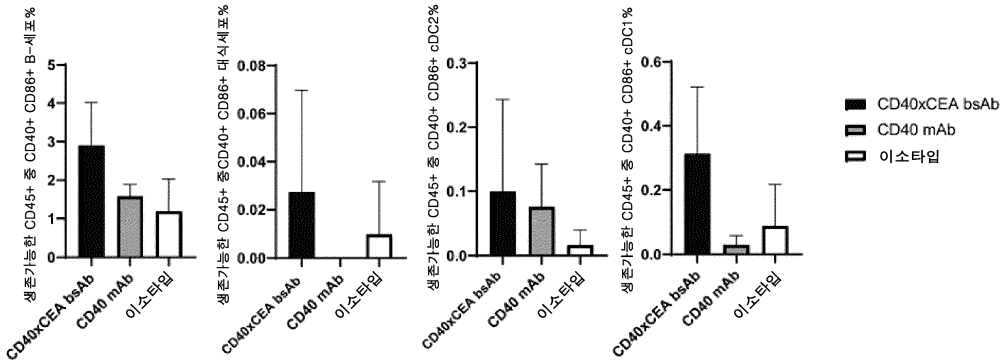
도면13a


CDD66abce PE-A-
84.5
CDD66abce PE-A+
15.5
GMFU: 516
200
150
100
50
0
배수 유도 (RLU)
-10³
0
10³
10⁴
10⁵
Comp-PE-A :: CD66abce PE-A

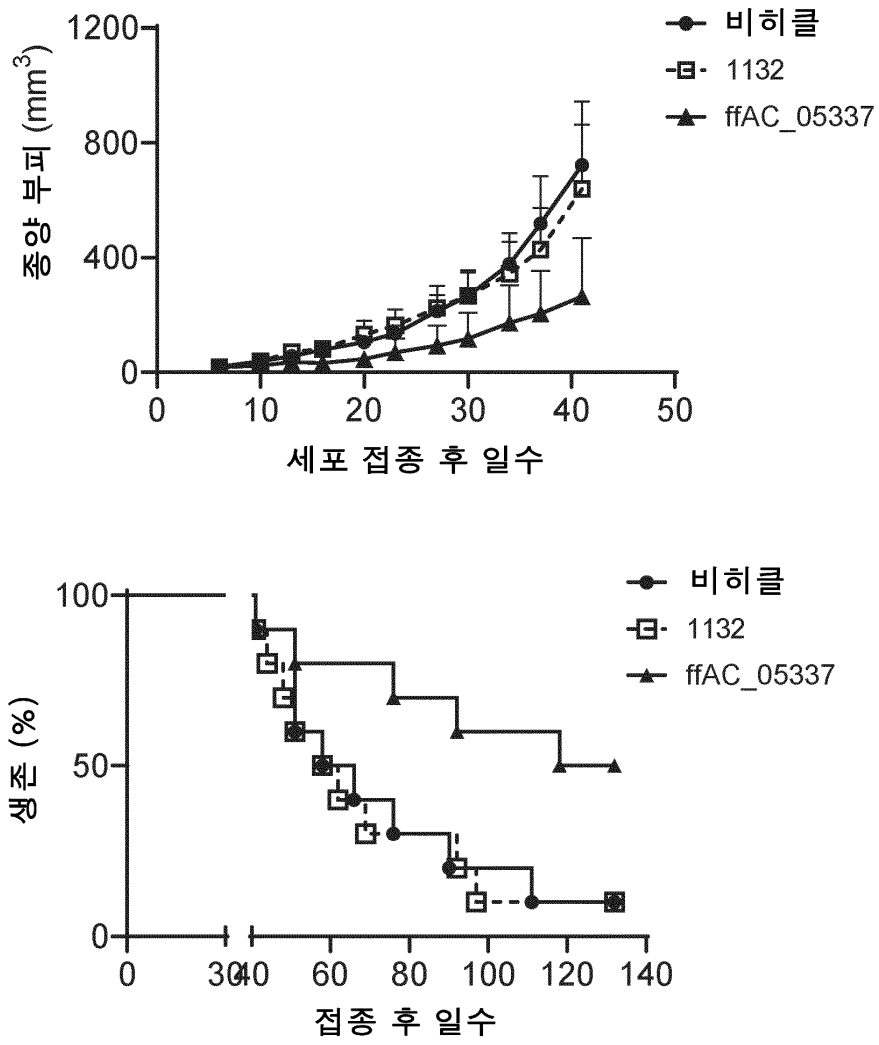
도면13b


CD40xCEA bsAb
이소타입
배수 유도 (RLU)
농도 (nM)
0.01
0.1
1
10
CD83 기하 평균
1500
1000
500
0
미처리된
이소타입
CD40xCEA bsAb

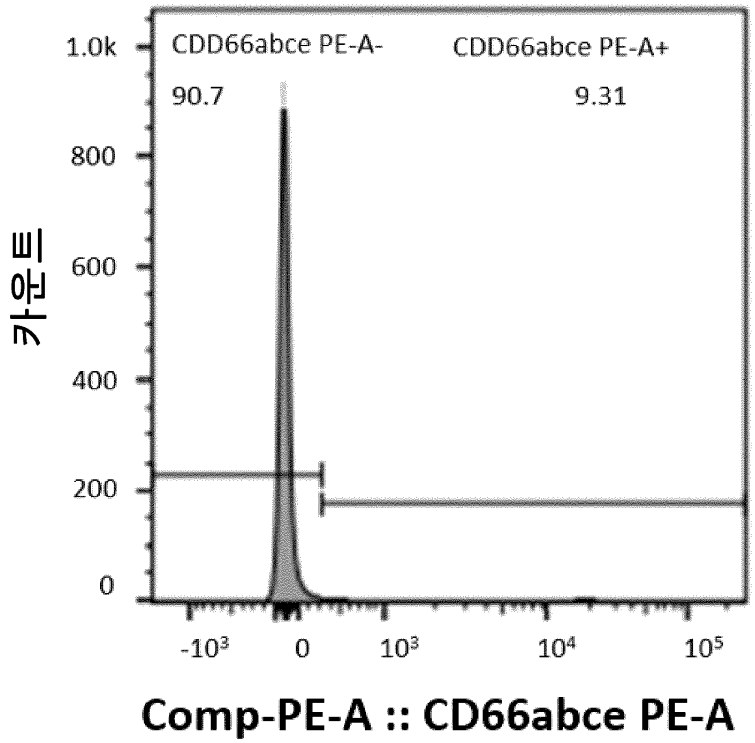
도면14


생존가능한 CD45+ 중 CD40+ CD86+ B-세포%
생존가능한 CD45+ 중CD40+ CD86+ 대식세포%
생존가능한 CD45+ 중 CD40+ CD86+ cDC2%
생존가능한 CD45+ 중 CD40+ CD86+ cDC1%
CD40xCEA bsAb
CD40 mAb
이소타입

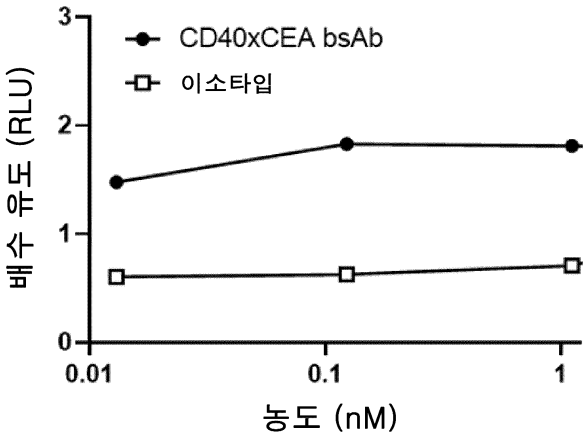
도면15

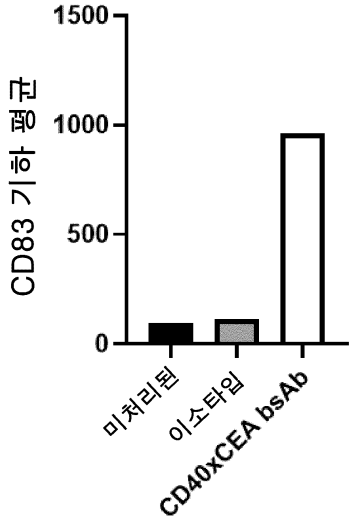

종양 부피 (mm3)
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
세포 접종 후 일수
비히클
1132
ffAC_05337
생존 (%)
100
50
0
0
30
40
60
80
100
120
140
접종 후 일수
비히클
1132
ffAC_05337

도면16a

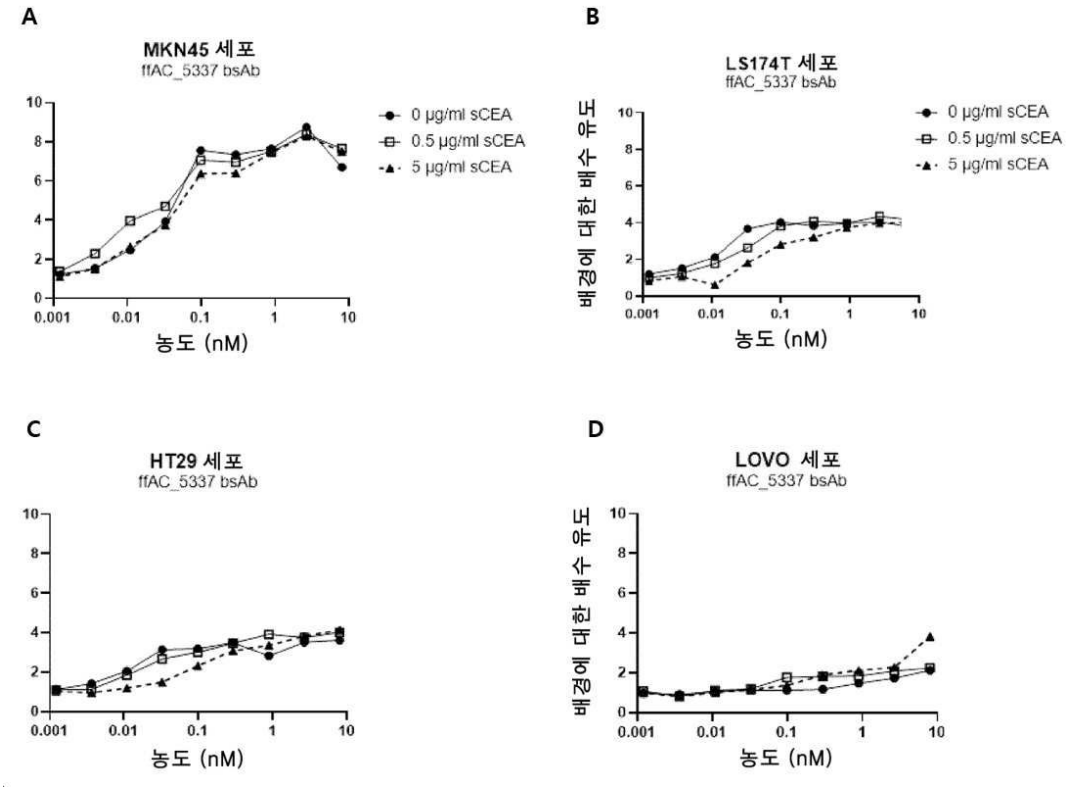

CDD66abce PE-A-
90.7
CDD66abce PE-A+
9.31
1.0k
800
600
400
200
0
카운트
-10³
0
10³
10⁴
10⁵
Comp-PE-A :: CD66abce PE-A

도면16b

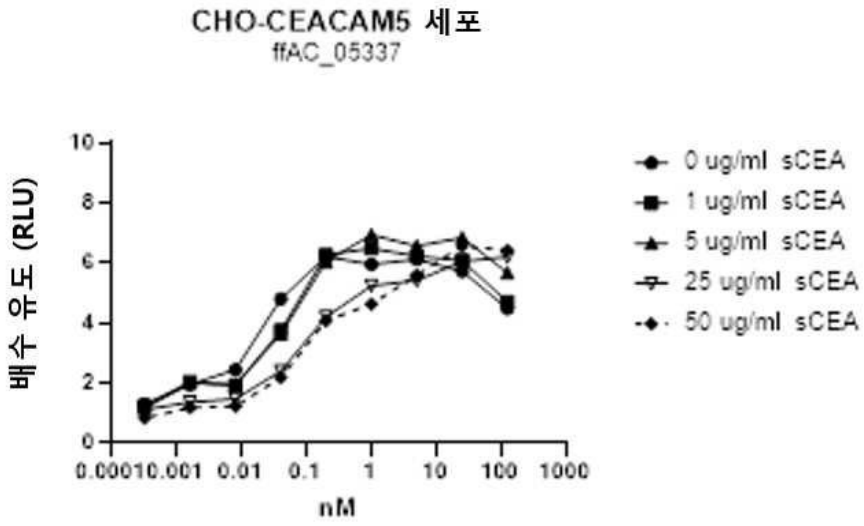

CD40xCEA bsAb
이소타입
3
2
1
0
배수 유도 (RLU)
0.01
0.1
1
농도 (nM)


1500
1000
500
0
CD83 기하 평균
미처리된
이소타입
CD40xCEA bsAb

도면17


A
MKN45 세포
ffAC_5337 bsAb
0 μg/ml sCEA
0.5 μg/ml sCEA
5 μg/ml sCEA
농도 (nM)
B
LS174T 세포
ffAC_5337 bsAb
배경에 대한 배수 유도
농도 (nM)
C
HT29 세포
ffAC_5337 bsAb
농도 (nM)
D
LOVO 세포
ffAC_5337 bsAb
배경에 대한 배수 유도
농도 (nM)

도면18


CHO-CEACAM5 세포
ffAC_05337
배수 유도 (RLU)
nM
0 ug/ml sCEA
1 ug/ml sCEA
5 ug/ml sCEA
25 ug/ml sCEA
50 ug/ml sCEA

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.