(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051727
(43) 공개일자 2025년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 14/74* (2024.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2833 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7008721
(22) 출원일자(국제) 2023년08월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년03월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/072802
(87) 국제공개번호 WO 2024/038183
국제공개일자 2024년02월22일
(30) 우선권주장
63/371,861 2022년08월18일 미국(US)

(71) 출원인
이뮤노코어 리미티드
영국 옥스포드셔 오엑스14 4알와이 애빙던 밀턴 파크 파크 드라이브 92
(72) 발명자
조르주 아망딘
영국 오엑스14 4알와이 애빙던 밀턴 파크 파크 드라이브 92 이뮤노코어 리미티드 씨/오
하티 스티븐
영국 오엑스14 4알와이 애빙던 밀턴 파크 파크 드라이브 92 이뮤노코어 리미티드 씨/오
맥 록 향
영국 오엑스14 4알와이 애빙던 밀턴 파크 파크 드라이브 92 이뮤노코어 리미티드 씨/오
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 44 항

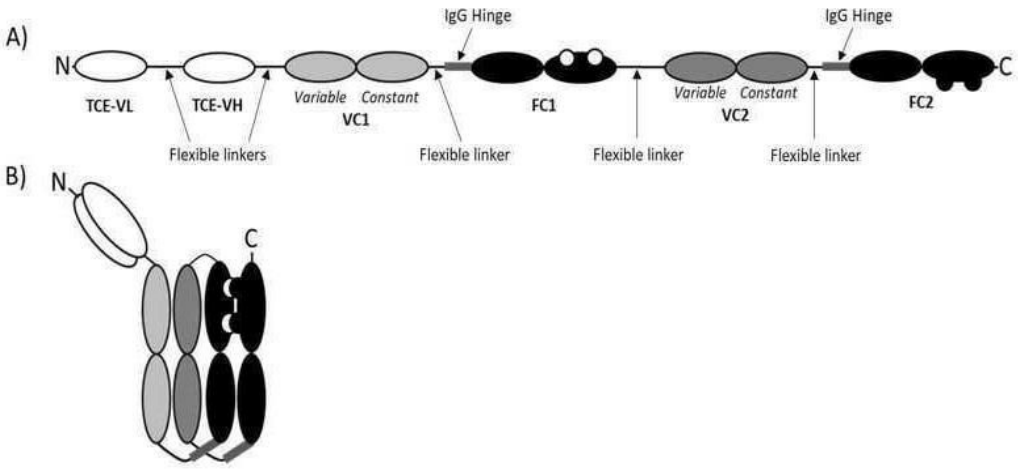
(54) 발명의 명칭 **멀티-도메인 결합 분자**

(57) 요 약

멀티-도메인 결합 분자.

본 발명은 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자에 관한 것이다. 상기 분자는 i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인; ii) 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH)을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인; 및 iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인;을 포함하며, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성한다. 상기 결합 분자는 암 및 감염성 질환과 같은 질병을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인으로서, VC1 및 VC2가 이량체화하여pMHC 결합 도메인을 형성하는, 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인;

ii) 면역세포 결합(ICE) 도메인; 및

iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인으로, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성하는, 반감기 연장 도메인;

을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자로서,

상기 면역세포 결합(ICE) 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그의 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그의 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그의C 말단을 통해 FC2 영역의 N 말단에 연결되며,

상기 pMHC 결합 도메인 및 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 면역 세포에 결합할 수 있는, 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 면역세포 결합 도메인은

i) 항체 경쇄 가변 영역(ICE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(ICE-VH); 또는

ii) 단일 도메인 항체(ICE-SD)을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역 세포는 T 세포이고,

상기 면역세포 결합 도메인은 i) T 세포 결합 면역 효능 도메인; 또는 ii) T 세포 결합 면역 억제제에서 선택되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 4

i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인으로서, VC1 및 VC2가 이량체화하여 상기 pMHC 결합 도메인을 형성하는, 상기 pMHC 결합 도메인;

ii) 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH)을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인; 및

iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인으로서, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성하는, 상기 반감기 연장 도메인;을 포함하는, 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자로서,

상기 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그 C 말단을 통해 FC2 영역의 N 말단에 연결되며,

상기 pMHC 결합 도메인 및 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 T 세포에 결합할 수 있는, 멀

티-도메인 단일 사슬 결합 분자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 T 세포 결합 면역 효능은 scFv인, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) VC1은 (a) TCRα 가변 및 불변 영역 또는 (b) TCRβ가변 및 불변 영역 중 하나를 포함하고,

(ii) VC2는 상기 (a) 및 (b) 중 다른 하나를 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 VC1은 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함하고, 상기 VC2는 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 하나에 있어서,

(i) VC1은 (a) 중쇄 항체 가변 영역 또는 (b) 경쇄 항체 가변 영역 중 하나를 포함하고,

(ii) VC2는 상기 (a) 및 (b) 중 다른 하나를 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 하나에 있어서,

상기 TCE-VL 영역은 그 C 말단을 통해 TCE-VH 영역의 N 말단에 연결되고 상기 TCE-VH 영역은 그 C 말단을 통해 VC1의 N 말단에 연결되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역세포 결합 도메인 또는 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 CD3 및/또는 TCR/CD3 복합체와의 상호작용을 통해 T 세포를 활성화시키는 CD3 작동 도메인인, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역세포 결합 도메인 또는 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 항-CD3 scFv인, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 pMHC 결합 도메인은 MHC와 복합체를 형성한 종양연관항원 펩타이드에 결합하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 ICE, TCE-VH, TCE-VL, VC1, VC2, FC1 및 FC2 영역 중 둘 이상이 링커 및/또는 IgG 힌지 서열을 통해 서로 연결되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 링커는 GGGGS(서열번호 18), GGGSG(서열번호 20), GGSGG(서열번호 21), GSGGG(서열번호 22), GSGGGP(서열번호 23), GGEPS(서열번호 24), GGEGGGP(서열번호 25), GGEGGGSEGGGS(서열번호 26), GGGSGGGG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS(서열번호 39), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 49), EAAAK(서열번호 50) 및 EAAAKEAAAKEAAAK(서열번호 51)의 군으로부터 선택된 서열을 갖는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 하나에 있어서,

상기 VC1은 IgG 힌지 서열을 포함하는 서열을 통해 FC1 영역에 연결되고/되거나 VC2는 IgG 힌지 서열을 포함하는 서열을 통해 FC2 영역에 연결되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 IgG 힌지 서열은 서열번호 44와 적어도 80% 동일한, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

상기 VC1을 FC1 영역에 연결하는 서열은 추가로 글라이신-세린 링커를 포함하고/하거나 VC2를 FC2 영역에 연결하는 서열은 추가로 글라이신-세린 링커를 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 글라이신-세린 링커는 서열번호 47에 제공된 서열을 갖는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 19

제4항 내지 제18항 중 어느 하나에 있어서,

상기 TCE-VL 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하는 서열을 통해 TCE-VH 영역에 연결되며, 선택적으로 상기 서열은 서열번호 39에 제공되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 20

제4항 내지 제19항 중 어느 하나에 있어서,

상기 TCE-VH 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하는 서열을 통해 VC1에 연결되며, 선택적으로 상기 서열은 서열번호 18에 제공되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FC1 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하는 서열을 통해 VC2에 연결되며, 선택적으로 상기 서열은 서열번호 47에 제공되는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 반감기 연장 도메인은 FC1 영역과 FC2 영역의 이량체화를 촉진하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 23

제22항에 있어서,

(i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 하나는 EU 번호 체계에 따른 T366S, L368A, T394S, F405A, Y407A, Y407T 및 Y407V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고;

(ii) FC1 영역 및 FC2 영역 중 다른 하나는 EU 번호 체계에 따른 T366W, T366Y, T366W, T394W 및 F405W로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 24

제22항에 있어서,

(i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 하나는 EU 번호 체계에 따른 T366S, L368A 및 Y407V로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고;

(i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 다른 하나는 EU 번호 체계에 따른 T366W 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 반감기 연장 도메인은 Fc 도메인의 작동 기능을 약화시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 반감기 연장 도메인은 EU 번호 체계에 따른 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, L235P, G236R, G237A, P238S, F241A, V264A D265A, H268A, D270A, N297A, N297G, N297Q, E318A, K322A, L328R, P329G, P329A, A330S, A330L, P331A 및 P331S로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서,

상기 반감기 연장 도메인은 Fcγ에 대한 결합을 방지하거나 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 FC1 영역 및/또는 FC2 영역은 EU 번호 체계에 따른 N297G 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 반감기 연장 도메인은 FcRn에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 FC1 영역 및/또는 FC2 영역은 EU 번호 체계에 따라 번호가 매겨진 M252Y, S254T 및 T256E 아미노산 치환을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 31

제4항 내지 제30항 중 어느 하나에 있어서,

상기 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 (i) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 33, 34 및 35의 CDR을 포함하는 VL 영역; 및

(ii) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 36, 37 및 38의 CDR을 포함하는 VH 영역;을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 32

제4항 내지 제31항 중 어느 하나에 있어서,

상기 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 서열번호 31의 서열과 적어도 80% 동일한 VL 영역 및 서열번호 32의 서열과 적어도 80% 동일한 VH 영역을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 FC1 및 FC2 영역은 IgG1 Fc 영역인, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

i) 상기 FC1 영역은 서열번호 42의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고 상기 FC2 영역은 서열번호 43의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 ii) 상기 FC1 영역은 서열번호 57의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고 상기 FC2 영역은 서열번호 58의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

N 말단에서 C 말단까지 다음 순서로 다음의 아미노산 서열을 포함하는 멀티-도메인 결합 분자.

a) 항-CD3 scFv의 아미노산 서열로, 선택적으로 서열번호 18에 제공된 링커 서열;

b) TCRβ가변 및 불변 영역의 아미노산 서열;

c) 서열번호 47에 제공된 링커 서열 뒤에 서열번호 44에 제공된 IgG 힌지 서열;

d) 서열번호 42에 제공된 서열을 갖는 Fc 영역;

e) 서열번호 47에 제공된 링커 서열;

f) TCRα 가변 및 불변 영역의 아미노산 서열;

g) 서열번호 47에 제공된 링커 서열 뒤에 서열번호 44에 제공된 IgG 힌지 서열; 및

h) 서열번호 43에 제공된 서열을 갖는 Fc 영역;

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항의 멀티-도메인 결합 분자를 코딩하는, 핵산.

청구항 37

제36항의 핵산을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 38

제36항의 핵산 또는 제37항의 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 39

제36항의 핵산 또는 제37항의 발현 벡터의 발현을 위한 최적 조건 하에서 제38항의 숙주 세포를 유지하는 단계;

및 멀티-도메인 결합 분자를 분리하는 단계;를 포함하는, 제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 멀티-도메인 결합 분자의 제조방법.

청구항 40

제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 멀티-도메인 결합 분자, 제36항의 핵산, 제37항의 발현 벡터 또는 제38항의 숙주 세포를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 41

의약품으로 사용하기 위한, 제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 멀티-도메인 결합 분자, 제36항의 핵산, 제37항의 발현 벡터, 제38항의 숙주 세포 또는 제40항의 약학 조성물.

청구항 42

필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 결합 분자, 제36항의 핵산, 제37항의 발현 벡터, 제38항의 숙주 세포 또는 제40항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 43

암, 자가면역 장애 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제35항 중 어느 하나의 멀티-도메인 결합 분자, 제36항의 핵산, 제37항의 발현 벡터, 제38항의 숙주 세포 또는 제40항의 약학 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 암은 PRAME 발현과 관련된, 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 서열 목록

[0002] 본 출원은 전체 내용이 참조로 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2023년 8월 2일 생성된 상기 XML 사본의 이름은 P206512WO ST.26 Sequence Listing.xml서열 목록이며, 크기는 55.32KB이다.

배 경 기 술

[0003] 항체 단편 및 융합 단백질을 포함한 많은 단백질 기반 치료제는 투여 후 체내에서 빠르게 제거된다. 이들의 짧은 순환 반감기는 일반적으로 신장 여과를 통한 효과적인 제거를 가능하게 하는 작은 크기와 세포 내 분해로부터의 보호 부족에 기인한다. 이러한 경우, 약물의 유효 농도를 장기간 유지하기 위해 빈번한 투여나 긴 주입 시간이 필요하다. 투여를 개선하기 위해 순환 반감기를 연장하는 여러 전략이 사용되어 왔다. 여기에는 탄수화물이나 PEG(폴리에틸렌 글리콜)와 같은 유연한 친수성 분자의 부착을 통한 단백질의 유체역학적 반경 증가, 항체 Fc 도메인이나 혈청 알부민의 부착을 통한 신생아 Fc 수용체(FcRn)를 통한 재순환 이용 등이 포함된다(Konnteman, Curr Opin Biotechnol. 2011 Dec;22(6):868-76).

[0004] FcRn 매개 재순환을 이용하는 전략은 체내에서 면역원성 유발 위험이 낮고 긴 반감기 연장을 달성할 수 있어 특히 매력적이다. 예를 들어, BiTE®형식의 T 세포 결합 이중특이적 항체의 반감기는 Fc 도메인 부착 후 200시간을 초과하는 것으로 보고되었다(Lorenczewski, et al., Blood 2017. 130(Suppl 1), 2815). 마찬가지로 알부민 결합 도메인을 포함하는 TriTac®형식의 이중특이적 항체는 4일 이상의 반감기를 갖는 것으로 보고되었다(Wesche et al., Cancer Res 2018;78(13 Suppl):Abstract nr 3814).

[0005] 항-CD3 항체 단편에 융합된 가용성 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는 융합 단백질은 체내 반감기가 6 내지 8시간 정도인 비교적 새로운 범주의 T 세포 결합 이중특이적 융합 단백질이다(Sato et al., 2018 J Clin Onc 2018 36, no. 15, suppl 9521-9521; Middleton et al., J Clin Onc 2016 34, no. 15, suppl 3016-3016). 이는 일반적으로 260 내지 720시간 범위의 반감기를 갖는 전통적인 단클론 항체보다 훨씬 짧다(Ovacik & Lin, 2018 Clin Transl Sci, 11:540). 또한 TCR-항-CD3 융합 단백질은 피코몰 수준의 효능을 포함한 유리한 치료 특성을 보여주었다(Lowe et al. 2019 Cancer treatment reviews, vol. 77 35-43). 따라서 투여 빈도를 줄이고 장기간 효과적

인 농도를 유지하면서 다른 치료 특성에 영향을 미치지 않도록 TCR-항-CD3 융합 단백질 및 기타 TCR 함유 단백질의 반감기를 연장하기 위한 적절한 접근법을 확인할 필요가 있다.

[0006] 전통적인 항체와는 달리 TCR은 인간 백혈구 항원(펩타이드-HLA)에 의해 세포 표면에 제시되는 세포 내 항원에서 유래한 짧은 펩타이드를 인식하도록 설계되었다. 항원 제시 세포의 펩타이드-HLA 복합체와 T 세포 사이의 효과적인 면역 시냅스 형성은 막 간 거리의 증가에 의해 교란될 수 있는 상호작용 기하학을 포함하는 균형 잡힌 에너지 발자국에 의존한다(Choudhuri et al., 2005 Nature Jul 28;436(7050):578-82; Holland et al J Clin Invest. 2020;130(5):2673--2688). 따라서 항체 Fc 도메인이나 혈청 알부민의 부착과 같은 TCR 함유 단백질의 반감기를 증가시키기 위한 융합 접근법은 TCR 결합에 필요한 상호작용 기하학을 교란시킬 위험으로 인해 매우 어렵다. 유사한 과제는 TCR-유사 또는 TCR-모방 항체로 알려진 펩타이드-HLA 복합체에 결합하는 항체를 포함하는 융합 단백질에도 적용된다.

[0007] WO 2020/157211은 면역글로불린 Fc 도메인 또는 알부민 결합 도메인에 융합하여 TCR-항-CD3 융합 단백질의 반감기를 연장하는 접근법을 기술하고 있다. 그러나 이러한 멀티-도메인 결합 분자는 크고 복잡한 단백질로, 각 도메인(및 각 도메인의 각 영역)의 위치와 방향, 그리고 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬 상의 가능한 조합에 대해 무수히 많은 가능한 형식이 존재한다. 분자 내 각 도메인(및 그 영역)의 위치와 방향, 그리고 존재하는 폴리펩타이드 사슬의 수는 활성, 반감기 및 제조 가능성과 같은 결합 분자의 특성에 영향을 줄 수 있다. 따라서 이러한 멀티-도메인 결합 분자의 유리한 형식을 확인할 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 일반적으로 멀티-도메인 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 특히 i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인; ii) 면역세포 결합(ICE) 도메인(예를 들어, 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH)을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인); 및 iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인을 포함하는 멀티-도메인 결합 분자에 관한 것으로, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성한다. 상기 결합 분자는 암, 감염성 질환 및 자가면역 질환과 같은 질병 치료에 사용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 pMHC 결합 도메인, T 세포 결합 면역 효능 도메인 및 반감기 연장 도메인을 포함하는 멀티-도메인 결합 분자에 대한 35개 이상의 서로 다른 형식(즉, 폴리펩타이드 내 각 도메인의 방향 및 위치)을 평가하였다. 이를 통해, 많은 형식에서 TCR-항-CD3 융합 단백질을 Fc 도메인에 융합하면 체외(*in vitro*)에서 효능이 상당히 감소한다는 것을 발견했다. 그러나 본 발명자들은 놀랍게도 단일 폴리펩타이드 사슬로 발현될 수 있고, 상당히 향상된 반감기를 가지며, 원래 분자의 높은 효능을 유지하는 이러한 분자의 형식을 확인하였다. 실시예 8은 또한 확인된 형식이 서로 다른 표적에 결합하는 TCR에 유리하게 작용함을 보여준다.

[0010] 제1 측면에서, 다음을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자를 제공한다.

[0011] i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인으로서, VC1 및 VC2가 이량체화하여pMHC 결합 도메인을 형성하는, 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인;

[0012] ii) 면역세포 결합(ICE) 도메인; 및

[0013] iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인으로, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성하는, 반감기 연장 도메인;

[0014] 을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자로서,

[0015] 상기 면역세포 결합(ICE) 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그의 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그의 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그의C 말단을 통해 FC2 영역의 N 말단에 연결되며,

[0016] 상기 pMHC 결합 도메인 및 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 면역 세포에 결합할 수 있다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자가 제공된다:

[0018] i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인으로서, VC1 및 VC2가 이량체화하여 상기 pMHC 결합 도메인을 형성하는, 상기 pMHC 결합 도메인;

[0019] ii) 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH)을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인; 및

[0020] iii) 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하는 반감기 연장 도메인으로서, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성하는, 상기 반감기 연장 도메인;을 포함하는, 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자로서,

[0021] 상기 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그 C 말단을 통해 FC2 영역의 N 말단에 연결되며,

[0022] 상기 pMHC 결합 도메인 및 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 T 세포에 결합할 수 있다.

[0023] 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자를 제공한다.

[0024] i) 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변 영역 및 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 가용성 TCR로서, VC1은 서열번호 16에 제공된 아미노산 서열을 갖는 TCRβ 가변 및 불변 영역, 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하고, VC2는 서열번호 14에 제공된 아미노산 서열을 갖는 TCRα 가변 및 불변 영역, 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는, 상기 가용성 TCR;

[0025] ii) 서열번호 31에 제공된 아미노산 서열을 갖는 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL), 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열 및 서열번호 32에 제공된 아미노산 서열을 갖는 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH), 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 항-CD3 scFv; 및

[0026] iii) 서열번호 42에 제공된 아미노산 서열을 갖는 제1 IgG Fc 영역(FC1), 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열, 및 서열번호 43에 제공된 아미노산 서열을 갖는 제2 IgG Fc 영역(FC2), 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 반감기 연장 도메인으로서, 상기 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성하는, 상기 반감기 연장 도메인;

[0027] 여기서 상기 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그 C 말단을 통해 FC2 영역의 N 말단에 연결되고,

[0028] 상기 pMHC 결합 도메인 및 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 T 세포에 결합할 수 있다.

[0029] 다른 측면에서, 본 발명은 서열번호 45에 제공되는 아미노산 서열을 포함하는 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자를 제공한다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 멀티-도메인 결합 분자를 코딩하는 핵산을 제공한다. 또한 본 발명은 이 측면의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명은 이 측면의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 숙주 세포를 핵산 발현에 최적인 조건에서 유지하는 단계; 및 멀티-도메인 결합 분자를 분리하는 단계;를 포함하는, 멀티-도메인 결합 분자 제조 방법을 제공한다.

[0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 멀티-도메인 결합 분자를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 측면들의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물은 암, 감염성 질환 및 자가면역 질환과 같은 질병 치료에 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약품으로 사용하기 위한 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 환자에게 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0034] 펩타이드-주조직 적합성 복합체(pMHC) 결합 도메인

[0035] 본 명세서에서 사용되는 “pMHC 결합 도메인”은 펩타이드-MHC 복합체에 결합할 수 있는 단백질 도메인이다. 불변 영역(VC1)에 연결된 제1 가변영역과 또 다른 불변 영역(VC2)에 연결된 제2 가변영역은 이량체화되어 pMHC 결합 도메인을 형성한다. 여기서 “VC1”은 불변 영역에 연결된 제1 가변 영역을 포함하는 pMHC 결합 도메인 서열의 영역을 의미하고, “VC2”는 불변 영역에 연결된 제2 가변 영역을 포함하는 영역을 의미한다. pMHC 결합 부위는 VC1와 VC2의 가변 영역 내에 있다. 적절한 가변 및 불변 영역 서열에는 TCR 또는 항체 가변 및 불변 영역이 포함된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "MHC" 및 "HLA"는 서로 교환 가능하게 사용된다.

[0036] pMHC 결합 도메인은 TCRα 및 TCRβ사슬의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, VC1 및 VC2의 가변 영역은 TCR 가변 영역일 수 있다. VC1은 TCRα 또는 TCRβ가변 영역 중 하나를 포함할 수 있고 VC2는 TCRα 및 TCRβ가변 영역 중 나머지 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어:

[0037] (i) VC1은 (a) TCRα 가변 및 불변 영역 또는 (b) TCRβ가변 및 불변 영역 중 하나를 포함할 수 있고;

[0038] (ii) VC2는 (a) 또는 (b) 중 나머지 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는, VC1이 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함하고 VC2가 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함한다.

[0039] pMHC 결합 도메인은 TCR 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 가용성 TCR일 수 있다. 본 명세서에 정의된 TCR 서열은 TCR 분야에서 일하는 사람들에게 널리 알려져 있고 접근 가능한 IMGT 명명법을 참조하여 설명된다. 예를 들어, 다음을 참조한다: LeFranc and LeFranc, (2001). "T cell Receptor Factsbook", Academic Press; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc 2011 (6): 595-603; Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1 : Appendix 100; 및 Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266. 간단히 말해서, TCR은 두 개의 이황화 결합된 사슬로 구성된다. 각 사슬(알파 및 베타)은 일반적으로 가변 영역과 불변 영역이라는 두 개의 세포 외 영역을 갖는 것으로 간주된다. 짧은 연결 영역이 가변 영역과 불변 영역을 연결하며 일반적으로 알파 가변 영역의 일부로 간주된다. 또한, 베타 사슬은 일반적으로 연결 영역 옆에 짧은 다양성 영역을 포함하며, 이 역시 일반적으로 베타 가변 영역의 일부로 간주된다. 일반적인 TCR의 각 사슬의 가변 영역은 N-말단에 위치하며 골격 서열에 포함된 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. CDR은 펩타이드-MHC 결합을 위한 인식 부위를 포함한다.

[0040] 대안적으로, pMHC 결합 도메인은 항체의 가변 영역을 포함할 수 있다. VC1 및 VC2 가변 영역은 항체 중쇄 또는 경쇄 가변 영역일 수 있다. 예를 들어, VC1은 중쇄 또는 경쇄 항체 가변 영역 중 하나를 포함할 수 있고 VC2는 중쇄 또는 경쇄 항체 가변 영역 중 나머지 하나를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, pMHC 결합 도메인은 TCR-유사 항체, "TCR 모방 항체"(TCRm-Ab)로도 알려진 항체일 수 있다. 예를 들어, pMHC 결합 도메인은 TCR-유사 항체의 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체는 자연적으로 pMHC 복합체를 인식하지 않는다. 그러나 pMHC에 대한 특이성을 갖는 항체를 설계할 수 있다는 것이 알려져 있으며, 이는 Chang et al., Expert Opin Biol Ther. 2016 Aug;16(8):979-87 및 Dahan et al., Expert Rev Mol Med. 2012 Feb 24;14:e6에 기술되어 있다.

[0041] pMHC 결합 도메인은 적어도 하나의 면역글로불린 불변 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어 VC1 및 VC2의 불변 영역은 면역글로불린 불변 영역일 수 있다. 불변 영역은 TCRα 사슬 또는 TCRβ사슬(각각 TRAC 또는 TRBC)의 불변 영역에 해당할 수 있다. 대안적으로 pMHC 결합 도메인의 불변 영역은 항체 경쇄 또는 중쇄(CL, CH1, CH2, CH3 또는 CH4)의 불변 영역일 수 있다. 불변 영역은 전장일 수 있거나 절단될 수 있다. TCR 불변 영역은 막 관통 도메인과 세포질 꼬리를 제거하도록 절단될 수 있다. 불변 영역이 절단되는 경우, 바람직하게는 C-말단 끝에서 막 관련 부분과 세포질 부분만 제거된다. pMHC 결합 도메인이 TCRα 또는 TCRβ사슬 서열을 포함하는 경우, VC1 및 VC2는 각각 TCR 가변 영역과 TCR 불변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, VC1 및 VC2는 막 관통 도메인 또는 세포질 도메인을 포함하지 않는다. 즉, 바람직하게는 pMHC 결합 도메인은 가용성이다. 천연 불변 영역에 대비하여 아미노산 서열의 추가 돌연변이가 불변 영역에 도입될 수 있다. 불변 영역은 또한 자연적으로 발생하거나 도입된 잔기를 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어 두 개의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의한 이량체화를 가능하게 한다.

[0042] 존재하는 경우, 본 발명의 분자의 TCR 부분은 αβ이종이량체일 수 있다. 본 발명의 분자의 알파-베타 이종이량체 TCR 부분은 알파 사슬 TRAC 불변 영역 서열 및/또는 베타 사슬 TRBC1 또는 TRBC2 불변 영역 서열을 포함할 수 있다. 위에서 설명한 바와 같이, 불변 영역은 가용성 형식(즉, 막 관통 도메인 또는 세포질 도메인이 없음)일 수 있다. 하나 또는 둘 모두의 불변 영역은 천연 TRAC 및/또는 TRBC1/2 서열에 대해 돌연변이, 치환 또는 결실을 포함할 수 있다. TRAC 및 TRBC1/2라는 용어는 또한 천연 다형성 변이체를 포함하며, 예를 들어 TRAC의 위

치 4에서 N에서 K로의 변이(Bragado et al International immunology. 1994 Feb;6(2):223-30)를 포함한다.

[0043] 알파 및 베타 사슬 불변 영역 서열은 TRAC의 엑손 2의 Cys4와 TRBC1 또는 TRBC2의 엑손 2의 Cys2 사이의 천연 이황화 결합을 제거하기 위해 절단 또는 치환에 의해 수정될 수 있다. 알파 및/또는 베타 사슬 불변 영역 서열은 각각의 불변 도메인의 잔기 사이에 도입된 이황화 결합을 가질 수 있으며, 예를 들어 WO 2003/020763, WO 2004/033685 및 WO 2006/000830, 그리고 예를 들어 미국 특허 번호 7,329,731, 7,569,664 및 8,361,794에 기술된 바와 같으며, 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다. 알파 및 베타 불변 영역은 TRAC의 Thr 48(트레오닌 48) 위치와 TRBC1 또는 TRBC2의 Ser 57(세린 57) 위치에서 시스테인 잔기로의 치환에 의해 수정될 수 있으며, 상기 시스테인은 TCR의 알파 및 베타 불변 영역 사이에 이황화 결합을 형성한다. TRBC1 또는 TRBC2는 추가적으로 불변 도메인의 75 위치에서 시스테인을 알라닌으로 돌연변이시키고 불변 도메인의 89 위치에서 아스파라긴을 아스파르트산으로 돌연변이시킬 수 있다. αβ이종이량체에 존재하는 하나 또는 둘 모두의 세포 외 불변 영역은 C 말단 또는 C 말단들에서 최대 15, 또는 최대 10, 또는 최대 8 또는 그 이하의 아미노산만큼 절단될 수 있다. 알파 사슬 세포 외 불변 영역의 C 말단은 8개의 아미노산만큼 절단될 수 있다.

[0044] VC1 및 VC2 가변 및 불변 영역의 아미노산 서열은 자연에서 발견되는 것에 해당하거나, 천연 단백질에 대비하여 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는 SLLQHLIGL(서열번호 1) HLA-A*02 복합체에 대한 pMHC 결합 도메인의 친화도를 증가시키기 위해 만들어질 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 안정성과 제조 가능성을 개선하기 위해 돌연변이가 도입될 수 있다. VC1 및 VC2 서열은 인간 서열에서 유래할 수 있다.

[0045] VC1 및 VC2 서열은 VC1과 VC2 사이에 비천연 이황화 결합을 형성하기 위해 불변 영역에 하나 이상의 설계된 시스테인 잔기를 포함할 수 있다. 각각의 불변 영역의 잔기 사이에 이황화 결합을 도입하기 위한 적절한 위치는 WO 2003/020763 및 WO 2004/033685에 기술되어 있다. 단일 사슬 TCR은 WO2004/033685; WO 98/39482; WO01/62908; Weidanz et al. (1998) J Immunol Methods 221 (1 -2): 59-76; Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763; Schodin (1996) Mol Immunol 33(9): 819-829)에 더 자세히 기술되어 있다.

[0046] VC1은 TCRα 또는 TCRβ가변 영역을 포함할 수 있고 VC2는 TCRα 및 TCRβ가변 영역 중 나머지 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는:

[0047] (i) TCRα 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 각각 서열번호 3, 4 및 5의 CDR을 포함하고;

[0048] (ii) TCRβ가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 각각 서열번호 9, 10 및 11의 CDR을 포함한다.

[0049] 대안적으로, TCRα 및 TCRβ CDR 서열은 각각 선택적으로 상기 나열된 서열에 대해 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 가질 수 있다.

[0050] TCRα 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 서열번호 3, 4 및 5의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있고/있거나 TCRβ가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 서열번호 9, 10 및 11과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있다.

[0051] TCRα 가변 영역은 서열번호 3, 4 및 5의 서열에 해당하는 CDR을 포함하고 서열번호 27, 6, 7 및 28의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 FR(framework region, 골격 영역)을 포함할 수 있고/있거나 TCRβ가변 영역은 서열번호 9, 10 및 11의 서열에 해당하는 CDR을 포함하고 서열번호 29, 12, 13 및 30의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 FR을 포함할 수 있다.

[0052] TCRα 가변 영역은 서열번호 2의 서열과 적어도 80% 동일할 수 있고 TCRβ가변 영역은 서열번호 8의 서열과 적어도 80% 동일할 수 있다. TCRα 가변 영역은 서열번호 2의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일할 수 있고 TCRβ가변 영역은 서열번호 8의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일할 수 있다. 바람직하게는, TCRα 가변 영역은 서열번호 2에 제공되는 서열을 가지고 TCRβ가변 영역은 서열번호 8에 제공되는 서열을 갖는다.

[0053] VC1은 TCRα 또는 TCRβ불변 영역을 포함할 수 있고 VC2는 TCRα 및 TCRβ불변 영역 중 다른 하나를 포함할 수 있다. TCRα 불변 영역은 서열번호 15의 서열과 적어도 80% 동일할 수 있고 TCRβ불변 영역은 서열번호 19의 서열과 적어도 80% 동일할 수 있다. TCRα 불변 영역은 서열번호 15의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일할 수 있고 TCRβ불변 영역은 서열번호 19의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일할 수 있다. 바람직하게는, TCRα 불변 영역은 서열번호 15에 제공되는 서열을 가지고 TCRβ불변 영역은 서열번호 19에 제공되는 서열을 갖는다.

[0054] VC1은 TCRα 가변 및 불변 영역 또는 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함할 수 있고 VC2는 TCRα 및 TCRβ가변 및

불변 영역 중 다른 하나를 포함할 수 있다. TCRα 가변 및 불변 영역은 서열번호 14의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고 TCRβ가변 및 불변 영역은 서열번호 16의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. TCRα 가변 및 불변 영역은 서열번호 14의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고 TCRβ가변 및 불변 영역은 서열번호 16의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 바람직하게는, TCRα 가변 및 불변 영역은 서열번호 14에 제공되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고 TCRβ가변 및 불변 영역은 서열번호 16에 제공되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0055] 숙련된 사람은 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 형식이 위에 나열된 것 이외의 TCR 서열에도 동등하게 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 다른 적절한 TCR 사슬 아미노산 서열은 WO2011001152, WO2017109496, WO2017175006 및 WO2018234319에 제공되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 8,519,100, 11,639,374, 11,505,590 및 11,427,624에 제공되어 있으며, 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0056] 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 단백질 분자는 번역 후 변형 (post-translational modification)을 받을 수 있다. 글리코실화는 이러한 변형 중 하나로, TCR 또는 항체 사슬의 정의된 아미노산에 올리고당 잔기의 공유 결합 부착을 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴 잔기 또는 세린/트레오닌 잔기는 올리고당 부착의 잘 알려진 위치이다. 특정 단백질의 글리코실화 상태는 단백질 서열, 단백질 구조 및 특정 효소의 가용성을 포함한 여러 요인에 따라 달라진다. 또한 글리코실화 상태(즉, 올리고당 유형, 공유 결합 및 총 부착 수)는 단백질 기능에 영향을 줄 수 있다. 따라서 재조합 단백질을 생산할 때 글리코실화를 제어하는 것이 종종 바람직하다. 제어된 글리코실화는 항체 기반 치료제를 개선하는 데 사용되었다. (Jefferis et al., (2009) Nat Rev Drug Discov Mar;8(3):226-34.). 글리코실화는 특정 세포주 사용(예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 인간 배아 신장(HEK) 세포와 같은 포유동물 세포주를 포함하되 이에 국한되지 않음)에 의해 또는 화학적 변형에 의해 제어될 수 있다. 이러한 변형은 글리코실화가 약동학을 개선하고 면역원성을 감소시키며 천연 인간 단백질을 더 밀접하게 모방할 수 있기 때문에 바람직할 수 있다(Sinclair and Elliott, (2005) Pharm Sci.Aug; 94(8):1626-35). 대안적으로, 글리코실화는 치료 분자에 바람직하지 않은 제조의 일관성 부족으로 이어질 수 있다. 아스파라긴과 같은 글리코실화의 위험이 있는 잔기는 글루타민 잔기로 대체할 수 있다.

[0057] VC1 및/또는 VC2는 하나 이상의 글루코실화 부위를 제거하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이 맥락에서의 치환은 천연(예: 야생형) 서열 또는 변형되지 않은 서열에 대비한 것이다. 예를 들어:

[0058] (i) VC1 또는 VC2는 서열번호 14에 따라 번호가 매겨진 N24, N148, N182 및 N193로 이루어진 군에서 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함할 수 있고/있거나;

[0059] (ii) VC1 및 VC2 중 나머지 하나는 서열번호 16에 따라 번호가 매겨진 N184 위치에서 아미노산 치환을 포함하는 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함할 수 있다. 치환은 Asn에서 Gln(즉, N에서 Q)으로의 치환일 수 있다. 바람직하게는, TCRα 가변 및 불변 영역은 서열번호 14에 따라 번호가 매겨진 N24Q, N148Q, N182Q 및 N193Q 치환을 포함하고, TCRβ가변 및 불변 영역은 서열번호 16에 따라 번호가 매겨진 N184Q 치환을 포함한다.

[0060] pMHC 결합 도메인은 완전히 탈글리코실화되지 않을 수 있다. 즉, pMHC는 천연 서열에서 하나 이상의 글리코실화 부위를 유지할 수 있다. 예를 들어, pMHC 결합 도메인은 단일 글리코실화 부위에서 글리코실화될 수 있다(즉, pMHC 결합 도메인은 하나의 글리코실화 부위만 포함할 수 있다). 단일 글리코실화 부위는 VC1 또는 VC2의 가변 영역에 있을 수 있다. 단일 글리코실화 부위는 서열번호 16에 따라 번호가 매겨진 TCRβ가변 영역의 N18 위치에 있을 수 있다. 유리하게도, 본 발명자들은 이 단일 글리코실화 부위를 갖는 멀티-도메인 결합 단백질이 다른 글리코실화 및/또는 탈글리코실화 변이체와 비교하여 더 나은 제조 가능성(예: 단백질 생산 수율, 열 스트레스 및 응집에 대한 저항성)을 가지며, 동시에 펩타이드-MHC 결합에 대한 친화도와 표적 세포 살해의 효능을 유지한다는 것을 확인하였다.

[0061] pMHC 결합 도메인은 펩타이드 항원과 복합체로 MHC에 결합한다. 펩타이드 항원은 질병 관련 항원일 수 있다. pMHC 결합 도메인은 MHC와 복합체로서 종양연관항원 펩타이드에 결합할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 항원은 WO2011001152, WO2017109496, WO2017175006 및 WO2018234319에 기재된 대로 GP100, NYESO, MAGEA4 또는 PRAME에서 유래된 펩타이드일 수 있다. 종양연관항원(TAA)은 PIWIL1일 수 있다. 예를 들어, pMHC 결합 도메인은 SLSNRLYYL(서열번호:56) HLA-A*02 복합체에 결합할 수 있다. 종양연관항원(TAA)은 PRAME일 수 있다. 바람직하게는, pMHC 결합 도메인은 SLLQHLIGL (서열번호: 1) HLA-A*02 복합체에 결합한다.

[0062] 면역세포 결합 도메인

[0063] 본 명세서에서 사용되는 "면역세포 결합 도메인"은 면역 세포 상의 표적에 결합할 수 있고/거나 면역 반응을 수정할 수 있는 단백질 도메인으로, 예를 들어 T 세포 활성화와 같이 면역 반응을 촉진하거나 억제한다. 면역세포 결합 도메인은 본 명세서에서 "ICE" 도메인이라고 지칭된다.

[0064] 일부 구현예에서, 면역세포 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(ICE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(ICE-VH)을 포함한다. 본 명세서에서 "ICE-VL" 및 "ICE-VH"는 각각 면역세포 결합 도메인의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 지칭한다. "ICE-VL" 및 "ICE-VH"는 본 명세서에서 각각 "ICEVL" 및 "ICEVH"로도 지칭될 수 있다. 따라서, 면역세포 결합 도메인은 항원-결합 부위를 포함할 수 있다. 항체는 또한 단일 도메인 항체("ICE-SD"), 예를 들어 중쇄 항체의 가변 영역(예: VHH)일 수 있다.

[0065] 면역세포 결합 도메인은 T 세포 결합 면역 효능 도메인일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "T 세포 결합 면역 효능 도메인"은 면역 반응을 촉진하기 위해 T 세포 상의 표적에 결합할 수 있는 단백질 도메인이다. T 세포 결합 면역 효능 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(TCE-VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(TCE-VH)을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 "TCE-VL" 및 "TCE-VH"는 각각 T 세포 결합 면역 효능 도메인의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 지칭한다. "TCE-VL" 및 "TCE-VH"는 본 명세서에서 각각 "TCEVL" 및 "TCEVH"로도 지칭될 수 있다. T 세포 결합 면역 효능 도메인은 T 세포의 활성화를 촉진하기 위해 T 세포의 세포 표면에 발현되는 단백질에 결합할 수 있다. 예를 들어, T 세포 결합 면역 효능 도메인은 CD3 효능 도메인일 수 있다. T 세포 결합 면역 효능 도메인은 CD3에 결합할 수 있으며, 예를 들어 특이적으로 결합할 수 있다(즉, T 세포 결합 면역 효능 도메인은 CD3-결합 단백질일 수 있다). T 세포 결합 면역 효능은 항체, 또는 그 기능적 단편, 예를 들어 단일 사슬 가변 단편(scFv), 또는 유사한 크기의 항체 유사 스캐폴드, 또는 CD3 및/또는 TCR/CD3 복합체와의 상호작용을 통해 T 세포를 활성화시키는 다른 결합 단백질일 수 있다. 항체는 또한 중쇄 항체의 가변 영역(예: VHH)과 같은 단일 도메인 항체일 수도 있다.

[0066] 대안적으로, 면역세포 결합 도메인은 면역 억제제일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "면역 억제제"라는 용어는 면역 반응을 억제할 수 있는 모든 분자, 예를 들어 단백질을 의미하며, 예를 들어 T 세포 활성화를 억제한다. 면역 억제제는 표적(예: 항원)에 결합할 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제는 면역 관문 작용제, 즉 면역 관문 신호전달을 유도하는 분자일 수 있다. 면역 억제제는 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 모이어티를 포함할 수 있다. 면역 억제제의 항원은 T 세포와 같은 면역 세포에 위치할 수 있다. 결합 분자는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 항체는 중쇄 항체의 가변 영역과 같은 단일 도메인 항체일 수도 있다. 대안적으로, 항체는 단일 사슬 가변 단편(scFv), 또는 유사한 크기의 항체 유사 골격, 또는 면역 관문 신호전달 유도를 통해 T 세포를 억제하는 다른 결합 단백질일 수 있다. 이러한 면역 억제제는 아래에 설명되어 있다.

[0067] 면역세포 결합 도메인은 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 모이어티를 포함할 수 있다. 면역세포 결합 도메인의 항원은 T 세포와 같은 면역 세포에 위치할 수 있다. 결합 분자는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "항체"라는 용어는 기능적 항체 단편, 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체 및 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함하는 기존의/자연적 항체 및 엔지니어링된 항체를 의미한다. 이 맥락에서 "자연적" 또는 "기존"은 자연에서 발견되는 항체와 동일한 유형의 도메인과 도메인 배열을 가지고 항체 유래 CDR 및 FR 서열을 포함하는 항체를 의미한다. 기존 4사슬, 예를 들어, 인간, 항체, 두 개의 중쇄가 이황화 결합에 의해 서로 연결되고 각 중쇄는 이황화 결합에 의해 경쇄에 연결된다. 경쇄(VL)와 중쇄(VH) 모두의 가변 도메인은 항원에 대한 결합 인식과 특이성을 결정한다. 기존 항체 결합 부위는 주로 "항체 상보성 결정 영역"(CDR) 또는 과변이 영역에서 나온 잔기로 구성된다. 때때로, 비-과변이 또는 골격 영역(FR)의 잔기가 전체 도메인 구조 및 따라서 결합 부위에 영향을 미친다. CDR은 자연 항체 결합 부위의 결합 친화도와 특이성을 함께 정의하는 아미노산 서열을 의미한다. 기존 4사슬 항체의 경쇄와 중쇄는 각각 세 개의 CDR을 가지며, 각각 CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L 및 CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H로 지정된다. 따라서 기존 4사슬 항체 항원-결합 부위는 VH 및 VL 각각의 CDR 세트를 포함하는 여섯 개의 CDR을 포함한다.

[0068] "엔지니어링된" 항체 형식은 기능적 항체 단편, 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체 및 키메릭, 인간화, 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 포함한다. 엔지니어링된 항체 형식은 TCR 유래 CDR, 가능하게는 추가적인 3, 2 또는 1 N 및/또는 C 말단 골격 잔기, 또는 전체 TCR 유래 가변 도메인이 항체 중쇄 또는 경쇄에 이식된 구조를 더 포함한다. "기능적 항체 단편"은 전체 길이 항체의 일부분, 또는 전체 길이 항체의 일부분과 유사한 단백질을 의미하며, 이들은 특히 전체 길이 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역인 표적 항원에 결합하는 능력을 유지

한다. 기능적 항체 "단편"의 예로는 Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, (dsFv)2, scFv, sc(Fv)2 및 이량항체가 있다. 예를 들어, 본 발명의 결합 분자는 scFv를 포함할 수 있다.

[0069] 항체는 또한 중쇄 항체의 가변 영역과 같은 단일 도메인 항체일 수 있다. 이와 관련하여, "단일 도메인 항체"라는 용어는 단일 항체 가변 도메인(예: 중쇄 가변 도메인)으로 구성된 항체를 의미한다. 따라서, 면역세포 결합 도메인은 예를 들어 VHH(즉, 중쇄 항체의 가변 도메인)를 포함할 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, VHH와 같은 단일 도메인 항체의 항원 결합 부위는 세 개의 CDR(기존 4사슬 항체의 여섯 개와 대조적으로)을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "항체의 항원 결합 모이어티"라는 용어는 이러한 결합 부위를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 결합 분자는 Fab 또는 Fv 단편을 포함할 수 있다. "Fab"("단편 항원-결합")라는 용어는 항체 경쇄(VL-CL)와 항체 중쇄의 가변 및 CH1 도메인(VH-CH1)을 포함하는 항체의 항원-결합 단편을 의미한다. Fab 단편은 일반적으로 약 50,000 Da의 분자량을 가진다. Fv 단편은 항체의 Fab 단편의 N-말단 부분이며 하나의 경쇄(VL)와 하나의 중쇄(VH)의 가변 부분으로 구성된다.

[0070] 면역세포 결합 도메인은 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 모이어티를 형성하기 위해 결합하는 항체 중쇄 가변 영역(VH)와 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다. 따라서 항원 결합 모이어티는 VH와 VL을 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역세포 결합 도메인은 VH와 VL을 포함하는 scFv를 포함할 수 있다.

[0071] 다른 적절한 항원 결합 모이어티로는 중쇄 항체(hcAb), 단일 도메인 항체(sdAb), 미니바디(Tramontano et al (1994) J. Mol. Recognition 7, 9-24), 낙타과 중쇄 항체의 가변 도메인(VHH), 새로운 항원 수용체의 가변 도메인(VNAR), 어피바디(Nygren P.A. (2008) FEBS J. 275, 2668-2676), 알파바디(WO2010066740 참조), 설계된 앵키린-반복 도메인(DARPin)(Stumpp et al (2008) Drug Discovery Today 13, 695-701), 안티칼린(Skerra et al (2008) FEBS J. 275, 2677-2683), 노틴(Kolmar et al (2008) FEBS J. 275, 2684-2690) 및 엔지니어링된 CH2 도메인(나노항체, Dimitrov DS (2009) mAbs 1, 26-28 참조)이 있다.

[0072] 항원 결합 모이어티는 각각 네 개의 골격 영역(각각 FR1내지 FR4)과 세 개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1내지 CDR3)을 포함, 구성 또는 본질적으로 구성하는 중쇄 가변 도메인이거나 이를 포함할 수 있다, 또한 그러한 중쇄 가변 도메인(항원 결합 부위를 유지하는)의 적절한 단편일 수 있다. 항원 결합 모이어티는 기존 4사슬 항체에서 유래된 항체의 중쇄 가변 도메인 서열일 수 있으며, 이는 제한 없이, 인간 항체에서 유래된 VH 서열과 같은 것이다. 바람직하게는, 항원 결합 모이어티는 VHH(본 명세서에서 "VHH 도메인"이라고도 함)와 같은 중쇄 항체(예: 낙타과 항체)의 가변 도메인이거나 이를 포함한다. 바람직하게는, 항원 결합 모이어티는 VHH이다.

[0073] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 면역세포 결합 도메인은 면역 세포에 위치한 항원에 결합하는 항원 결합 모이어티(예: 항체 항원 결합 모이어티)를 포함할 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "면역 세포"는 예를 들어 T 세포나 B 세포를 의미할 수 있다. 특히, 항원-결합 모이어티의 항원은 T 세포 표면 항원일 수 있다.

[0074] 면역세포 결합 도메인은 단일 사슬 가변 단편(scFv)일 수 있다. "단일 사슬 Fv"는 또한 "sFv" 또는 "scFv"로 약칭되며, 이는 단일 폴리펩타이드 사슬로 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. scFv 폴리펩타이드는 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 더 포함할 수 있다. scFv에 대한 리뷰는 Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)를 참조한다.

[0075] 면역세포 결합 도메인은 CD3 작동자일 수 있다. CD3 작동자는 항-CD3 항체 또는 항체 단편을 포함하지만 이에 국한되지 않으며, 특히 항-CD3 scFv 또는 항체 유사 골격이다. 면역세포 결합 도메인은 T 세포 결합 면역 효능 도메인일 수 있으며, 이는 항-CD3 scFv일 수 있다. 추가 면역 작동자는 T 세포 상의 항원에 결합하는 단편, 유도체 및 변이체를 포함하는(이에 국한되지 않음) 항체를 포함한다. 그러한 항원으로는 CD28, 4-1bb(CD137) 또는 CD16 또는 면역 시냅스에서 효과를 발휘하는 모든 분자가 있다. 특히 바람직한 면역 작동자는 항-CD3 항체, 또는 상기 항-CD3 항체의 기능적 단편이나 변이체이다. 본 명세서에서 사용되는 "항체"라는 용어는 그러한 단편과 변이체를 포함한다. 항-CD3 항체의 예로는 OKT3, UCHT-1, BMA-031 및 12F6이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 본 명세서에 설명된 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 항체 단편 및 변이체/유사체에는 미니바디, Fab 단편, F(ab')~2~ 단편, dsFv 및 scFv 단편이 포함된다.

[0076] 바람직하게는, 면역세포 결합 도메인은 다음을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인이다:

[0077] (i) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 33, 34 및 35의 CDR을 포함하는 VL 영역; 및

[0078] (ii) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 36, 37 및 38의 CDR을 포함하는 VH 영역.

[0079] 대안적으로, 면역세포 결합 도메인은 다음을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인일 수 있다:

[0080] (i) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 33, 34 및 35의 CDR을 포함하는 VL 영역; 및

[0081] (ii) 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 48, 37 및 38의 CDR을 포함하는 VH 영역.

[0082] 위의 VL 및 VH CDR 서열은 각각 선택적으로 위에 나열된 서열에 대하여 하나, 둘, 셋 또는 넷의 아미노산 치환을 가질 수 있다.

[0083] TCE-VL은 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 33, 34 및 35의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있고/있거나 TCE-VH는 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 36, 37 및 38의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있다.

[0084] 대안적으로, TCE-VL은 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 33, 34 및 35의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있고/있거나 TCE-VH는 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 서열번호 48, 37 및 38의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있다.

[0085] TCE-VL은 서열번호 31의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, TCE-VH는 서열번호 32의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. TCE-VL은 서열번호 31의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, TCE-VH는 서열번호 32의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 바람직하게는, TCE-VL은 서열번호 31에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, TCE-VH는 서열번호 32에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0086] 대안적으로, TCE-VL은 서열번호 31의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, TCE-VH는 서열번호 41의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. TCE-VL은 서열번호 31의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, TCE-VH는 서열번호 41의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 예를 들어, TCE-VL은 서열번호 31에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, TCE-VH는 서열번호 41에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0087] 위에서 설명한 바와 같이, 면역세포 결합 도메인 또는 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 scFv일 수 있다. 면역세포 결합 도메인 또는 T 세포 결합 면역 효능 도메인은 서열번호 17 또는 40의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 scFv일 수 있다. scFv는 서열번호 17 또는 40의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 바람직하게는, scFv는 서열번호 17에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 대안적으로, scFv는 서열번호 40에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0088] 면역세포 결합 도메인은 대안적으로 면역 억제제일 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제의 표적은 PD-1(프로그램된 사멸 1 수용체), A2AR(아데노신 A2A 수용체), A2BR(아데노신 A2B 수용체), B7-H3(B7 동족체 3, CD276이라고도 함) B7-H4(B7 동족체 4, VTCN1이라고도 함), BTLA(B 및 T 림프구 감쇠제, CD272라고도 함), CTLA-4(세포독성 T-림프구-관련 단백질 4, CD152라고도 함), IDO(인돌레아민 2,3-디옥시게나아제), CD200 수용체, KIR(킬러 세포 면역글로불린 유사 수용체), TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 가진 T 세포 면역수용체), LAG3(림프구 활성화 유전자-3), NOX2(나이코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드 인산 NADPH 산화효소 동형 2), TIM-3(T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3), VISTA(V-도메인 Ig T 세포 활성화 억제제), SIGLEC7(시알산-결합 면역글로불린 유형 렉틴 7, CD328이라고도 함) 및 SIGLEC9(시알산-결합 면역글로불린 유형 렉틴 9, CD329라고도 함)과 같은 면역 관문 분자일 수 있다.

[0089] 이와 관련하여, 면역 억제제는 위의 면역 관문 분자 중 하나 이상의 작용제일 수 있다. 따라서, 면역 억제제는 면역 관문 작용제(즉, 면역 활성화를 억제하기 위한)일 수 있다. 자연 리간드 및 항체를 포함한 적절한 면역 관문 작용제는 예를 들어 Paluch et al Front Immunol, 2018, 9:2306에서 리뷰되어 있다.

[0090] 항체의 항원 결합 모이어티를 포함하는 대신, 면역 억제제는 수용체-리간드 쌍 중 하나를 포함할 수 있으며, 이를 통해 면역 억제제는 수용체-리간드 쌍의 다른 하나에 결합할 수 있다. 표적 리간드 또는 수용체는 면역 세포에 위치할 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제는 위에서 설명한 면역 관문 분자의 리간드를 포함할 수 있다. 특히, 면역 억제제는 PD-1에 결합할 수 있는 PD-L1의 일부분(예: 가용성 세포외 영역)을 포함할 수 있다. 그러

한 면역 억제제는 PD-1에 결합하여 면역 세포에 관여하고 PD-1 신호전달을 자극할 수 있다.

[0091] 대안적으로, 면역 억제제는 면역 관문 분자에 결합하고 그 신호전달을 자극할 수 있는 작용제 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제는 PD-1 작용제 항체(예: 단일 도메인 항체)이거나 이를 포함할 수 있다. 그러한 PD-1 작용제는 바람직하게는 PD-1에 대한 결합을 위해 PD-L1과 경쟁하지 않는다. PD-1 작용제는 전체 길이 항체 또는 그 단편, 예를 들어 scFv 항체 또는 Fab 단편, 또는 단일 도메인 항체일 수 있다. 그러한 항체의 예는 WO2011110621, WO2010029434 및 WO2018024237에 제공되어 있다. 따라서 면역 억제제의 항원은 PD-1일 수 있고 면역 억제제의 항원 결합 모이어티는 PD-1 작용제일 수 있다. 면역 억제제의 항원 결합 모이어티는 선택적으로 VHH인 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 면역 억제제는 PD-1 작용제 VHH일 수 있다.

[0092] 위에서 설명한 바와 같이, 면역 억제제는 PD-1 작용제일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "PD-1 작용제"라는 용어는 PD-1에 결합하고 PD-1 신호전달을 활성화할 수 있는 모든 분자를 의미하며, 여기에는 예를 들어 PD-1 리간드인 PD-L1 및 PD-1 작용제 항체가 포함된다. PD-1 경로의 활성화는 면역 활동을 하향 조절하고, 말초 면역 관용을 촉진하며 자가면역을 방지한다(Keir et al., Annu Rev Immunol, 26:677-704, 2008; Okazaki et al., Int Immunol 19:813-824, 2007).

[0093] 반감기 연장 도메인

[0094] 본 명세서에서 사용되는 "반감기 연장 도메인"은 반감기 연장 도메인이 없는 멀티-도메인 결합 단백질에 비해 멀티-도메인 결합 단백질의 반감기를 연장하기 위한 단백질 도메인을 의미한다. 반감기 연장 도메인은 제1 IgG Fc 영역(FC1) 및 제2 IgG Fc 영역(FC2)을 포함하며, 여기서 FC1 영역 및 FC2 영역은 이량체화하여 Fc 도메인을 형성한다. 본 명세서에서 "Fc 영역"이라는 용어는 적어도 CH2 도메인과 CH3 도메인 서열을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬의 영역을 지칭하는 반면, "Fc 도메인"이라는 용어는 두 Fc 영역(즉, FC1 및 FC2)의 이량체를 지칭한다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 "반감기"라는 용어는 결합 분자의 약동학적 특성을 의미하며, 이는 투여 후 결합 분자의 평균 생존 시간의 척도이다. 결합 분자 반감기는 투여 후 환자의 체내(또는 다른 포유동물) 또는 그 특정 구획에서, 예를 들어 혈청에서 측정된 결합 분자의 알려진 양의 50%를 제거하는 데 필요한 시간으로 표현될 수 있으며, 즉 순환 반감기 또는 다른 조직의 반감기로 표현될 수 있다.

[0096] 반감기 증가는 환자에게 투여되는 약물의 양을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 투여 빈도도 줄일 수 있다. 반감기 증가는 예를 들어 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환이나 상태 치료에 유익할 수 있다. Fc와 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관련된 것으로 확인된 아미노산 잔기를 수정함으로써 반감기가 증가된 결합 분자를 생성할 수도 있다. FcRn에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 수정을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 결합 분자는 자연적인 Fc 영역을 포함하는 결합 분자에 비해 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 125%, 약 150% 이상 증가된 반감기를 가질 수 있다. FcRn에 대한 결합을 촉진하는 하나 이상의 수정을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 결합 분자는 자연적인 Fc 영역을 포함하는 결합 분자에 비해 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 50배 이상, 또는 2배에서 10배 사이, 또는 5배에서 25배 사이, 또는 15배에서 50배 사이로 증가된 반감기를 가질 수 있다.

[0097] WO 2020/157211은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합하여 TCR-항-CD3 융합 단백질의 반감기를 연장하는 접근법을 설명한다. 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자가 WO 2020/157211에 공개된 형식에서 제공되는 Fc 도메인에 의한 연장된 반감기를 유지하지만, 추가로 상당히 높은 효능을 갖는다는 것을 발견했다.

[0098] 면역글로불린 Fc 도메인은 어떠한 항체 Fc 도메인일 수 있다. Fc 도메인은 세포 표면 Fc 수용체 및 보체계의 일부 단백질과 상호 작용하는 항체의 꼬리 영역이다. Fc 도메인은 두 개 또는 세 개의 중쇄 불변 도메인(CH2, CH3 및 CH4로 명명됨)과 선택적으로 힌지 영역을 갖는 두 개의 폴리펩타이드 사슬(즉, 두 개의 Fc "영역")을 포함한다. 두 개의 Fc 영역 사슬은 힌지 영역 내의 하나 이상의 이황화 결합에 의해 연결될 수 있다. 면역글로불린 하위 클래스 IgG1, IgG2 및 IgG4의 Fc 도메인은 FcRn에 결합하고 FcRn 매개 재순환을 거쳐 긴 순환 반감기(3-4주)를 제공하여, 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 반감기를 연장한다. IgG와 FcRn의 상호 작용은 CH2 및 CH3 도메인의 일부를 포함하는 Fc 영역에 국한된다. 본 발명에 사용하기 위한 바람직한 면역글로불린 Fc 도메인에는 IgG1 또는 IgG4의 Fc 도메인이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 예를 들어, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인일 수 있다. 즉, FC1 및 FC2 영역은 IgG1 Fc 영역일 수 있다. Fc 도메인은 인간 서열에서 유래될 수 있다.

[0099] FC1 영역은 서열번호 42의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, FC2 영

역은 서열번호 43의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. FC1 영역은 서열번호 42의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, FC2 영역은 서열번호 43의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 바람직하게는, FC1 영역은 서열번호 42에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, FC2 영역은 서열번호 43에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 당업자는 FC1 및 FC2에 대해 위에 제공된 서열은 그 반대의 경우에도 적합하다는 점을 이해합니다. 예를 들어, FC1 영역은 서열번호 43에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, FC2 영역은 서열번호 42에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0100] Fc 영역은 야생형 또는 변형되지 않은 Fc 서열에 대한 돌연변이를 포함할 수 있다. 돌연변이에는 치환, 삽입 및 결실이 포함된다. 이러한 돌연변이는 바람직한 치료 특성을 도입하기 위해 만들어질 수 있다. 예를 들어, 이종이량체화를 촉진하기 위해 CH3 도메인에 노브-인투-홀(knobs-into-holes; KiH) 돌연변이가 설계될 수 있다. 따라서, 반감기 연장 도메인은 FC1 영역과 FC2 영역의 이량체화를 촉진하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 이러한 치환에는 "노브-인-홀(Knob-in-hole)" 치환이 포함된다. 이 경우, 하나의 사슬(즉, FC1 또는 FC2 영역 중 하나)은 Y와 같은 부피가 큰 돌출 잔기(즉, 노브(knob))를 포함하도록 설계되고, 다른 사슬(즉, FC1 및 FC2 영역 중 다른 하나)은 상보적인 포켓(즉, 홀(hole))을 포함하도록 설계된다. 예를 들어, 노브(knob)는 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄로 대체하여 구성될 수 있다. 홀(hole)은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄로 대체하여 구성될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 이는 FC1과 FC2 영역의 이종이량체 형성을 다른 종, 예를 들어 FC1과 FC2의 동종다량체 형성보다 선호하게 함으로써, 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 안정성과 제조 가능성을 향상시키는 것으로 생각된다.

[0101] Fc 영역의 이량체화를 촉진하기 위한 KiH 돌연변이 및 기타 돌연변이에 대한 적절한 위치 및 치환은 당업계에 알려져 있으며, Merchant et al., Nat Biotechnol 16:677 (1998) 및 Ridgway et al., Prot Engineering 9:617 (1996) 및 Atwell et al. J Mol Biol 270,1 (1997): 26-35에 기술된 것들을 포함한다. 예를 들어, 두 Fc 영역에서 대응하는 노브knob)와 홀(hole)을 형성하는 치환은 다음 표에 제공된 하나 이상의 쌍에 해당할 수 있다:

[0102]

FC1 및 FC2 영역 중 하나에서의 CH3	FC1 및 FC2 영역 중 나머지에서의 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366W	T366S:L368A:Y407V
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

[0103] 위 표의 치환은 EU 번호 체계를 사용한 원래 잔기, 위치, 및 도입된 잔기로 표시된다(모든 잔기는 단일 문자 아미노산 코드로 제공됨). 다중 치환은 콜론으로 구분된다.

[0104] FC1 및 FC2 영역은 위 표의 하나 이상의 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어:

[0105] (i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366S, L368A, T394S, F405A, Y407A, Y407T 및 Y407V로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고;

[0106] (ii) FC1 영역 및 FC2 영역 중 나머지 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366W, T366Y, T366W, T394W 및 F405W로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. (i) 및 (ii)의 치환은 각각 hole 형성 및 knob 형성 치환이다. FC1 영역은 (i)의 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있고 FC2 영역은 (ii)의 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0107] 예를 들어:

[0108] (i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366S, L368A 및 Y407V로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고;

[0109] (ii) FC1 영역 및 FC2 영역 중 나머지 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366W 아미노산 치환을 포함할 수 있다. FC1 영역은 (i)의 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있고 FC2 영역은 (ii)의 치환을 포함할 수 있다.

[0110] 바람직하게는, (i) FC1 영역 및 FC2 영역 중 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366S, L368A 및 Y407V 아미노산 치환을 포함하고; (ii) FC1 영역 및 FC2 영역 중 나머지 하나는 EU 번호 체계에 따라 T366W 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, FC1 영역은 EU 번호 체계에 따라 T366S, L368A 및 Y407V 아미노산 치환을 포함할 수 있고; FC2 영역은 EU 번호 체계에 따라 T366W 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0111] Fc 도메인은 또한 Fc 도메인의 작동 기능을 약화시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예시적인 작동 기능(effector functions)에는 보체 의존성 세포독성(CDC) 및/또는 항체 의존성 세포 독성(ADCC)이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 작동 기능을 약화시키기 위한 변형은 Fc 도메인의 글리코실화 패턴을 변경하는 변형, 예를 들어, 탈글리코실화된 Fc 도메인을 초래하는 변경일 수 있다. 대안적으로, 작동 기능을 약화시키기 위한 변형은 Fc 도메인의 글리코실화 패턴을 변경하지 않는 변형일 수 있다. 작동 기능을 약화시키기 위한 변형은 인간 작동 세포에 대한 결합, 하나 이상의 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 대한 결합을 감소시키거나 제거할 수 있다. 예를 들어, 반감기 연장 도메인은 EU 번호 체계에 따라 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, L235P, G236R, G237A, P238S, F241A, V264A D265A, H268A, D270A, N297A, N297G, N297Q, E318A, K322A, L328R, P329G, P329A, A330S, A330L, P331A 및 P331S로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 특정 변형에는 인간 IgG1의 Fc 영역(EU 번호 체계)에서 N297G 또는 N297A 치환이 포함된다. 다른 적절한 변형에는 인간 IgG1의 Fc 영역(EU 번호 체계)에서 L234A, L235A 및 P329G 치환이 포함되며, 이는 작동 기능의 약화를 초래한다. 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 Fc 영역은 EU 체계에 따른 번호 매김으로 잔기 N297에서 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치환은 N297G 또는 N297A 치환일 수 있다. 다른 적절한 돌연변이(예: 잔기 N297에서)는 당업자에게 알려져 있다.

[0112] 작동 기능이 감소된 Fc 변이체는 야생형 Fc 영역(예: 작동 기능을 감소시키기 위한 돌연변이가 없는 Fc 영역이지만 다른 돌연변이는 있을 수 있음)에 의해 달성되는 작동 기능에 비해 작동 기능(예: CDC, ADCC 및/또는 FcR에 대한 결합 등 활성)을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 이상 감소시키는 Fc 변이체를 지칭한다. 작동 기능이 감소된 Fc 변이체는 야생형 Fc 영역에 비해 모든 검출 가능한 작동 기능을 제거하는 Fc 변이체일 수 있다. 작동 기능을 측정하기 위한 분석법은 당업계에 알려져 있으며 아래에 설명되어 있다.

[0113] CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해, 체외(*in vitro*) 및/또는 체내(*in vivo*) 세포독성 분석을 수행할 수 있다. 예를 들어, Fc 영역 또는 융합 단백질에 FcɣR 결합이 결여되었으나(따라서 ADCC 활성이 없을 가능성이 있음) FcRn 결합 능력은 유지하는지 확인하기 위해 Fc 수용체(FcR) 결합 분석을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcɣRIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcɣRI, FcɣRII 및 FcɣRIII를 발현한다. 조혈 세포에서의 FcR 발현은 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)의 464페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 체외 분석의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 5,500,362(예: Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 참조) 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) 참조)에 기술되어 있다.

[0114] FC1 및 FC2 영역에 Fcɣ수용체에 대한 결합을 제거하거나 감소시키고/시키거나 FcRn에 대한 결합을 증가시키고/시키거나 Fab 암 교환을 방지하고/하거나 프로테아제 부위를 제거하는 치환이 도입될 수 있다. 이와 관련하여, 반감기 연장 도메인은 또한 활성화 수용체에 대한 결합을 방지하거나 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 반감기 연장 도메인은 FcɣR에 대한 결합을 방지하거나 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, FC1 영역 및/또는 FC2 영역은 EU 번호 체계에 따라 N297G 아미노산 치환을 포함할 수 있다. FC1 영역과 FC2 영역 모두 N297G 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0115] 반감기 연장 도메인은 변형되지 않은 반감기 연장 도메인에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 아미노산 치환은 FcRn에 대한 결합을 촉진한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 알려져 있다(예: Ghetie and Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., Nature

Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조). FcRn에 대한 높은 친화도로 결합하는 폴리펩타이드의 체내 FcRn 결합 및 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 형질전환 마우스 또는 형질전환된 인간 세포주에서, 또는 변이 Fc 영역을 갖는 폴리펩타이드가 투여되는 영장류에서 분석할 수 있다. WO 2004/42072 (Presta)는 FcR에 대한 결합을 개선하거나 감소시키는 항체 치환을 설명한다. 또한 예를 들어 Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)을 참조한다. 특히, Mackness et al., MAbs. 11:1276--1288 (2019)은 FcRn에 대한 결합을 향상시키기 위한 항체 Fc 영역의 적절한 아미노산 치환을 설명한다.

[0116] Fc 도메인의 FcRn에 대한 결합을 촉진하는 Fc 영역의 변형(예: 아미노산 치환, 아미노산 삽입 또는 아미노산 결실)은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 및 443으로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 위치에 있을 수 있다. 선택적으로, Fc 영역은 당업계에 알려진 추가 및/또는 대체 위치에 비자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0117] 더 구체적으로, Fc 영역은 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 2961, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y 및 434W로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 치환을 포함할 수 있으며, Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진다. 선택적으로, Fc 영역은 당업계에 알려진 추가 및/또는 대체 비자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0118] Fc 영역에서 FcRn에 대한 결합을 촉진하는 변형(들)(예: 아미노산 치환, 아미노산 삽입 또는 아미노산 결실)은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 234, 235 및 331로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에 있을 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 234F, 235F, 235Y 및 331S로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 치환을 포함할 수 있다.

[0119] Fc 영역에서 FcRn에 대한 결합을 촉진하는 변형(들)(예: 아미노산 치환, 아미노산 삽입 또는 아미노산 결실)은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 239, 330 및 332로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에 있을 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 239D, 330L 및 332E로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 치환을 포함할 수 있다.

[0120] Fc 영역에서 FcRn에 대한 결합을 촉진하는 변형(들)(예: 아미노산 치환, 아미노산 삽입 또는 아미노산 결실)은 Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 252, 254 및 256으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 위치에 있을 수 있다. 예를 들어, Fc 영역은 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 7,083,784에 설명된 바와 같이, Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 치환을 포함할 수 있다. Fc 영역은 다음 치환을 모두 포함할 수 있다: Kabat에 의해 설정된 EU 인덱스에 따라 번호가 매겨진 252Y, 254T 및 256E.

[0121] FcRn에 대한 결합을 촉진하는 위에 나열된 치환은 대응하는 야생형 Fc 영역(예: 인간 IgG1 또는 IgG4 Fc 영역)에 상대적이며, Fc 도메인의 FC1 및 FC2 부분 중 하나 또는 바람직하게는 둘 다에 존재할 수 있다. 다시 말해, 치환은 일반적으로 대응하는 야생형 Fc 영역, 예를 들어 인간 IgG1 또는 IgG4 Fc 영역에는 존재하지 않는 아미노산을 의미한다. 이와 관련하여, 본 명세서에서 사용되는 "치환"은 나열된 아미노산 중 하나가 폴리펩타이드에 존재함을 의미하며, 반드시 하나의 아미노산을 다른 것으로 대체하는 것을 요구하지는 않는다. 한 구현예에서,

FC1 및/또는 FC2 영역은 EU 번호 체계에 따라 번호가 매겨진 252Y, 254T 및 256E 아미노산 치환을 포함한다.

[0122] 추가적으로 또는 대안적으로, 제조상의 이유로 돌연변이가 만들어질 수 있으며, 예를 들어 본 명세서에 기술된 바와 같이 글리코실화와 같은 번역 후 변형을 받을 수 있는 아미노산을 제거하거나 대체하기 위해서이다. 면역글로불린 Fc는 링커 및/또는 본 명세서에 기술된 힌지 서열을 통해 본 발명의 분자의 다른 도메인(즉, VC1 또는 VC2)에 융합될 수 있다. 대안적으로 링커가 사용되지 않을 수 있다.

[0123] FC1 영역은 서열번호 57의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, FC2 영역은 서열번호 58의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. FC1 영역은 서열번호 57의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고, FC2 영역은 서열번호 58의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. FC1 영역은 서열번호 57에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, FC2 영역은 서열번호 58에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 숙련된 사람이 이해하듯이, FC1 및 FC2에 대해 위에 제공된 서열은 상호 교환 가능하다. 예를 들어, FC1 영역은 서열번호 57에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고, FC2 영역은 서열번호 58에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0124] 본 발명의 분자의 두 Fc 영역은 CH2 및 CH3 불변 도메인과 힌지 서열의 전체 또는 일부를 포함할 수 있다. 힌지 서열은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 힌지 영역과 실질적으로 또는 부분적으로 일치할 수 있다. 힌지 서열은 서열번호 44에 제공된 아미노산 서열과 같은 IgG1 힌지 서열일 수 있다. 힌지는 코어 힌지 도메인의 전체 또는 일부와 하부 힌지 영역의 전체 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0125] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 적절한 반감기 연장 형식은 또한 "멀티-도메인 결합 분자"라는 제목으로 본 출원과 함께 출원된 출원에 기술되어 있으며, 이는 2022년 8월 18일 출원된 미국 가출원 번호 63/371,861의 우선권 혜택을 주장하며, 그 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0126] 형식 및 링커

[0127] 본 명세서에서 사용되는 "형식"이라는 용어는 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자에서 각 도메인(및 각 도메인의 각 영역)의 위치와 방향, 그리고 폴리펩타이드 사슬의 수를 지칭한다. 예시적인 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자의 형식에 대한 개략적 다이어그램이 도 1에 제공되어 있다. 도 1에 표시된 예시적인 결합 분자의 면역세포 결합 도메인은 VH(TCE-VH) 및 VL(TCE-VL)을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인이다. 본 명세서에 위에서 설명한 대로 다른 유형의 면역세포 결합 도메인(예: 단일 도메인 항체, VHH 등)도 적합하다. 이러한 분자의 pMHC 결합 도메인 및 면역세포 결합 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 면역 세포에 결합할 수 있다. 이와 관련하여, pMHC 결합 도메인 및 면역세포 결합 도메인은 각각 pMHC 복합체 및 면역 세포에 동시에 결합할 수 있다.

[0128] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자의 형식에서, 면역세포 결합 도메인은 VC1의 N 말단에 연결되고, VC1은 그 C 말단을 통해 FC1 영역의 N 말단에 연결되며, FC1 영역은 그 C 말단을 통해 VC2의 N 말단에 연결되고, VC2는 그 C 말단을 통해 FC2의 N 말단에 연결된다. 각 영역은 단일 폴리펩타이드 사슬에서 공유 결합으로 연결된다. 이 형식은 다음과 같이 표현될 수 있다: N-ICE-VC1-FC1-VC2-FC2-C. 발명자들은 이 형식의 분자가 테스트된 35개 이상의 다른 형식 중에서 가장 높은 활성(즉, 효능 및 선택성) 및 생산 수율을 가진다는 것을 확인했다.

[0129] 면역세포 결합 도메인이 VH 및 VL을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인인 경우, 형식은 다음과 같이 표현될 수 있다: N-(TCEVL-TCEVH 또는 TCEVH-TCEVL)-VC1-FC1-VC2-FC2-C. 발명자들은 이 형식의 분자가 테스트된 35개 이상의 다른 형식 중에서 가장 높은 활성(즉, 효능 및 선택성) 및 생산 수율을 가진다는 것을 확인했다.

[0130] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 단일 사슬 형식이다. 이 맥락에서, "단일 사슬"은 pMHC 결합 도메인, 면역세포 결합 도메인 및 반감기 연장 도메인을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬로 발현되는 멀티-도메인 결합 분자를 설명하는 데 사용된다.

[0131] 바람직하게는, VC1은 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함하고, VC2는 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함하며, 면역세포 결합 도메인은 항-CD3 scFv이고 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다.

[0132] ICE, TCE-VH, TCE-VL, VC1, VC2, FC1 및/또는 FC2 영역 중 둘 이상은 링커 및/또는 IgG 힌지 서열을 통해 서로 연결될 수 있다. 링커 서열은 유연할 수 있으며, 주로 글라이신, 알라닌 및 세린과 같은 아미노산으로 구성되어 있어, 유연성을 제한할 가능성이 있는 부피가 큰 측쇄가 없다. 이러한 링커에는 "글라이신-세린" 링커가 포함되

며, 이는 예를 들어 (GGGGS)n과 같이 오직 또는 주로 글라이신과 세린 잔기만을 포함하는 링커를 의미한다. 대안적으로, 더 큰 강성이 있는 링커가 바람직할 수 있다. 더 강성이 있는 링커의 예로는 (EAAAK)n 서열을 가진 알파 나선 형성 링커가 있다. 링커 서열의 사용 가능하거나 최적의 길이는 쉽게 결정될 수 있다. 종종 링커 서열은 15개 미만, 예를 들어 10개 미만, 또는 2-10개의 아미노산 길이일 것이다. 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 아미노산 길이일 수 있다. 멀티-도메인 결합 분자에서 사용될 수 있는 적절한 링커의 예는 당업계에 알려져 있으며 WO2010/133828 및 Chen et al Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357-1369에 설명된 것들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 멀티-도메인 결합 단백질에 존재하는 링커는 GGGGS(서열번호 18), GGGSG(서열번호 20), GGSGG(서열번호 21), GSGGG(서열번호 22), GSGGGP(서열번호 23), GGEPS(서열번호 24), GGEGGGP(서열번호 25), GGEGGGSEGGGS(서열번호 26), GGGSGGGG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS(서열번호 39), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 49), EAAAK(서열번호 50) 및 EAAAKEAAAKEAAAK(서열번호 51)의 군에서 선택된 서열을 가질 수 있다.

[0133] 적절한 IgG 힌지 서열은 당업계에 알려져 있으며 서열번호 44에 제공된 예시적인 IgG1 힌지 서열을 포함한다. 다른 적절한 IgG 힌지 서열에는 서열번호 52에 제공된 절단된 IgG1 힌지 서열 및 서열번호 53에 제공된 IgG4 힌지가 포함된다.

[0134] ICE 도메인은 그 C-말단을 통해 VC1의 N-말단에 연결될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 다음과 같은 형식을 가질 수 있다: N-ICE-VC1-FC1-VC2-FC2-C. 면역세포 결합 도메인이 VH 및 VL을 포함하는 T 세포 결합 면역 효능 도메인인 경우, TCE-VL 영역은 그 C 말단을 통해 TCE-VH 영역의 N 말단에 연결될 수 있고, TCE-VH 영역은 그 C 말단을 통해 VC1의 N 말단에 연결될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 다음과 같은 형식을 가질 수 있다: N-TCEVL-TCEVH-VC1-FC1-VC2-FC2-C.

[0135] VC1은 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함할 수 있고 VC2는 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함할 수 있다. 따라서, VC1 및 VC2는 이량체화하여 가용성 TCR을 형성할 수 있다. 이와 관련하여, 바람직하게는 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 다음과 같은 형식을 갖는다: N-ICE-TCRβα-FC2-C 또는 N-TCEVL-TCEVH-TCRβα-FC2-C("TCRβ는 TCRβ가변 및 불변 영역을 의미하고 "TCRα"는 TCRα 가변 및 불변 영역을 의미함.)

[0136] 만일 존재하는 경우, TCE-VL 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하는 서열을 통해 TCE-VH 영역에 연결될 수 있다. 바람직하게는, TCE-VL 영역을 TCE-VH 영역에 연결하는 서열은 서열번호 39에 제공된 아미노산 서열이다.

[0137] ICE 도메인 또는 TCE-VH 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하거나 이로 구성되는 서열을 통해 VC1에 연결될 수 있다. 바람직하게는, ICE 도메인 또는 TCE-VH 영역을 VC1에 연결하는 서열은 서열번호 18에 제공된 아미노산 서열이다.

[0138] VC1은 IgG 힌지 서열을 포함하는 서열을 통해 FC1 영역에 연결될 수 있고/있거나 VC2는 IgG 힌지 서열을 포함하는 서열을 통해 FC2 영역에 연결될 수 있다. IgG 힌지 서열은 서열번호 44와 적어도 80% 동일할 수 있다. 바람직하게는, IgG 힌지 서열은 서열번호 44와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100% 동일하다.

[0139] VC1을 FC1 영역에 연결하는 서열은 추가로 글라이신-세린 링커를 포함할 수 있고/있거나 VC2를 FC2 영역에 연결하는 서열은 추가로 글라이신-세린 링커를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 글라이신-세린 링커는 서열번호 47에 제공된 서열을 갖는다. 바람직하게는, 이러한 서열은 N-말단에서 C-말단까지 다음과 같은 형식으로 있다: VC1-GS 링커-IgG 힌지-FC1 및 VC2-GS 링커-IgG 힌지-FC2.

[0140] FC1 영역은 글라이신-세린 링커를 포함하는 서열을 통해 VC2에 연결될 수 있다. 바람직하게는, FC1 영역을 VC2 영역에 연결하는 글라이신-세린 링커는 서열번호 47에 제공된 서열을 갖는다.

[0141] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 단일 폴리펩타이드 사슬이다(도 1 참조). 멀티-도메인 결합 분자는 가용성 및/또는 재조합 및/또는 분리될 수 있다. 두 가지 예시적인 멀티-도메인 결합 분자의 완전한 아미노산 서열은 서열번호 45 및 서열번호 46에 제공되어 있다.

[0142] 멀티-도메인 결합 분자는 서열번호 45의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 멀티-도메인 결합 분자는 서열번호 45의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바람직하게는, 멀티-도메인 결합 분자는 서열번호 45에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0143] 멀티-도메인 결합 분자는 서열번호 46의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 멀티-도메인

결합 분자는 서열번호 46의 서열과 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 멀티-도메인 결합 분자는 서열번호 46에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0144] 선택적으로, 위의 멀티-도메인 결합 분자 서열은 하나 이상의 다른 폴리펩타이드 서열에 추가로 융합될 수 있다.

[0145] 위의 서열은 SLLQHLIGL(서열번호 1) HLA-A*02 복합체에 결합하는 TCR 사슬을 포함하는 멀티-도메인 결합 분자에 관한 것이다. 숙련된 사람은 서열번호 45 및 서열번호 46의 TCR 사슬을 관심 있는 다른 TCR의 서열로 대체함으로써 이러한 서열을 다른 표적에 맞게 조정할 수 있다. 마찬가지로, 숙련된 사람은 서열번호 45 또는 서열번호 46의 항-CD3 scFv 서열(즉, T 세포 결합 면역 효능 도메인)을 다른 T 세포 결합 면역 효능 도메인, 예를 들어 다른 항-CD3 scFv 서열로 대체할 수 있다.

[0146] 바람직하게는:

[0147] a) VC1은 TCRβ가변 및 불변 영역을 포함하고,

[0148] b) VC2는 TCRα 가변 및 불변 영역을 포함하며,

[0149] c) 면역세포 결합 도메인은 항-CD3 scFv인 T 세포 결합 면역 효능 도메인이고,

[0150] d) FC1은 서열번호 42에 제공된 아미노산 서열, 또는 이에 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 가지며,

[0151] e) FC2는 서열번호 43에 제공된 아미노산 서열, 또는 이에 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0152] 멀티-도메인 결합 분자는 바람직하게는 N-말단에서 C-말단까지 다음 순서로 다음 아미노산 서열을 포함한다:

[0153] a) 항-CD3 scFv(TCE-VL 및 TCE-VH)의 아미노산 서열로, 선택적으로 서열번호 18에 제공된 링커 서열;

[0154] b) TCRβ가변 및 불변 영역(VC1)의 아미노산 서열;

[0155] c) 서열번호 47에 제공된 링커 서열 뒤에 서열번호 44에 제공된 IgG 힌지 서열;

[0156] d) 서열번호 42에 제공된 서열을 갖는 Fc 영역(FC1);

[0157] e) 서열번호 47에 제공된 링커 서열;

[0158] f) TCRα 가변 및 불변 영역(VC2)의 아미노산 서열;

[0159] g) 서열번호 47에 제공된 링커 서열 뒤에 서열번호 44에 제공된 IgG 힌지 서열; 및

[0160] h) 서열번호 43에 제공된 서열을 갖는 Fc 영역(FC2).

[0161] TCRβ 불변 영역은 서열번호 19에 제공된 아미노산 서열을 가질 수 있고/있거나 TCRα 불변 영역은 서열번호 15에 제공된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 멀티-도메인 결합 분자는 위의 a)부터 h)까지의 서열 외에 다른 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다.

[0162] 항-CD3 scFv는 서열번호 17에 제공된 아미노산 서열 또는 서열번호 40에 제공된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0163] 아미노산 서열

[0164] 본 발명의 범위 내에는 본 명세서에 공개된 모든 분자의 표현형적으로 침묵 변이체가 포함된다. 본 명세서에서 사용되는 "표현형적으로 침묵 변이체"라는 용어는 위에 설명된 것 외에도 하나 이상의 추가 아미노산 변화(치환, 삽입 및 결실 포함)를 포함하고, 상기 변화 없이 대응하는 분자와 유사한 표현형을 갖는 변이체를 의미하는 것으로 이해된다. 이 출원의 목적상, 표현형은 결합 친화도(KD 및/또는 결합 반감기) 및 특이성을 포함한다. 가용성 멀티-도메인 결합 분자의 표현형에는 결합 친화도 및 특이성 외에도 면역 활성화의 효능 및 정제 수율이 포함될 수 있다.

[0165] 표현형적으로 침묵 변이체는 하나 이상의 보존적 치환 및/또는 하나 이상의 허용 치환을 포함할 수 있다. 허용 치환이란 아래에 제공된 보존적 정의에 속하지는 않지만 그래도 표현형적으로 침묵인 치환을 의미한다. 숙련된 사람은 다양한 아미노산이 유사한 특성을 가지고 있어 '보존적'이라는 것을 알고 있다. 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 하나 이상의 이러한 아미노산은 해당 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 원하는 활성을 제

거하지 않고 대체할 수 있다.

[0166] 따라서 글라이신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 종종 서로 대체될 수 있다(지방족 측쇄를 가진 아미노산). 이러한 가능한 치환 중에서, 글라이신과 알라닌이 서로 대체되는 것이 선호된다(측쇄가 상대적으로 짧기 때문에) 그리고 발린, 류신 및 이소류신이 서로 대체되는 것이 선호된다(소수성인 더 큰 지방족 측쇄를 가지고 있기 때문에). 종종 서로 대체될 수 있는 다른 아미노산으로는 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판(방향족 측쇄를 가진 아미노산); 라이신, 아르기닌 및 히스티딘(염기성 측쇄를 가진 아미노산); 아스파르테이트 및 글루타메이트(산성 측쇄를 가진 아미노산); 아스파라진 및 글루타민(아미드 측쇄를 가진 아미노산); 및 시스테인 및 메티오닌(황 함유 측쇄를 가진 아미노산)이 있다. 본 발명의 범위 내에서 아미노산 치환은 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산을 사용하여 이루어질 수 있다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 알라닌의 메틸 그룹이 에틸 그룹으로 대체될 수 있고/있거나 펩타이드 백본에 사소한 변경이 이루어질 수 있다. 자연적 또는 합성 아미노산이 사용되는지 여부에 관계없이, 오직 L-아미노산만 존재하는 것이 바람직하다.

[0167] 이러한 성격의 치환은 종종 "보존적" 또는 "반보존적" 아미노산 치환이라고 언급된다. 따라서 본 발명은 서열에서 하나 이상의 보존적 치환 및/또는 하나 이상의 허용 치환이 있는 위에서 설명한 아미노산 서열 중 어느 것이라도 포함하는 분자의 사용까지 확장되어, 분자의 아미노산 서열, 또는 그 도메인이나 영역이 본 명세서에 공개된 서열과 적어도 90% 동일성, 예를 들어 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는다.

[0168] "동일성"은 당업계에 알려진 바와 같이 두 개 이상의 폴리펩타이드 서열 또는 두 개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 간의 관계로, 서열을 비교함으로써 결정된다. 당업계에서, 동일성은 또한 경우에 따라 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열 간의 서열 관련성 정도를 의미하며, 이는 그러한 서열의 문자열 간의 일치에 의해 결정된다. 두 폴리펩타이드 또는 두 폴리뉴클레오티드 서열 간의 동일성을 측정하는 여러 방법이 존재하지만, 동일성을 결정하는 방법은 컴퓨터 프로그램에 코드화되어 있다. 두 서열 간의 동일성을 결정하기 위한 선호되는 컴퓨터 프로그램에는 GCG 프로그램 패키지(Devereux, et al., Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN 및 FASTA(Atschul et al., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990))가 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0169] CLUSTAL 프로그램과 같은 프로그램을 사용하여 아미노산 서열을 비교할 수 있다. 이 프로그램은 아미노산 서열을 비교하고 필요에 따라 어느 서열에나 공백을 삽입하여 최적의 정렬을 찾는다. 최적의 정렬에 대한 아미노산 동일성 또는 유사성(아미노산 유형의 동일성과 보존)을 계산할 수 있다. BLASTx와 같은 프로그램은 유사한 서열의 가장 긴 부분을 정렬하고 그 적합성에 값을 할당한다. 따라서 각각 다른 점수를 가진 여러 유사성 영역이 찾아지는 비교를 얻을 수 있다. 두 가지 유형의 동일성 분석이 모두 본 발명에서 고려된다.

[0170] 두 아미노산 서열 또는 두 핵산 서열의 퍼센트 동일성은 최적의 비교를 위해 서열을 정렬하고(예: 첫 번째 서열에 갭을 도입하여 두 번째 서열과 최적으로 정렬할 수 있음) 대응하는 위치의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교함으로써 결정된다. "최적 정렬(best alignment)"은 가장 높은 퍼센트 동일성을 초래하는 두 서열의 정렬이다. 퍼센트 동일성은 비교되는 서열의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 수에 의해 결정된다(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 수/총 위치 수 x 100).

[0171] 두 서열 간의 퍼센트 동일성 결정은 당업자에게 알려진 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 두 서열을 비교하기 위한 수학적 알고리즘의 예는 Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268의 알고리즘으로, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877에서 수정되었다. Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410의 BLASTn 및 BLASTp 프로그램은 이러한 알고리즘을 통합했다. 두 뉴클레오티드 서열 간의 퍼센트 동일성 결정은 BLASTn 프로그램으로 수행될 수 있다. 두 단백질 서열 간의 퍼센트 동일성 결정은 BLASTp 프로그램으로 수행될 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 얻기 위해, Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402에 설명된 대로 Gapped BLAST를 활용할 수 있다. 대안적으로, 분자 간의 먼 관계를 탐지하는 반복 검색을 수행하기 위해 PSI-Blast를 사용할 수 있다(Id.). BLAST, Gapped BLAST 및 PSI-Blast 프로그램을 활용할 때, 각 프로그램(예: BLASTp 및 BLASTp)의 기본 매개변수를 사용할 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov참조. 기본 일반 매개변수에는 예를 들어 단어 크기(Word Size) = 3, 예상 임계값(Expect Threshold) = 10이 포함될 수 있다. 짧은 입력 서열에 맞게 자동으로 조정되도록 매개변수를 선택할 수 있다. 서열 비교에 활용되는 다른 수학적 알고리즘의 예는 Myers와 Miller의 CABIOS (1989) 알고리즘이다. ALIGN 프로그램(버전 2.0)은 CGC 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부로 이러한 알고리즘을 통합했다. 당업계에 알려진 서열 분석을 위한 다른 알고리즘으로는 Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5에 설명된 ADVANCE 및 ADAM과 Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8

에 설명된 FASTA가 있다. FASTA 내에서, ktup은 검색의 민감도와 속도를 설정하는 제어 옵션이다. 본 개시에서 퍼센트 동일성을 평가하기 위해, 기본 매개변수를 사용한 BLASTp가 비교 방법론으로 사용된다. 또한, 반올림된 퍼센트 동일성이 아미노산에 대해 정수가 아닌 값을 제공하는 경우(즉, 90% 서열 동일성을 가지는 25개의 아미노산 서열이 "22.5"라는 값을 제공하는 경우), 얻은 값은 다음 정수로 내림되어 "22"가 됨). 따라서, 제공된 예에서, 25개 아미노산 중 22개가 일치하는 서열은 90% 서열 동일성 내에 있다.

[0172] 당업자에게 명백한 바와 같이, 예를 들어 TCR 부분에서 분자의 기능적 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않고, C 말단 및/또는 N 말단에 제공된 서열을 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 잔기만큼 절단하거나 연장할 수 있다. C 말단 및/또는 N 말단에서 제공된 서열은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 잔기만큼 절단되거나 연장될 수 있다. 이러한 모든 변이체는 본 발명에 포함된다.

[0173] 보존적 및 허용되는 치환, 삽입 및 결실을 포함한 돌연변이는 중합효소 연쇄 반응(PCR), 제한 효소 기반 클로닝 또는 라이게이션 독립 클로닝(LIC) 절차를 기반으로 한 방법이 포함되지만 이에 국한되지 않는 적절한 방법을 사용하여 제공된 서열에 도입될 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 분자 생물학 교과서에 자세히 설명되어 있다. 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 제한 효소 기반 클로닝에 대한 자세한 내용은 Sambrook & Russell, (2001) Molecular Cloning -- A Laboratory Manual (3rd Ed.) CSHL Press를 참조한다. 라이게이션 독립 클로닝(LIC) 절차에 대한 추가 정보는 Rashtchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6(1): 30-6에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 제공된 단백질 서열은 재조합 발현, 고체 상태 합성 또는 당업계에 알려진 다른 적절한 방법으로 얻을 수 있다.

[0174] 멀티-도메인 결합 분자의 결합 특성 및 활성 평가

[0175] 결합 친화도(평형 상수 K_D에 반비례) 및 결합 반감기($T_{1/2}$로 표현)를 결정하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 결합 친화도 및 결합 반감기는 표면 플라스몬 공명(SPR) 또는 생물층 간섭계(BLI)를 사용하여 결정할 수 있으며, 예를 들어 각각 BIAcore 기기 또는 Octet 기기를 사용할 수 있다. 친화도를 두 배로 높이면 K_D가 절반으로 줄어든다는 것을 이해할 것이다. $T_{1/2}$은 ln2를 해리 속도(k_{off})로 나눈 값으로 계산된다. 따라서 $T_{1/2}$을 두 배로 늘리면 k_{off}가 절반으로 줄어든다. TCR에 대한 K_D 및 k_{off} 값은 일반적으로 TCR의 가용성 형태, 즉 세포질 및 막 관통 도메인 잔기를 제거하기 위해 절단된 형태에 대해 측정된다. 독립적인 측정 간의 변동을 고려하고, 특히 20시간을 초과하는 해리 시간을 갖는 상호 작용의 경우, 주어진 단백질의 결합 친화도 및/또는 결합 반감기는 동일한 분석 프로토콜을 사용하여 여러 번, 예를 들어 3회 이상 측정될 수 있으며 결과의 평균을 취할 수 있다. 두 샘플(즉, 두 개의 서로 다른 단백질 및/또는 동일한 단백질의 두 가지 물질) 간의 결합 데이터를 비교하려면 동일한 분석 조건(예: 온도)을 사용하여 측정하는 것이 바람직하다. TCR과 관련하여 설명된 측정 방법은 본 명세서에 기술된 멀티-도메인 결합 분자에도 적용될 수 있다.

[0176] 본 발명의 특정 멀티-도메인 결합 분자는 체외(in vitro)에서 항원 양성 세포, 특히 암세포에 전형적인 낮은 수준의 항원을 제시하는 세포(즉, 세포당 5-100개, 예를 들어 50개의 항원 수준; Bossi et al., (2013) Oncoimmunol. 1;2 (11) :e26840; Purbhoo et al.,(2006). J Immunol 176(12): 7308-7316.)에 대해 매우 강력한 T 세포 반응을 생성할 수 있다. 이러한 TCR은 본 명세서에 기술된 멀티-도메인 결합 분자에 통합하기에 적합할 수 있다. 측정되는 T 세포 반응은 인터페론 γ 또는 그란자임 B와 같은 T 세포 활성화 마커의 방출 또는 표적 세포 사멸, 또는 T 세포 증식과 같은 T 세포 활성화의 다른 척도일 수 있다. 매우 강력한 반응은 EC_{50} 값이 nM - pM 범위에 있는 것일 수 있으며, 예를 들어 500 nM 이하, 바람직하게는 1 nM 이하, 또는 500 pM 이하일 수 있다.

[0177] 대안적으로, 본 발명의 특정 결합 분자는 CD8+ 세포 사멸 및/또는 CD4+ 염증 억제와 같은 매우 강력한 항염증 반응을 생성할 수 있다. 이러한 결합 분자는 가용성 형태일 수 있으며 PD-1 작용제 또는 IL-2, IL-4, IL-10 또는 IL-13과 같은 인터루킨이나 사이토카인과 같은 면역 억제제인 면역세포 결합 도메인을 포함할 수 있다. 측정되는 항염증 반응은 CD8+ 세포 사멸 및/또는 CD4+ 염증 억제, 그리고 CD8+ T 세포 신호전달 경로의 억제일 수 있다. 항염증 반응을 평가하기 위한 적절한 방법은 당업계에 알려져 있으며 Jurkat NFAT 세포 리포터 분석을 포함한다. 바람직하게는 매우 강력한 반응은 pM 범위의 IC_{50}값을 가진 것으로, 즉 1000 pM 이하이다. 바람직하게는 리포터 분석에서 얻어진 최대 억제는 50% 이상, 예를 들어 80% 이상이다.

[0178] 본 발명에 포함되는 분자는 개선된 반감기를 가질 수 있다. 단백질이 개선된 반감기를 갖는지 결정하는 방법은 숙련된 사람에게 명백할 것이다. 예를 들어, 단백질이 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 결합하는 능력을 평가한다. 이

와 관련하여, FcRn에 대한 결합 친화도 증가는 단백질의 혈청 반감기를 증가시킨다(예를 들어, Kim et al. Eur J Immunol., 24:2429, 1994 참조).

[0179] 본 개시의 단백질의 반감기는 또한 약동학 연구, 예를 들어 Kim et al. Eur J of Immunol 24: 542, 1994에 기술된 방법에 따라 측정할 수 있다. 이 방법에 따르면 방사성 표지된 단백질을 마우스에 정맥 주사하고 시간 경과에 따른 혈장 농도를 주기적으로 측정한다. 예를 들어 주사 후 3분에서 72시간까지 측정한다. 또는 비표지 단백질을 주사하고 ELISA를 사용하여 혈장 농도를 주기적으로 측정할 수 있다. 이렇게 얻은 제거 곡선(clearance curve)은 2상, 즉 알파 상과 베타 상이어야 한다. 단백질의 체내 반감기를 결정하기 위해 베타 상에서의 제거율(clearance rate)을 계산하고 야생형 또는 수정되지 않은 단백질의 제거율과 비교한다.

[0180] 핵산, 벡터 및 숙주 세포

[0181] 본 발명은 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자를 코딩하는 핵산을 제공한다. 핵산은 cDNA일 수 있다. 핵산은 mRNA일 수 있다. 핵산은 비자연 발생 및/또는 정제 및/또는 조작된 것일 수 있다. 핵산 서열은 사용되는 발현 시스템에 따라 코돈 최적화될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 발현 시스템은 대장균과 같은 박테리아 세포, 또는 효모 세포, 또는 포유류 세포, 또는 곤충 세포를 포함할 수 있거나, 무세포 발현 시스템일 수 있다.

[0182] 본 발명은 또한 위에서 설명한 적어도 하나의 핵산을 포함하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 구조체를 제공한다. 본 발명은 또한 상기와 같은 하나 이상의 구조체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 언급한 바와 같이, 본 발명의 특정 결합 분자를 코딩하는 핵산은 본 발명의 측면을 형성하며, 본 발명의 특정 결합 분자를 코딩하는 핵산으로부터의 발현을 포함하는 특정 결합 분자의 생산 방법도 마찬가지이다. 발현은 편리하게 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포를 적절한 조건 하에서 배양함으로써 달성될 수 있다. 발현에 의한 생산 후, 특정 결합 분자는 적절한 기술을 사용하여 분리 및/또는 정제된 다음 필요에 따라 사용될 수 있다.

[0183] 폴리펩타이드를 다양한 다른 숙주 세포에서 클로닝하고 발현하기 위한 시스템은 당업계에 잘 알려져 있다. 적합한 숙주 세포로는 박테리아, 포유류 세포, 효모 및 바큘로바이러스 시스템이 있다. 이종 폴리펩타이드 발현에 사용 가능한 포유류 세포주로는 중국 햄스터 난소 세포, HeLa 세포, 아기 햄스터 신장 세포, NSO 마우스 흑색종 세포 등 많은 세포가 있다. 일반적인 선호되는 박테리아 숙주는 대장균(*E. coli*)이다. 박테리아 세포에서의 항체 및 항체 단편의 발현은 당업계에 잘 확립되어 있다. 리뷰는 예를 들어 Plückthun, Bio/Technology 9:545-551 (1991)을 참조한다. 배양에서 진핵세포 내 발현도 특정 결합 분자 생산을 위한 옵션으로 당업자에게 제공된다. 최근 리뷰를 위해서는 예를 들어 Reff, Curr. Opinion Biotech. 4:573-576 (1993); Trill et al., Curr. Opinion Biotech. 6:553-560 (1995)을 참조한다.

[0184] 적절한 벡터는 프로모터 서열, 종결자 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타 적절한 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 포함하여 선택하거나 구성할 수 있다. 벡터는 적절한 모든 벡터일 수 있으며, 플라스미드 또는 바이러스 벡터(일 예로, 파지, 또는 파지미드)를 포함한다. 추가 세부 사항은 예를 들어 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)를 참조하라. 핵산 조작, 예를 들어 핵산 구조체 준비, 돌연변이 유발, 서열 분석, 세포로의 DNA 도입 및 유전자 발현, 그리고 단백질 분석을 위한 많은 알려진 기술과 프로토콜이 Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, John Wiley & Sons (1992)에 자세히 설명되어 있다.

[0185] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 더 나아가, 본 발명은 그러한 핵산을 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 도입은 임의의 사용 가능한 모든 기술을 사용할 수 있다. 진핵세포의 경우, 적합한 기술에는 인산 칼슘 형질 감염, DEAE-덱스트란, 전기천공, 리포좀 매개 형질 전환 및 레트로바이러스 또는 기타 바이러스, 예를 들어 곤충 세포의 경우 바큘로바이러스를 사용한 형질도입이 포함될 수 있다. 박테리아 세포의 경우, 적합한 기술에는 염화칼슘 형질 전환, 전기천공 및 박테리오파지를 사용한 형질 전환이 포함될 수 있다. 도입 후에는 예를 들어, 유전자 발현을 위한 조건에서 숙주 세포를 배양하여 핵산의 발현을 유발하거나 허용할 수 있다.

[0186] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터를 클로닝하거나 발현하기 위한 적합한 숙주 세포는 당업계에 알려져 있다. (글리코실화된) 단백질 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 생물(무척추동물 및 척추동물)에서 유래한다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 세포 및 곤충 세포가 있다. 곤충 세포와 함께 사용할 수 있는 수많은 바큘로바이러스 균주가 식별되었으며, 특히 스포돕테라 프로기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질 전환과 함께 사용될 수 있다. 식물 세포 배양물도 숙주로 활용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429(형질전환 식물에서 항체 생산을 위한 PLANTIBODIES™기술

설명)를 참조한다. 척추동물 세포도 숙주로 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유류 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 예로는 SV40으로 형질 전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74에서 설명된 293 또는 293T 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포(예를 들어, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252에 설명된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 버팔로 쥐 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); TRI 세포(예를 들어, Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68에 기술됨); MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주로는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, DHFR- CHO 세포(Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)를 포함한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 Y0, NS0 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주가 있다. 단백질 생산에 적합한 특정 포유류 숙주 세포주에 대한 리뷰는 예를 들어 Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268을 참조하라. 숙주 세포는 진핵세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프구 세포(예: Y0, NS0, Sp20 세포)일 수 있다.

[0187] 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈(예: 염색체)에 통합될 수 있다. 통합은 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진하는 서열을 포함함으로써 촉진될 수 있다.

[0188] 멀티-도메인 결합 분자 제조 방법

[0189] 본 명세서에는 본 명세서에 설명된 멀티-도메인 결합 분자를 제조하는 방법이 추가로 제공된다. 이 방법은 본 발명의 핵산 또는 발현 벡터의 발현을 위한 최적 조건 하에서 본 발명의 숙주 세포를 유지하고 멀티-도메인 결합 분자를 분리하는 것을 포함한다.

[0190] 재조합 단백질 생산 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 단백질을 암호화하는 핵산을 발현 구조체 또는 벡터에 클로닝할 수 있으며, 이를 대장균 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포와 같은 숙주 세포 예를 들어, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포에 형질감염될 수 있다. 단백질 발현에 사용되는 예시적인 포유동물 세포는 CHO 세포, 골수종 세포 또는 HEK 세포이다. 이러한 목적을 달성하기 위한 분자 클로닝 기술은 당업계에 알려져 있으며 예를 들어 Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함) 또는 Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)에 설명되어 있다. 다양한 클로닝 및 체외 증폭 방법이 재조합 핵산의 구성에 적합하다. 재조합 항체 생산 방법도 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 US4816567 또는 US5530101을 참조한다.

[0191] 핵산은 추가 클로닝(DNA 증폭) 또는 무세포 시스템 또는 세포에서의 발현을 위해 발현 구조체 또는 발현 벡터에서 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 삽입될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "프로모터"라는 용어는 가장 넓은 맥락에서 취해져야 하며 유전체 유전자의 전사 조절 서열을 포함하며, 여기에는 TATA 박스 또는 개시자 요소가 포함되어 정확한 전사 개시에 필요하며, 추가 조절 요소(예: 상류 활성화 서열, 전사 인자 결합 부위, 인핸서 및 사일렌서)가 있거나 없을 수 있으며, 이는 발달 및/또는 외부 자극에 대한 반응으로 또는 조직 특이적 방식으로 핵산의 발현을 변경한다. 본 맥락에서 "프로모터"라는 용어는 또한 재조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시키는 유도체를 설명하는 데 사용된다. 예시적인 프로모터는 상기 핵산의 발현을 더욱 향상시키고/시키거나 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경하기 위해 하나 이상의 특정 조절 요소의 추가 사본을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 핵산의 발현이 프로모터에 의해 제어되도록 핵산에 대해 프로모터를 위치시키는 것을 의미한다.

[0192] 세포에서 발현을 위한 많은 벡터가 상업적으로 이용 가능하다. 벡터 구성 요소는 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만 이에 국한되지 않는다: 신호 서열, 단백질을 암호화하는 서열(예: 본 명세서에 제공된 정보에서 유래), 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열. 숙련된 사람은 단백질 발현에 적합한 서열을 알고 있을 것이다. 예시적인 신호 서열에는 원핵생물 분비 신호(예: pelB, 알칼라인 포스파타아제, 페니실리나아제, lpp 또는 열안정성 엔테로톡신 II), 효모 분비 신호(예: 인버타아제 리더, 인자 리더 또는 산성 포스파타아제 리더) 또는 포유동물 분비 신호(예: 단순 포진 gD 신호)가 포함된다.

[0193] 포유동물 세포에서 활성인 예시적인 프로모터에는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터(CMV-IE), 인간 신

장 인자 1-α 프로모터(EF1), 소핵 RNA 프로모터(U1a 및 U1b), α-미오신 중쇄 프로모터, 원숭이 바이러스 40 프로모터(SV40), 라우스 육종 바이러스 프로모터(RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β액틴 프로모터; CMV 인핸서/β액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터 또는 이의 활성 단편을 포함하는 하이브리드 조절 요소가 포함된다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예로는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(293 또는 현탁 배양에서 성장하도록 서브클로닝된 293 세포); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 또는 중국 햄스터 난소 세포(CHO)가 있다.

[0194] 효모 세포, 예를 들어 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 사카로마이세스 폼베(*S. pombe*)와 같은 효모 세포에서 발현에 적합한 일반적인 프로모터에는 ADH1 프로모터, GAL1 프로모터, GALA 프로모터, CUP1 프로모터, PHO5 프로모터, nmt 프로모터, RPR1 프로모터 또는 TEF1 프로모터가 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

[0195] 단백질을 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 사용되는 세포 유형에 따라 다양한 배지에서 배양될 수 있다. Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma)과 같은 상업적으로 이용 가능한 배지는 포유동물 세포 배양에 적합하다. 본 명세서에서 논의된 다른 세포 유형을 배양하기 위한 배지는 당업계에 알려져 있다.

[0196] 단백질 분리 방법은 당업계에 알려져 있다. 단백질이 배양 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템의 상층액은 먼저 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 장치를 사용하여 농축될 수 있다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제를 포함시켜 단백질 분해를 억제할 수 있으며, 항생제를 포함시켜 우발적 오염물의 성장을 방지할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 단백질을 발현하는 세포로부터 상청액을 여과 및/또는 분리할 수 있으며, 예를 들어 연속 원심분리를 사용할 수 있다.

[0197] 세포에서 제조된 단백질은 예를 들어 이온 교환, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피(예: 단백질 A 친화성 크로마토그래피 또는 단백질 G 크로마토그래피) 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 정제할 수 있다.

[0198] 이러한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 WO99/57134 또는 Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)에 설명되어 있다.

[0199] 숙련된 사람은 또한 단백질을 정제 또는 검출을 용이하게 하기 위해 태그, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 헥사-히스티딘 태그, 인플루엔자 바이러스 혈구응집소(HA) 태그, 시미안 바이러스 5(V5) 태그, FLAG 태그 또는 글루타티온 S-전이효소(GST) 태그를 포함하도록 수정할 수 있음을 알 것이다. 그 결과적인 단백질은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 정제된다. 예를 들어 친화성 정제. 예를 들어, 헥사-히스 태그를 포함하는 단백질은 고체 또는 반고체 지지체에 고정화된 헥사-히스 태그에 특이적으로 결합하는 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA)과 단백질을 포함하는 샘플을 접촉시키고, 샘플을 세척하여 비결합 단백질을 제거한 다음 결합된 단백질을 용출함으로써 정제된다. 대안적으로 또는 추가적으로 태그에 결합하는 리간드 또는 항체를 친화성 정제 방법에 사용된다.

[0200] 본 발명의 분자는 높은 수율로 정제될 수 있다. 수율은 정제 과정 중 유지되는 물질의 양(즉, 리폴딩 전에 얻은 가용화된 물질의 양에 대한 정제 과정 끝에 얻은 올바르게 접힌 물질의 양)을 기준으로 결정될 수 있고/있거나 수율은 원래 배양 부피에 대한 정제 과정 끝에 얻은 올바르게 접힌 물질의 양을 기준으로 할 수 있다. 높은 수율은 1% 이상, 또는 5% 이상, 또는 그 이상의 수율을 의미한다. 높은 수율은 1 mg/ml 이상, 또는 3 mg/ml 이상, 또는 5 mg/ml 이상, 또는 더 높은 수율을 의미한다.

[0201] 약학 조성물 및 의학적 방법

[0202] 환자에게 투여하기 위해, 본 발명의 분자, 핵산, 발현 벡터 또는 세포는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 약학 조성물의 일부로 제공될 수 있다. 이 약학 조성물은 적절한 형태(예: 환자에게 투여하는 원하는 방법에 따라)일 수 있다. 단위 투여 형태로 제공될 수 있으며, 일반적으로 밀봉된 용기에 제공되고 키트의 일부로 제공될 수 있다. 이러한 키트는 일반적으로(반드시는 아니지만) 사용 설명서를 포함한다. 여러 개의 상기 단위 투여 형태를 포함할 수 있다.

[0203] 약학 조성물은 비경구(피하, 근육 내, 경막 내 또는 정맥 내 포함), 장관(경구 또는 직장 포함), 흡입 또는 비강 경로를 포함한 적절한 경로로 투여하도록 조정될 수 있다.

[0204] 이러한 조성물은 약학 분야에 알려진 방법, 예를 들어 활성 성분을 무균 조건 하에서 담체(들) 또는 부형제

(들)와 혼합하여 제조될 수 있다. 단백질을 피험자에게 투여하기에 적합한 형태(예: 약학 조성물)로 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) 및 U.S. Pharmacopeia: National Formulary (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984)에 설명된 방법을 포함한다.

[0205] 약학 조성물은 일반적으로 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자(또는 본 발명의 핵산, 세포 또는 벡터)를 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어 수성 담체에 용해시킨 용액을 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등을 사용할 수 있다. 조성물은 pH 조절 및 완충제, 독성 조절제 등과 같이 생리학적 조건에 근접하게 하기 위해 필요한 약학적으로 허용되는 보조, 예를 들어 아세트산 나트륨, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 칼슘, 젖산 나트륨 등의 물질을 포함할 수 있다. 이러한 제제에서 본 발명 분자의 농도는 넓은 범위에서 변할 수 있으며, 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 따라 특정 투여 방식과 환자의 필요에 맞춰 선택될 것이다. 예시적인 담체에는 물, 식염수, 링거 용액, 덱스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민이 포함된다. 비수성 담체로는 혼합 오일과 에틸 올레이트가 사용될 수 있다. 리포좀도 담체로 사용될 수 있다. 담체는 등장성과 화학적 안정성을 향상시키는 소량의 첨가제, 예를 들어 완충제와 보존제를 포함할 수 있다.

[0206] 본 발명의 분자는 치료제로 사용하기에 이상적인 안전성 프로파일을 가질 수 있다. 이상적인 안전성 프로파일이란 좋은 특이성을 보이는 것 외에도 본 발명의 분자가 추가적인 전임상 안전성 시험을 통과했음을 의미한다. 이러한 시험의 예에는 전혈 존재 하에 최소한의 사이토카인 방출을 확인하고 따라서 체내에서 잠재적인 사이토카인 방출 증후군을 일으킬 위험이 낮음을 확인하는 전혈 분석, 그리고 대체 HLA 유형에 대한 인식 가능성이 낮음을 확인하기 위한 동종 반응성 시험(alloreactivity test)이 포함된다.

[0207] 본 발명의 분자의 투여량은 치료할 질병이나 장애, 치료할 개인의 나이와 상태 등에 따라 넓은 범위에서 변할 수 있다. 의사가 궁극적으로 사용할 적절한 투여량을 결정할 것이다.

[0208] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 약학 조성물, 벡터, 핵산 및 세포는 실질적으로 순수한 형태, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 순수한 형태로 제공될 수 있다.

[0209] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 추가로 치료제와 관련될 수 있다. 본 발명의 분자와 관련될 수 있는 치료제에는 면역 조절제 및 작동제, 방사성 화합물, 효소(예: 퍼포린) 또는 화학 요법제(예: 시스플라틴)가 포함된다. 독성 효과가 원하는 위치에서 발휘되도록 하기 위해, 독소는 본 명세서에 기술된 멀티-도메인 결합 분자에 연결된 리포좀 내부에 있을 수 있어 화합물이 천천히 방출된다. 이는 체내에서 운반되는 동안 손상 효과를 방지하고, 본 명세서에 기술된 멀티-도메인 결합 분자가 관련된 항원 제시 세포에 결합 후 독소가 최대 효과를 발휘하도록 할 것이다.

[0210] 적절한 치료제의 예에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지 않는다:

[0211] ● 포유동물 세포를 죽일 수 있는 능력을 가진 700 Da 미만의 분자량을 갖는 화합물인 소분자 세포독성제. 이러한 화합물은 또한 세포독성 효과를 가질 수 있는 독성 금속을 포함할 수 있다. 또한 이러한 소분자 세포독성제에는 생리학적 조건에서 붕괴되거나 전환되어 세포독성제를 방출하는 화합물인 프로드럭도 포함된다는 것을 이해해야 한다. 이러한 제제의 예에는 시스플라틴, 메이탄신 유도체, 라켈마이신, 칼리케아마이신, 도세탁셀, 에토포시드, 젬시타빈, 이포스파미드, 이리노테칸, 멜팔란, 미톡산트론, 소르피머 소듐포토프린 II, 테모졸로마이드, 토포테칸, 트리메트레이트 글루쿠로네이트, 아우리스타틴 E, 빈크리스틴 및 독소루비신이 포함된다;

[0212] ● 포유동물 세포를 죽일 수 있는 능력을 가진 단백질 또는 그 단편인 펩타이드 세포독소. 예를 들어 리신, 디프테리아 독소, 슈도모나스 박테리아 외독소 A, Dnase 및 Rnase;

[0213] ● α 또는 β입자 중 하나 이상, 또는 γ선의 동시 방출과 함께 붕괴하는 원소의 불안정한 동위원소인 방사성 핵종. 예를 들어 요오드 131, 레늄 186, 인듐 111, 이트륨 90, 비스무트 210 및 213, 악티늄 225 및 아스타틴 213; 이러한 방사성 핵종을 멀티-도메인 결합 분자에 용이하게 결합시키기 위해 킬레이트제를 사용할 수 있다;

[0214] *● 면역 반응을 자극하는 면역 작동 분자인 면역 자극제. 예를 들어 IL-2 및 IFN-γ와 같은 사이토카인,

[0215] ● 초항원(superantigen) 및 그 돌연변이체;

[0216] ● TCR-HLA 융합, 예: 펩타이드-HLA 복합체와의 융합, 여기서 상기 펩타이드는 엡스타인-바 바이러스(EBV)와 같은 일반적인 인간 병원체에서 유래함;

[0217] ● IL-8, 혈소판 인자 4, 흑색종 성장 자극 단백질 등과 같은 케모카인;

[0218] ● T 세포 또는 NK 세포 결정인자 항체(예: 항-CD3, 항-CD28 또는 항-CD16)를 포함하는 항체 또는 그 단편;

[0219] ● 면역 시냅스에 위치하는 분자에 결합하는 항체 또는 그 단편;

[0220] ● 항체와 유사한 결합 특성을 갖는 대체 단백질 스캐폴드;

[0221] ● 보체 활성제;

[0222] ● 이종성 단백질 도메인, 동종성 단백질 도메인, 바이러스/박테리아 단백질 도메인, 바이러스/박테리아 펩타이드;

[0223] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 및 세포는 암과 같은 질병, 특히 종양 연관 항원의 발현과 관련된 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 암은 GP100, NYESO, MAGEA4 또는 PRAME의 발현과 관련될 수 있으며, 이는 WO2011001152, WO2017109496, WO2017175006 및 WO2018234319에 기술되어 있고, 예를 들어 해당하는 미국 특허 번호 8,519,100, 11,639,374, 11,505,590 및 11,427,624에 기술되어 있으며, 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0224] 치료할 암은 PRAME 발현과 관련된 암일 수 있다. "PRAME 발현과 관련된"이란 암이 PRAME를 발현하는 암세포를 포함하는 것을 의미한다. 이와 관련하여, 암은 PRAME 양성 암일 수 있다. 암은 PRAME 발현과 관련된 것으로 알려져 있을 수 있으므로 PRAME 발현을 평가하지 않을 수 있다. 대안적으로, PRAME 발현은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들어 조직학적 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 그러나 본 발명은 조직학적 방법으로 PRAME 발현을 검출할 수 있는 암의 치료로 제한되지 않는다. PRAME 발현과 관련된 암에는 흑색종, 폐암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 식도암, 방광암, 두경부암, 자궁암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 호지킨 림프종이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 예를 들어, PRAME 발현과 관련된 암은 흑색종일 수 있다. 흑색종은 포도막 흑색종 또는 피부 흑색종일 수 있다. 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC) 또는 소세포 폐암(SCLC)일 수 있다. 유방암은 삼중 음성 유방암(TNBC)일 수 있다. 방광암은 요로상피암일 수 있다. 식도암은 위식도 접합부(GEJ) 선암일 수 있다. 난소암은 상피성 난소암, 예를 들어 고등급 장액성 난소암일 수 있다.

[0225] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 및 세포는 감염성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 감염성 질환은 세균, 바이러스, 진균 또는 기생충 병원체에 의해 유발될 수 있다. 항원 제시 세포가 병원체의 펩타이드에 결합된 MHC를 제시하는 병원체에 의한 모든 감염은 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자로 치료하기에 적합할 수 있다. 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 항원 제시 세포가 자연 면역 시스템이 추가 치료 없이 감염을 제거하기에 최적보다 낮은 수준의 병원체 펩타이드를 제시하는 감염에 특히 적합하다. 감염성 질환은 만성 감염일 수 있다. 예시적으로, 감염성 질환에는 B형 간염 바이러스(HBV) 감염 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염이 포함된다.

[0226] 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자는 제1형 당뇨병과 같은 자가면역 질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 전신 면역 억제와 관련된 잠재적인 중대한 이상 반응을 고려할 때, 전신 면역 억제보다는 장기 특이적 면역 억제가 치료를 위한 유익한 경로일 수 있다. 자가면역에서는 또한 PD-1 경로 장애가 질병 병인에 중요한 역할을 한다는 증거가 증가하고 있다. PD-1, PD-L1 및 PD-L2 유전자 다형성은 여러 자가면역 질환과 관련이 있다. 비정상적으로 낮은 PD-L1 발현이 제1형 당뇨병 및 크론병 환자의 샘플에서 관찰되었다. 따라서 자가반응성 림프구에서 PD-1을 활성화하는 것은 자가면역 질환을 치료하는 메커니즘으로 작용할 수 있다. 자가면역 질환 치료를 위한 효과적인 치료제에는 유리한 위험 프로파일(예: 높은 수준의 표적 및 조직 특이성)을 가지며 덜 자주 투여할 수 있는 치료제가 포함된다.

[0227] 본 발명에 의해 또한 제공되는 것은:

[0228] ● 의약품으로 사용하기 위한, 바람직하게는 암이나 종양 또는 감염성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포;

[0229] ● 의약품으로 사용하기 위한, 바람직하게는 암이나 종양 또는 자가면역 질환 또는 감염성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포;

[0230] ● 암이나 종양 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 의약품 제조에 있어서 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포의 사용;

[0231] ● 암이나 종양 또는 자가면역 질환 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 의약품 제조에 있어서 본 발명의 멀티-

도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포의 사용;

[0232] ● 환자에게 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포를 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이나 종양 또는 감염성 질환을 치료하는 방법;

[0233] ● 환자에게 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포를 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암이나 종양 또는 자가면역 질환 또는 감염성 질환을 치료하는 방법; 및

[0234] ● 본 발명의 멀티-도메인 결합 분자, 핵산, 벡터, 약학 조성물 또는 세포를 포함하는, 인간 대상에게 투여하기 위한 주사 가능한 제제.

[0235] 치료 방법은 추가적인 항종양제를 별도로, 조합하여 또는 순차적으로 투여하는 것을 더 포함할 수 있다. 이러한 약물의 예는 당업자에게 알려져 있으며 면역 활성화 약물 및/또는 T 세포 조절 약물을 포함할 수 있다.

[0236] 키트 및 제조품

[0237] 다른 측면에서, 상기 기술된 질병의 치료 및/또는 예방에 유용한 물질을 포함하는 키트 또는 제조품이 제공된다.

[0238] 키트는 (a) 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 중 본 발명의 분자, 핵산, 벡터 또는 세포를 포함하는 용기; 및 (b) 피험자의 질병(예: 암) 치료를 위한 지침이 있는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 키트는 추가로 (c) 적어도 하나의 추가 치료학적 활성 화합물 또는 약물을 포함할 수 있다.

[0239] 패키지 삽입물은 용기 상에 또는 용기와 관련되어 있을 수 있다. 적절한 용기에는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 다양한 재료로 형성될 수 있으며 예를 들어 유리나 플라스틱이 있다. 용기는 본 발명의 분자, 핵산, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물을 보유하거나 포함하며 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥내 주사액 백 또는 주사 바늘로 관통 가능한 마개가 있는 바이알일 수 있음). 조성물의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 분자, 핵산, 벡터 또는 세포이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 치료 대상 피험자, 예를 들어 본 명세서에 기술된 질병을 앓고 있거나 그 소인이 있는 피험자를 치료하는 데 사용된다는 것을 나타내며, 제공되는 다른 약물과 함께 조성물의 투여량 및 간격에 대한 구체적인 지침을 포함한다. 키트는 추가로 주사용 멸균수(BWFI), 인산 완충 식염수, 링거 용액 및/또는 덱스트로스 용액과 같은 약학적으로 허용되는 희석 완충액을 포함하는 추가 용기를 포함할 수 있다. 키트는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0240] 키트는 선택적으로 본 발명의 분자, 핵산, 벡터 또는 세포가 제1 약물인 제2 약물을 포함하는 용기를 추가로 포함할 수 있으며, 키트는 또한 패키지 삽입물에 제2 약물로 피험자를 치료하는 지침을 포함한다.

[0241] 본 발명의 다양한 수정은 본 명세서에 설명된 것 외에도 당업자에게 명백할 것이며 앞서 설명한 내용에서 드러날 것이다. 각 측면의 바람직한 특징은 다른 측면에 대해서도 마찬가지이다. 본 명세서에서 언급된 문서는 법률이 허용하는 최대 범위까지 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0242] 도 1은 본 발명의 예시적인 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자의 개략도이다. 도 1A는 N말단에서 C말단까지의 도메인 배열의 표현을 나타내고, 도 1B는 분자의 접힌 구조에 대한 가상의 표현을 나타낸다.

도 2는 T 세포 활성화의 판독으로 IFNγ를 사용하는 ELISpot 분석 결과를 보여준다. 비교를 위해, 동일한 TCR을 사용하여 WO 2020/157211에 이전에 공개된 형식을 사용하여 멀티-도메인 분자를 구성하는 데 사용되었으며 도 1에 제시된 단일 사슬 형식과 함께 테스트되었다. 각 형식의 개략적 표현이 해당 데이터 포인트를 나타내기 위해 도 2에 위치하였다.

도 3은 mol093v9 및 mol093v11의 pHLA, CD3 및 FcRn에 대한 결합을 평가하기 위한 표면 플라즈몬 공명 실험의 그래프를 나타낸다.

도 4는 Tg32 SCID 마우스에서 평가된 약동학적 특성을 보여준다. 마우스에 1mg/Kg의 용량으로 IV 볼루스를 투여하고 21일 동안 혈액을 연속 샘플링하였다. 샘플은 전기화학 발광 면역 분석법으로 혈청에서 검출되었다. 그래프는 4마리의 개별 마우스에 대한 시간에 따른 혈청 농도를 나타낸다.

도 5는 mol093v9 및 mol093v11의 T 세포 활성화를 체외(*in vitro*)에서 평가한 ELISPot 분석 결과를 보여주는

그래프를 제시한다.

도 6은 mol093v9의 T 세포 활성화를 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만, 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교한 ELISPot 분석 결과를 보여주는 그래프를 제시한다(WO 2018/234319). 도 6은 두 분자 모두 유사하게 강력한 T 세포 반응을 유도함을 나타낸다.

도 7은 xCELLigence 플랫폼을 사용하여 결정한 대로, mol093v9 및 mol093v11 존재 하에서 항원 양성 세포의 실시간 사멸을 보여주는 그래프이다.

도 8은 mol093v9를 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교한 T 세포 살해 분석 결과를 보여주는 그래프를 제시한다(WO 2018/234319). 도 8은 mol093v9가 분자의 비-HLE 버전("Mol001")과 비슷한 사멸 데이터를 보여준다는 것을 나타낸다.

도 9는 한 PBMC 효과기 공여자에 대해 두 가지 정상 세포 로트(심장 세포(HCM27) 및 폐 상피 세포(HSAEpiC9))로 얻은 ELISPOT T 세포 활성화 분석 데이터를 나타낸다. mol093v9 및 mol093v11의 농도가 1.1 nM 이하인 경우 정상 세포에 대한 최소한의 T 세포 활성화가 관찰되었다.

도 10은 mol093v9의 정상 세포 반응성을 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만, 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교한 ELISPOT T 세포 활성화 분석 결과를 보여주는 그래프를 제시한다(WO 2018/234319). 도 10은 두 분자 모두 피부(멜라닌 세포) 및 신장(신장 근위 세뇨관)의 정상 세포에 대해 유사한 반응성 부족을 보여준다는 것을 나타낸다.

도 11은 항원 양성 및 항원 음성 암세포주 존재 하에서 TCR 항-CD3 융합 분자 a40b23U28-mol93에 대한 IFNɣ 방출로 측정된 T 세포 활성화를 나타낸다.

도 12는 항원 양성 세포 존재 하에서 반감기가 연장된 TCR 항-CD3 융합 분자 a40b23U28-mol93 및 a40b23U28-mol14에 대한 IFNɣ 방출로 측정된 T 세포 활성화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0243] [서열의 설명]

[0244] **서열번호 1:** HLA-A*02 제한 펩타이드: SLLQHLIGL

[0245] **서열번호 2:** 예시적인 TCR의 알파 사슬 가변 도메인의 아미노산 서열. CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있고 각각 서열번호 3, 4 및 5로 지정되어 있으며, 골격 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)은 이탤릭체로 표시되어 있고 각각 서열번호 27, 6, 7 및 28로 지정되어 있다. 이 서열은 N-연결 당화 부위를 제거하는 N24Q 돌연변이(이중 밑줄)를 포함한다.

GDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCQHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVI

HGLTSNVNNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILILGHSRLGNY

IATFGKGTKLSVIP

[0246]

[0247] **서열번호 8:** 예시적인 TCR의 TCRβ사슬 가변 도메인의 아미노산 서열. CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있고 각각 서열번호 9, 10 및 11로 지정되어 있으며, 골격 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)은 이탤릭체로 표시되어 있고 각각 서열번호 29, 12, 13 및 30으로 지정되어 있다.

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYS

QIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGAS

PIRFGPGTRLTVT

[0248]

[0249] **서열번호 14:** 예시적인 TCR의 TCRα 사슬의 아미노산 서열. CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 3, 4 및 5로 지정된다. 골격 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)은 이탤릭체로 표시되어 있으며 각각 서열번호 27, 6, 7 및 28로 지정된다. 불변 영역은 굵은 글씨로 표시되어 있으며 서열번호 15로 지정된다. 불변 영역 내에서 사슬간 이황화 결합을 형성하기 위해 도입된 비천연 시스테인 잔기는 이중 밑줄(불변 영역의 48 위

치)로 표시되어 있다. 서열은 또한 각각 N-연결된 글리코실화 부위를 제거하는 N24Q, N148Q, N182Q 및 N193Q 치환(이중 밑줄)을 포함한다.

GDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCQHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVI

HGLTSNVNNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILILGHSRLGNY

*IATFGKGTKLSVIP***NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSK**

DSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT

[0250]

[0251] **서열번호 16:** 예시적인 TCR의 TCRβ사슬의 아미노산 서열. CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 9, 10 및 11로 지정된다. 골격 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)은 이탤릭체로 표시되어 있으며 각각 서열번호 29, 12, 13 및 30으로 지정된다. 불변 영역은 굵은 글씨로 표시되어 있으며(밑줄 없음) 서열번호 19로 지정된다. 불변 영역 내에서 사슬간 이황화 결합을 형성하기 위해 도입된 비천연 시스테인 잔기는 음영 처리되어 있다(불변 영역의 57 위치). 서열은 또한 N-연결된 글리코실화 부위를 제거하는 N184Q 치환(이중 밑줄)을 포함한다.

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYS

QIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWWTGGAS

*PIRFGPGTRLTVT***EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD**

HVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPR

NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

[0252]

[0253] **서열번호 17:** 본 명세서에서 "U0"로 지칭되는 예시적인 항-CD3 scFv(T 세포 결합 면역 효능 도메인). 경쇄 가변 도메인(VL)은 이탤릭체로 표시되어 있으며 서열번호 31로 지정된다. 경쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 33, 34 및 35로 지정된다. 중쇄 가변 도메인(VH)은 굵은 글씨로 표시되어 있으며 서열번호 32로 지정된다. 중쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 36, 37 및 38로 지정된다. VL과 VH를 연결하는 글리신-세린 링커는 일반 텍스트로 표시되어 있으며 서열번호 39로 지정된다.

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIY

YTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQG

*TKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC**

AASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDK

SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS

[0254]

[0255] **서열번호 40:** 본 명세서에서 "U28"로 지칭되는 또 다른 예시적인 항-CD3 scFv(T 세포 결합 면역 효능 도메인). 이 서열은 이중 밑줄로 표시된 두 가지 치환(T164A 및 I201F)을 제외하고 위의 서열번호 17과 동일하다. 경쇄 가변 도메인(VL)은 이탤릭체로 표시되어 있으며 서열번호 31로 지정된다. 경쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 33, 34 및 35로 지정된다. 중쇄 가변 도메인(VH)은 굵은 글씨로 표시되어 있으며 서열번호 41로 지정된다. 중쇄 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 밑줄이 그어져 있으며 각각 서열번호 48, 37 및 38로 지정된다. VL과 VH를 연결하는 글리신-세린 링커는 일반 텍스트로 표시되어 있으며 서열번호 39로 지정된다.

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIY

YTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQG

*TKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC**

AASGYSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDK

SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS

[0256]

[0257] **서열번호 54:** 인간 IgG1 Fc 영역(CH2 및 CH3 도메인), 변형되지 않음

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

[0258] YTQKSLSLSPGK

[0259] **서열번호 42:** 예시적인 IgG1 Fc 영역 서열. 이 서열은 위의 변형되지 않은 IgG1 Fc 서열(서열번호 54)에 대해, 이중 밑줄로 표시된 네 가지 치환을 포함한다. 이는 Fcγ에 대한 결합을 억제하기 위한 N297G 치환과 T366W 치환(knob-forming 치환)을 포함하는 다른 Fc 영역(예: 서열번호 43)과의 이량체화를 향상시키기 위한 T366S, L368A 및 Y407V 치환(hole-forming 치환)이다. 이 서열의 치환 번호 매김은 EU 번호 체계에 따른다.

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

DGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

[0260] YTQKSLSLSPGK

[0261] **서열번호 43:** 또 다른 예시적인 IgG1 Fc 영역 서열. 이 서열은 위의 변형되지 않은 IgG1 Fc 서열(서열번호 54)에 대해 이중 밑줄로 표시된 두 가지 치환을 포함한다. 이는 FcγR에 대한 결합을 억제하기 위한 N297G 치환과 T366S, L368A 및 Y407V 치환(hole-forming 치환)을 포함하는 다른 Fc 영역(예: 서열번호 42)과의 이량체화를 향상시키기 위한 T366W 치환(knob-forming 치환)이다. 이 서열의 치환 번호 매김은 EU 번호 체계에 따른다.

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

DGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWES

NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

[0262] YTQKSLSLSPGK

[0263] **서열번호 57:** 예시적인 IgG1 Fc 영역 서열. 이 서열은 위의 변형되지 않은 IgG1 Fc 서열(서열번호: 54)과 비교하여 7개의 치환(굵은 글씨)이 있다. 이는 FcγR과의 결합을 억제하기 위한 N297G 치환과 T366W 치환(knob-forming 치환)을 함유하는 다른 Fc 영역(예 : 서열번호 58)과 이량체화를 향상시키기 위한 T366S, L368A 및 Y407V 치환(hole-forming 치환), FcRn과의 결합을 증가시키기 위한 M252Y, S254T 및 T256E치환이다. 이 서열에서 치환 번호 매김은 EU 번호 체계에 따른다.

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWOQGNVFSCSVMHEALHN
HYTOKSLSLSPGK

[0264]

[0265] **서열번호: 58** 추가로 예시적인 IgG1 Fc 영역 서열. 이 서열은 위의 변형되지 않은 IgG1 Fc 서열(서열번호: 54)과 비교하여 5개의 치환(굵은 글씨)이 있다. 이는 FcyR에 대한 결합을 억제하기 위한 N297G 치환, T366W 치환(knob-forming 치환)을 함유하는 다른 Fc 영역 (예 : 서열 번호 : 57)과의 이량체화를 향상시키기위한 T366S, L368A 및 Y407V 치환 (hole-forming 치환) 및 FcRn과의 결합을 증가시키기 위한 M252Y, S254T 및 T256E 치환이다. 이 서열에서 치환 번호 매김은 EU 번호 체계에 따른다.

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK↵

[0266]

[0267] **서열번호 44:** 예시적인 IgG1 힌지 서열(천연 인간 IgG1 서열에 대해 5번 위치에서 C에서 S로의 치환 포함, 서열번호 44에 따라 번호 매김):

[0268] EPKSSDKTHTCPPCP

[0269] **서열번호 52:** 절단된 IgG1 힌지 서열:

[0270] DKTHTCPPCP

[0271] **서열번호 53:** IgG4 힌지 서열:

[0272] ESKYGPPCPSCP

[0273] **서열번호 45:** "mol093v11"이라고 명명된 예시적인 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자의 완전한 아미노산 서열. T 세포 결합 면역 효능 도메인(밑줄)은 서열번호 17에 제공된 항-CD3 scFv 서열("U0")이다. pMHC 결합 도메인은 이중 밑줄로 표시되어 있으며 서열번호 16에 제공되는 TCRβ사슬 서열(이 경우 "VC1"임, 이중 밑줄, 일반 텍스트)과 서열번호 14에 제공되는 TCRα 사슬 서열(이 경우 "VC2"임, 이중 밑줄, 굵은 글씨)을 포함한다. 반감기 연장 도메인은 서열번호 42에 제공되는 Fc 영역 서열(이탤릭체, 이 경우 FC1 영역임)과 서열번호 43에 제공되는 Fc 영역 서열(이탤릭체 및 굵은 글씨, 이 경우 FC2 영역임) 사이의 이량체에 의해 형성되는 Fc 도메인이다.

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAP
GKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSG
YYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAM
YWYRQDPGQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLC
ASSWWTGGASPIRFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF
YPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFR
CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS
*KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGSGGGGGDAKTTQPNSME
SNEEEPVHLPCQHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIAEDRKS
STLILHRATLRDAAVYYCILILGHSRLGNYIATFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDS
KSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACA
NAFQNSIIPEDTGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPCP*APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS*
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[0274]

[0275] **서열번호 46:** "mo1093v9"라고 명명된 예시적인 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자의 완전한 아미노산 서열. T 세포 결합 면역 효능 도메인(밑줄)은 서열번호 40에 제공되는 항-CD3 scFv 서열("U28")이다. pMHC 결합 도메인은 이중 밑줄로 표시되어 있으며 서열번호 16에 제공된 TCRβ사슬 서열(이 경우 "VC1"임, 이중 밑줄, 일반 텍스트)과 서열번호 14에 제공된 TCRα 사슬 서열(이 경우 "VC2"임, 이중 밑줄, 굵은 글씨)을 포함한다. 반감기 연장 도메인은 서열번호 42에 제공되는 Fc 영역 서열(이탤릭체, 이 경우 FC1 영역임)과 서열번호 43에 제공되는 Fc 영역 서열(이탤릭체 및 굵은 글씨, 이 경우 FC2 영역임) 사이의 이량체에 의해 형성되는 Fc 도메인이다.

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQA
PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS
GYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDA
MYWYRQDPGQGLRLIYYSQIMGDEQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYL
CASSWWTGGASPIRFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG
FYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHF
RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
*SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGG***GDAKTTQPNSM**
ESNEEEPVHLPCQHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIAEDRK
SSTLILHRATLRDAAVYYCILILGHSRLGNYIATFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRD
SKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFAC
ANAFQNSIIPEDTGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI***
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

[0276]

[0277] **서열번호 55:** "a40b23U28-moI93"라고 명명된 예시적인 멀티-도메인, 단일 사슬 결합 분자의 완전한 아미노산 서열. T 세포 결합 면역 효능 도메인(밑줄)은 서열번호 40에 제공된 항-CD3 scFv 서열("U28")이다. pMHC 결합 도메인은 인간 PIWIL1(PIW1 유사 단백질 1) 펩타이드-MHC 복합체에 결합한다. pMHC 결합 도메인은 이중 밑줄이 그어져 있으며 TCRβ 사슬 서열(이 경우 "VC1")(이중 밑줄, 일반 텍스트)과 TCRα 사슬 서열(이 경우 "VC2")(이중 밑줄, 굵은 텍스트)을 포함한다. 반감기 연장 도메인은 서열번호 42(이탤릭체)에 제공된 Fc 영역 서열 사이에 형성된 이합체인 Fc 도메인으로, 이 경우 FC1 영역이다. 그리고 서열번호: 43(이탤릭체 및 굵게)에 제공된 Fc 영역 서열이며, 이 경우 FC2 영역이다.

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL
ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAP
GKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSG
YYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSEAGVAQSPRYKIIEKRQSVAFWCNPISGHGTL
YWYQQILGQGPKLLIQFHENGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL
CASSVDWVGDGERQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT
GFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNH
FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGLAKTTQPISM
DSYEGQEVNITCSHNYIAANDFITWYQQFPSQGPRFFIQGYKTNVQNEVASLFIPADRK
SSTLSLPRVSLSDTAVYYCLAWGGTDLLPFGTGTRLQVFPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD
KSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQ
NSIIPEDTGGGSGGGGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0278]

[0279] **서열번호 56:** a40b23U28-moI93에 의해 결합된(MHC와 복합체일 때) PIWIL1 펩타이드의 아미노산 서열.

[0280] SLSNRLYYL

[0281] 추가 링커 서열: GGGGS(서열번호 18), GGGSG(서열번호 20), GGSGG(서열번호 21), GSGGG(서열번호 22), GSGGGP(서열번호 23), GGEPS(서열번호 24), GGEGGGP(서열번호 25), GGEGGGSEGGGS(서열번호 26), GGGSGGGG(서열번호 47), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS(서열번호 39), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 49), EAAAK(서열번호 50) 및 EAAAKEAAAKEAAAK(서열번호 51).

[0282] [실시예]

[0283] *본 발명은 다음 실시예를 참조하여 더 완전히 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 설명된 실시예와 구현예는 단지 예시를 위한 것이며, 다양한 수정이나 변화가 당업자에게 제안되고 본 출원의 취지와 첨부된 청구항의 범위 내에 있음을 이해해야 한다.

[0284] 실시예 1 - 개선된 효능을 가진 멀티도메인 분자

[0285] TCR-항-CD3 융합 단백질을 포함하고 반감기 연장 Fc 도메인을 통합한 멀티-도메인 분자는 이전에 WO 2020/157211에 기술되었으며 기능적임이 입증되었다. 그러나, 이후 이러한 분자가 분자의 비-Fc 융합 형태에 비해 체외(*in vitro*)에서 T 세포를 활성화하는 능력이 실질적으로 감소한다는 것이 밝혀졌으며, 따라서 치료 용도에 최적하지 않은 것으로 간주되었다. 개선된 치료 특성을 갖는 새로운 분자 형식을 확인하기 위해 추가 조작이 수행되었다.

[0286] 각 기능적 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬에 배열된 멀티도메인 분자가 구성되었다. 도 1A는 도메인 배열의 개략적 표현을 나타내고 도 1B는 분자의 접힌 구조의 가상 표현을 나타낸다.

[0287] 첫 번째 예에서 멀티도메인 단일 사슬 분자의 TCR 도메인은 이전에 설명된 대로(WO 2018/234319) PRAME에서 유래된 HLA-A*02 제한 펩타이드 SLLQHLIGL(서열번호 1)을 인식하도록 설계되었다. 항원 양성 암세포 존재 하에서 이 분자가 T 세포 활성화를 유도하는 능력은 IFNγ를 T 세포 활성화의 판독으로 사용하는 ELISpot 분석을 통해 조사되었다. 비교를 위해, 동일한 TCR이 WO 2020/157211에 이전에 공개된 형식을 사용하여 멀티도메인 분자를 구성하는 데 사용되었으며 도 1에 제시된 단일 사슬 형식과 함께 테스트되었다.

[0288] 도 2에 나타난 데이터는 단일 사슬 분자가 이전에 공개된 형식보다 항원 양성 암세포에 대해 실질적으로 개선된 T 세포 반응을 유도할 수 있음을 보여준다.

[0289] 대체 도메인 배열을 갖는 추가 37개의 분자 형식이 제작되어 체외 효능에 대해 테스트되었다. 이러한 형식 중

어느 것도 도 1A-B에 묘사된 분자보다 더 나은 성능을 보이지 않았다. 17개 형식에서는 반응이 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다; 15개 형식에서는 낮은 수준의 반응이 관찰되었고, 2개 형식에서는 중간 수준의 반응이 관찰되었다. 나머지 3개 형식은 항원 양성 세포에 대한 낮은 효능 외에도 항원 음성 세포주에 대한 교차 반응성 증가를 보였다.

[0290] 실시예 2 - PRAME를 표적으로 하는 단일 사슬 멀티-도메인 분자의 제조

[0291] 도 1A-B에 나타난 형식을 사용하여 두 개의 멀티-도메인 분자(mol093v9 및 mol093v11로 명명됨)가 제조되었다. 두 분자의 TCR 영역은 모두 PRAME에서 유래한 HLA-A*02 제한 펩타이드 SLLQHLIGL을 인식하도록 설계되었다. 두 분자는 항CD3 scFv 단편의 아미노산 서열에서 차이가 있다. mol093v9 및 mol093v11의 전체 아미노산 서열은 각각 서열번호 46 및 45에 제공된다.

[0292] *발현*

[0293] mol093v9 및 mol093v11은 Thermo ExpiCHO™일시적 발현 프로토콜을 사용하여 CHO 세포에서 발현되었다. 간단히 말해, 배양된 세포는 형질주입 전에 6 x10^6의 농도로 희석되었다. 세포는 형질감염 후 14일째에 수확되었으며, 형질감염 후 1일째에 32℃로 온도를 변경하였다. 피드 첨가는 형질주입 후 1일째와 5일째에 수행되었다. 300 x g 및 17,500 x g에서 연속적인 두 번의 원심분리 단계로 정제하였다. 그 결과의 상층액은 0.45 μm 및 0.2 μm 멤브레인 필터에 통과시켰다.

[0294] *정제*

[0295] 정제된 상청액은 Protein A로 정제한 다음, 크기 배제 크로마토그래피 단계를 거쳤다. 15 cm 베드 높이의 MabSelect Extra Protein A 수지 컬럼을 준비하였다. 컬럼은 pH 3.0의 구연산 나트륨 완충액을 사용하여 용출한 상층액 50 컬럼 부피를 로딩하였다. 용출된 생성물은 3 컬럼 부피를 수집한 후 2M Tris 첨가로 중화하였으며, 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하였다. Protein A 용출액은 접선 흐름 여과(Pellicon®XL50 with Ultracel® 30kDa Membrane)를 사용하여 최소 2 mg/mL로 농축한 다음, HiLoad 26/600 Superdex SEC 수지에 로딩하였다. 컬럼은 5% 컬럼 부피로 로딩하였다. 생성물은 인산 구연산 완충액으로 용출하였고, 관련 분획은 0.22 μm 멤브레인 필터로 여과하였다.

[0296] *수율*

[0297] 정제된 물질의 농도는 Nanodrop 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

[0298] 상층액 1리터당 계산된 수율은 mol093v9의 경우 9.6 mg/L, mol093v11의 경우 17 mg/L였다.

[0299] *안정성*

[0300] 분자 안정성은 동결/해동 주기 후 및/또는 i) 열 스트레스 및 ii) 교반 조건 하에서 14일 동안 SEC UPLC로 평가하였다. 결과는 바로 아래 표에 제시되어 있으며, 이는 지정된 조건 하에서 mol093v11 단량체 순도를 나타낸다. 각 경우에 단량체 순도는 허용 가능한 것으로 간주되었다.

[0301]

샘플 조건	Mol093 v11 (U0)			Mol093 v9 (U28)		
	총 HMW	총 단량체	총 LMW	총 HMW	총 단량체	총 LMW
대조군 (5℃)	3.3	96.7	<0.1	-	-	-
동결/해동	3.5	96.5	<0.1	-	-	-
대조군 (5℃)	4.6	95.3	0.1	3.0	97.0	<0.1
교반	5.6	94.3	0.1	3.1	96.8	<0.1
30℃	8.2	91.6	0.2	5.5	94.4	0.1

[0302] 실시예 3 - PRAME를 표적으로 하는 멀티도메인 분자의 결합 친화도 및 동역학

[0303] TCR 및 항-CD3 부분이 각각의 표적 분자에 결합한 것을 확인하기 위해 T200 BIAcore에서 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의한 단일 주기 동역학을 수행한 후, 이어서 CD3(γε)의 단일 주입을 수행하였다.

[0304] *방법*

[0305] 사용된 칩은 Serie-S Biotin CAPture Kit(Cytiva)의 제품이었다. 러닝 버퍼는 0.005% P20을 포함하는 pH7.2의 인산 완충 식염수(PBS)였다. 칩은 구아니딘 염산 8M(GuHCl) 및 수산화 나트륨 1M(NaOH) 용액을 3+1 비율로 연속

3회 재생되었다. 유속은 20 μL/분, 접촉 시간은 120초였다. 칩은 PBS+P20으로 1:16으로 희석된 비오틴 CAPture 시약으로 활성화하였다. 유속은 300초 동안 2 μL/분이었다. 포획된 양은 1600 Response Unit(RU)였다. 비오틴화된 pHLA는 10 μg/mL, 유속은 10 μL/분으로 120초 동안 주입되었다.

[0306] 단일 주기 동역학 분석을 위해 mol093v9 및 mol093v11의 연속 희석액을 60 μL/분의 유속으로 주입하고(최고 농도 = 15nM), 이 때, 주입 사이에 200초 해리, 5번째 주입의 경우 7200초 해리가 있었다.

[0307] CD3 (γε)는 이후 300 nM의 농도와 10 μL/분의 유속으로 60초 동안 주입하였다.

[0308] FcRn 포획을 위해 유동 셀을 PBS+P20 0.005% pH6.0으로 프라이밍하였다. 비오틴화된 FcRn의 주입은 5 μg/mL, 유속 2 μL/분으로 120초 동안 수행하였다. FcRn 주입 후 5 μM의 비오틴을 모든 유동 셀에 10 μL/분으로 120초 동안 주입하였다. FcRn의 양은 450 RU였다.

[0309] mol093v9 또는 mol093v11을 15nM, 10 μL/분의 유속으로 300초 동안 주입하고 600초 동안 해리시켰다. 반응은 mol093v9 및 mol093v11에 대해 각각 152 RU 및 163 RU였다.

[0310] 동역학 매개변수는 제조업체의 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 해리 단계는 단일 지수 감쇠 방정식에 맞춰져 반감기 계산이 가능하였다. 평형 상수 K_D는 k_{off}/k_{on}으로 계산되었다.

[0311] *결과*

[0312] mol093v9 및 mol093v11은 pHLA 복합체에 대해 피코몰 수준의 친화도를 보였으며 높은 수준의 CD3 활성 및 FcRn에 대한 결합을 나타냈다. 데이터는 도 3에 나타냈으며 결합 매개 변수는 아래 표에 요약하였다.

[0313]

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (pM)	t1/2 (시간)	CD3 활성 (%)	FcRn 결합
mol93v9	3.55E+05	2.56E-05	7.20E-11	72.02	7.54	83.5%	yes
mol93v11	2.86E+05	1.82E-05	6.38E-11	63.77	10.57	84.1%	yes

[0314] 실시예 4 - 약동학

[0315] 약동학적 특성은 Tg32 SCID 마우스에서 평가되었다. 시험 물질은 1mg/Kg의 용량으로 IV 볼루스로 투여되었으며, 화합물당 4마리의 마우스에 21일 동안 연속적으로 혈액을 샘플링하였다. 샘플은 전기화학 발광 면역 분석법을 사용하여 혈청에서 검출되었으며, 비오틴화된 PRAME 펩타이드-HLA에 포획되었고, 술포-태그된 항-scFv 항체로 검출되었다. 도 4는 4마리의 개별 마우스에 대한 시간에 따른 혈청 농도를 나타낸다. PK 매개변수는 비구획 분석을 통해 추출되었다.

[0316] *결과*

[0317] Mol93v9의 종말 t1/2는 9일로 계산되었다. 비구획 분석 결과는 아래 표에 나타내었다.

[0318]

분자	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (분)	$T_{½}$ (시간)	SEM of $T_{1/2}$ (시간)	AUC_{inf} (시간*ng/ml)	클리어런스 (ml/h/kg)
Mol093v9	21814	5	171	13.0	1515240	0.66

[0319] NONMEM을 사용한 2-구획 모델링 결과는 아래 표에 나타내었다.

매개변수	마우스 (25 g)
CL (mL/h)	0.0211
V_c (mL)	1.24
Q (mL/h)	0.0358
V_p (mL/kg)	3.60
비례 오차 (%)	25.8
$t_{1/2\alpha}$ (hr)	13.2
$t_{1/2\beta}$ (hr)	216

[0320]

[0321] 실시예 5 - 체외 T 세포 활성화

[0322] mol093v9 및 mol093v11은 SLLQHLIGL-HLA-A*02 복합체를 제시하는 세포에 대해 CD3+ T 세포의 강력하고 특이적인 활성화를 매개하는 능력에 대해 평가되었다. 인터페론-γ(IFN-γ 방출은 T 세포 활성화의 지표로 사용되었다.

[0323] *방법*

[0324] 분석은 제조업체의 지침에 따라 인간 IFN-γ ELISPOT 키트(BD Biosciences)를 사용하여 수행하였다. 간단히 말해, 표적 세포를 분석 배지(10% 열 불활성화 FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-L-글루타민을 포함하는 RPMI 1640)에서 $1x10^6$/ml의 농도로 준비하여 50 μl 부피로 웰당 50,000개 세포로 도말하였다. 신선한 공여자 혈액에서 분리한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 효능 세포로 사용하여, 50 μl의 부피로 표적 세포와 대략 1:1 비율로 도말하였다(각 실험에 사용된 PBMC의 정확한 수는 공여자에 따라 다르며 분석에 적합한 범위 내의 반응을 생성하도록 조정될 수 있음). 융합 분자는 10 nM에서 적정하여 최종 농도를 나타내도록 하였고(예상되는 임상적으로 관련된 범위를 포괄함) 50 μl 부피로 웰에 첨가하였다.

[0325] 플레이트는 제조업체의 지침에 따라 준비하였다. 표적 세포, 효능 세포 및 융합 분자를 관련 웰에 첨가하고, 분석 배지로 최종 부피를 200 μl로 만들었다. 모든 반응은 3회 반복으로 수행하였다. 융합 분자를 제외한 대조군 웰도 준비하였다. 그 후 플레이트를 밤새 배양하였다(37℃/5% CO_2). 다음 날, 플레이트를 세척 완충액(탈이온수에 제조한 1xPBS 파우치, 0.05% Tween-20 포함)으로 3회 세척하였다. 그런 다음 1차 검출 항체를 각 웰에 50 μl 부피로 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 배양한 후 다시 3회 세척하였다. 2차 검출은 희석된 스트렙타비딘-HRP를 각 웰에 50 μl 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양한 후 세척 단계를 반복하여 수행하였다. 사용하기 15분 전에 AEC 발색제 1 방울(20 μl)을 AEC 기질 1 ml에 첨가하고 혼합한 다음 각 웰에 50 μl를 첨가하였다. 스팟 발달을 정기적으로 모니터링하였으며, 플레이트를 수돗물로 세척하여 발달 반응을 종료하였다. 플레이트는 실온에서 최소 2시간 동안 건조시킨 후, CTL 분석기와 Immunospot 소프트웨어(Cellular Technology Limited)를 사용하여 스팟을 계수(spot counting)하였다.

[0326] 이 실시예에서는 다음 세포주가 표적 세포로 사용되었다:

[0327] 항원 양성:

[0328] Mel624 - 인간 흑색종 세포주

[0329] NCI-H1755 - 비소세포 폐암(NSCLC) 세포주

[0330] OV56 - 난소 장액성 암 세포주

[0331] THP-1 - 급성 단구성 백혈병 세포주

[0332] NCI-H1703 - 폐 편평세포 암 세포주

[0333] COV318 - 난소 장액성 암 세포주

[0334] 항원 음성:

[0335] TY-KNU - 난소 장액성 선암(HLA-A02-ve; PRAME-ve)

[0336] NCI-H1693 - 비소세포 폐암(NSCLC) 세포주(HLA-A02+ve; PRAME-ve)

[0337] *결과*

[0338] mol093v9 및 mol093v11은 다양한 항원 양성 암 세포 존재 하에서 T 세포의 강력한 활성화를 나타내었다. EC_{50} 값은 데이터로부터 계산되었으며, 두 명의 별도 공여자로부터 얻은 PBMC를 사용하여 얻었다. 두 공여자에 대한 T 세포 활성화 EC_{50} 값은 아래 표에 나타내었다. 도 5는 공여자 1로부터 얻은 데이터를 나타낸다. 항원 음성 세포주에서는 제한된 반응이 관찰되었다.

[0339]

세포주	Mol093v11 EC_{50}		Mol093v9 EC_{50}	
	공여자 1	공여자 2	공여자 1	공여자 2
NCI-H1755	147.6	64.1	69.1	62.9
NCI-H1703	126.6	231.8	120.0	117.0
OV56	9.2	10.8	4.0	5.1
COV318	47.7	37.1	36.3	29.8
THP-1	27.0	19.7	18.0	14.7

[0340] *비교 데이터*

[0341] mol093v9에 의해 유도된 T 세포 활성화는 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만, 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교되었다. 이러한 분자는 WO 2018/234319 및 미국 특허 번호 11,427,624에 기술되어 있으며, 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 통합되어 포함된다. ELISPot 분석은 위에서 설명한 대로 수행되었다. 도 6은 두 분자 모두 유사하게 강력한 T 세포 반응을 유도함을 나타낸다.

[0342] 실시예 6 - T 세포 사멸

[0343] mol093v9 및 mol093v11은 항원 양성 암 세포의 강력하고 특이적인 사멸를 매개하는 능력에 대해 평가되었다.

[0344] *방법*

[0345] 분석은 임피던스 측정을 위한 적절한 96-웰 플레이트(xCELLigence E-plate 96 PET 부품 번호 300600900)를 사용한 xCELLigence 플랫폼 또는 CellPlayer 96-well Caspase-3/7 apoptosis assay kit(Essen BioScience, Cat. No.4440)를 사용한 Incucyte 라이브 셀 이미징 플랫폼을 사용하여 수행하였으며, 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 표적 세포는 각각의 최적 밀도로 도말하였으며(웰당 첨가된 표적의 수는 각 세포주마다 다르며 이전에 최적 조건을 결정하기 위해 적정되었음) 부착을 위해 밤새 배양하였다. 시험 분자를 다양한 농도로 준비하여 각각 50 µl를 관련 웰에 첨가하여 최종 농도가 100 fM과 10 nM 사이가 되도록 하였다. 효능 세포는 10:1의 효능대 표적 세포 비율로 사용하였으며 50 µl로 도말하였다. 융합되지 않은 대조군 샘플도 준비하여 효능 세포만 또는 표적 세포만 포함하는 샘플도 준비하였다. xCELLigence 플랫폼의 경우, 플레이트의 최종 부피는 분석 배지를 사용하여 200 µl로 조정하였다. 세포 용해 백분율은 정규화된 세포 지수(Cell Index;임피던스 측정)를 사용하여 결정하였다. Incucyte 플랫폼의 경우, NucView 분석 시약을 30 µM로 만들어 25 µl를 모든 웰에 첨가하여 최종 부피를 150 µl로 만들었다(최종 농도 5 µM). 각 이미지의 세포 사멸 세포 수를 결정하여 mm^2 당 세포 사멸 세포로 기록하였다. 모든 경우, 분석은 반복으로 수행하였으며 96시간 동안 2시간마다 3회 측정이 이루어졌다.

[0346] *결과*

[0347] 도 7에 제시된 데이터는 xCELLigence 플랫폼을 사용하여 결정한 대로, mol093v9 및 mol093v11 존재 하에서 항원 양성 세포의 실시간 사멸을 나타낸다. EC_{50} 값은 아래 표에 나타내었으며 낮은 pM 범위에 있었다. 항원 음성 세포주의 제한적인 사멸이 검출되었다.

세포주	Mol093v11 EC_{50} (pM)	Mol093v9 EC_{50} (pM)
NCI-H1755	6.2	4.1
NCI-H1703	16.7	12.0
OV56	22.3	14.2
COV318	460.2	111.8

[0348]

[0349] *비교 데이터*

[0350] mol093v9에 의해 유도된 T 세포 활성화는 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만, 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교되었다. 이러한 분자는 WO 2018/234319에 기술되어 있다. 사멸 분석은 위에서 설명한 대로 Incucyte 플랫폼을 사용하여 수행하였다. 도 8은 두 분자 모두 유사하게 강력한 사멸 반응을 유도함을 나타낸다.

[0351] 실시예 7 - 고위험 정상 조직에 대한 최소 반응성

[0352] mol093v9 및 mol093v11의 특이성을 입증하기 위해 위에서 설명한 것과 동일한 ELISPOT 방법을 사용하여 건강한 인간 조직에서 유래한 정상 세포 패널을 표적으로 추가 테스트를 수행하였다. 정상 조직에는 심장, 폐, 신장 및 피부가 포함되었다.

[0353] TCR-항CD3 융합 분자는 건강한 공여자의 PBMC와 공동 배양된 표적 정상 세포 로트에 대해 50 pM에서 10 nM까지 범위의 6가지 다른 농도로 테스트되었다. 융합 분자가 없는 샘플과 정상 세포를 NCI-H1755(항원 양성) 세포로 대체한 샘플을 사용하여 대조 측정을 수행하였다.

[0354] *결과*

[0355] 도 9는 한 PBMC 효과기 공여자에 대해 두 가지 정상 세포 로트(심장 세포(HCM27) 및 폐 상피 세포(HSAEpiC9))로 얻은 데이터를 나타낸다. mol093v9 및 mol093v11의 농도가 1.1 nM 이하인 경우, 정상 세포에 대한 최소한의 T 세포 활성화가 관찰되었다.

[0356] *비교 데이터*

[0357] mol093v9에 대한 정상 세포 반응성은 동일한 PRAME 펩타이드를 표적으로 하지만, 반감기 연장 Fc 도메인을 포함하지 않는 대체 분자와 직접 비교하였다. 이러한 분자는 WO 2018/234319에 기술되어 있다. 도 10은 두 분자 모두 피부(멜라닌 세포) 및 신장(신장 근위 세뇨관)의 정상 세포에 대해 유사한 반응성 부족을 보여줌을 나타낸다.

[0358] 실시예 8 - PIWIL1 펩타이드-MHC 복합체를 표적으로 하는 멀티도메인 단일 사슬 결합 분자는 강력하고 특이적인 T 세포 활성화를 보여줌.

[0359] 추가적인 멀티-도메인 단일 사슬 결합 분자가 설계되었으며, 이는 위에서 설명한 mol093v9와 mol093v11이 PRAME 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 것과 달리 PIWIL1 펩타이드(SLSNRLYYL, 서열번호 56)-MHC 복합체를 표적으로 하는 pMHC 결합 도메인을 포함한다. 최종 분자인 "a40b23U28-mol93"의 전체 서열은 서열번호 55에 기재되어 있다. a40b23U28-mol93의 서열은 TCRα 및 TCRβ가변 도메인을 제외하고 mol093v9와 동일하다. a40b23U28-mol93의 TCRα 가변 및 TCRβ가변 도메인은 각각 GB 출원 번호 2300226.4의 서열번호 28("a40") 및 36("b23")에 해당한다.

[0360] a40b23U28-mol93의 SLSNRLYYL(서열번호 56)-HLA-A*02 복합체에 대한 결합은 위의 실시예 3에서 설명한 대로 SPR을 사용하여 측정되었다. 결합 친화도(K_D)는 50 pM이었고 결합 반감기(t1/2)는 11.8시간이었다. 이러한 결과는 반감기 연장(즉, Fc) 도메인이 없는 동등한 TCR-항CD3 융합 분자와 유사하다.

[0361] a40b23U28-mol93이 T 세포 활성화를 유도하는 능력은 ELISpot 분석을 사용하여 IFNγ분비를 통해 측정되었다. 분석은 제조업체의 지침에 따라 인간 IFN-γELISPOT 키트(BD Biosciences)를 사용하여 수행되었다. 신선한 공여자 혈액에서 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 효능제 세포로 사용되었다. 이 분석에서 KATOIII(위암종) 및 CL11(결장암종)이 항원 양성 표적 세포로 사용되었다. NCI-H1755는 항원 음성 세포로 사용되었다. 데이터는 PRISM 소프트웨어를 사용하여 그래프로 표시되었으며 곡선에서 EC_{50} 값이 계산되었다.

[0362] 도 11은 a40b23U28-mol93이 두 항원 양성 세포주에 대해 낮은 pM 범위의 EC_{50} 값(KATO-III의 경우 42.1 pM 및

CL11의 경우 164.0 pM)을 보였으며, 항원 음성 세포 존재 하에서는 거의 또는 전혀 반응하지 않았음(a40b23U28-mol93 농도가 1 nM 미만인 경우)을 보여준다. 반감기 연장(즉, Fc) 도메인이 없는 동등한 TCR-항CD3 융합 분자는 KATO-III 및 CL11 세포에 대해 각각 12.9 pM 및 52.7 pM의 EC_{50}를 가졌다.

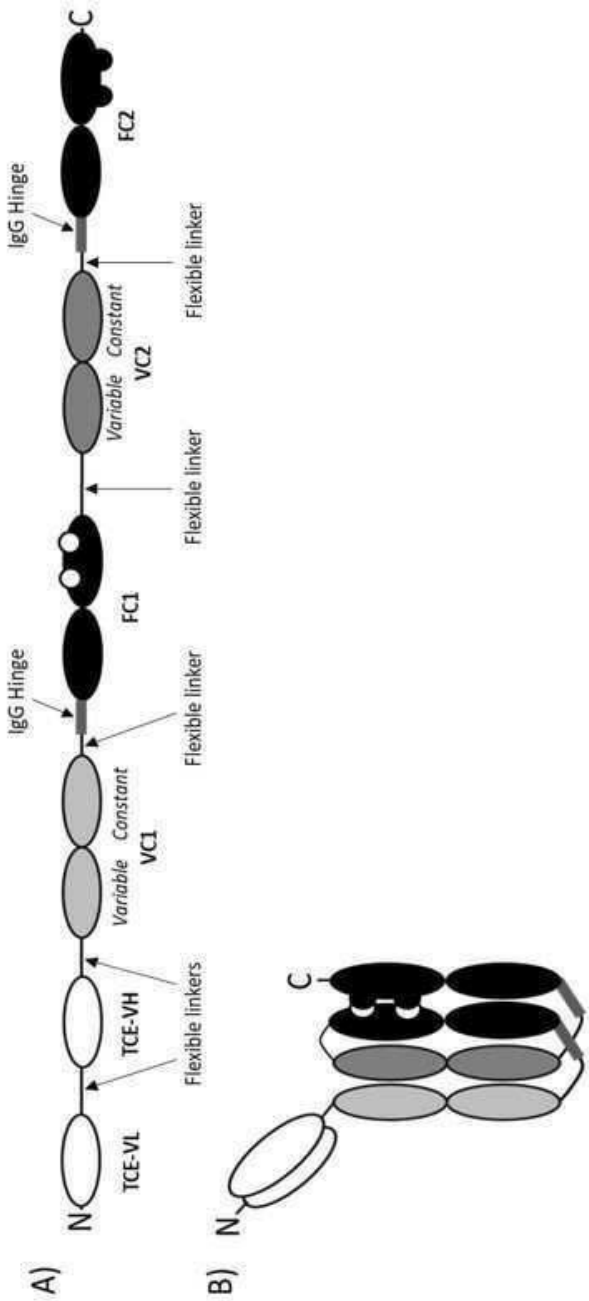
[0363] 이러한 데이터는 PIWIL1 펩타이드-MHC 복합체를 표적으로 하는 pMHC 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 멀티-도메인 단일 사슬 결합 분자가 반감기 연장(즉, Fc) 도메인이 없는 동등한 TCR-항CD3 융합 분자와 비교할 만한 높은 친화도와 효능을 유지하며 항원 양성 세포에 대한 특이성을 유지함을 보여준다.

[0364] 추가 실험에서 a40b23U28-mol93은 대체 멀티-도메인 분자 형식인 a40b23U28-mol14와 비교되었다. a40b23U28-mol14는 도 12에서 나타나는 것처럼 두 사슬 형식으로 배열된 점을 제외하고 a40b23U28-mol93과 동일한 개별 도메인 아미노산 서열을 가지고 있다. 이 두 사슬 형식에서, 첫 번째 사슬(도 12의 왼쪽 사슬)은 N말단에서 C말단 방향으로 TCR 알파 사슬 가변 도메인, TCR 알파 사슬 불변 도메인 및 Fc 영역을 포함한다. 두 번째 사슬(도 12의 오른쪽 사슬)은 N말단에서 C말단 방향으로 항-CD3 scFv, TCR 베타 사슬 가변 도메인, TCR 베타 사슬 불변 도메인 및 Fc 영역을 포함한다. KATOIII 세포주에 대한 T 세포 활성화가 두 분자 간에 비교되었다. 도 12에서 볼 수 있듯이, 두 분자 모두 T 세포 활성화를 유도하지만, Mol93은 Mol14보다 더 강력한 반응을 보인다.

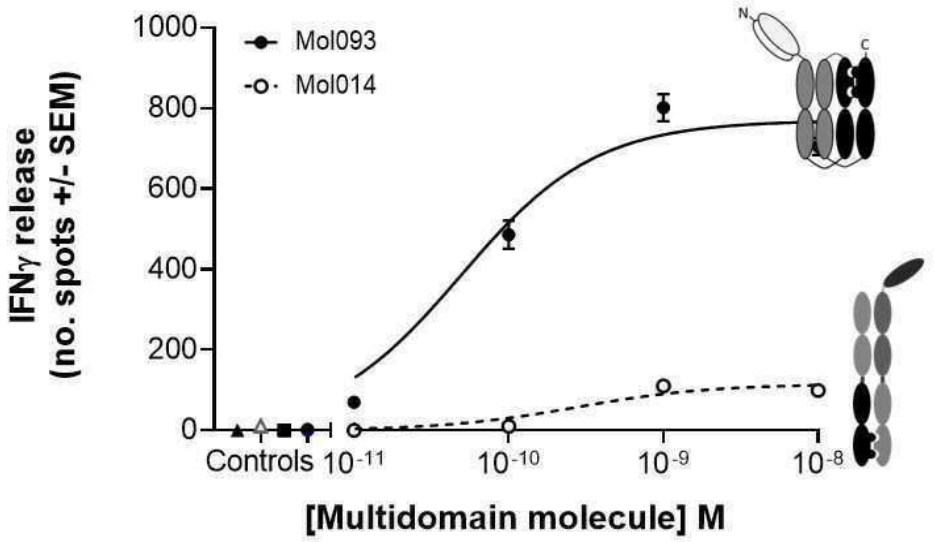
[0365] 상기 실시예에서 설명된 결과는 PIWIL1 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 TCR 가변 도메인이 본 발명의 멀티-도메인 단일 사슬 결합 분자에 통합될 수 있음을 보여준다. 다시 말해, 사용된 특정 TCR 서열(즉, PRAME 펩타이드-MHC 또는 PIWIL1 펩타이드-MHC를 표적으로 하는)에 관계없이, 멀티-도메인 단일 사슬 형식은 표적에 대한 친화도나 T 세포 활성화의 효능에 상당한 영향을 주지 않고 (Fc 도메인 제공을 통해) 반감기를 연장하는 데 효과적이다.

도면

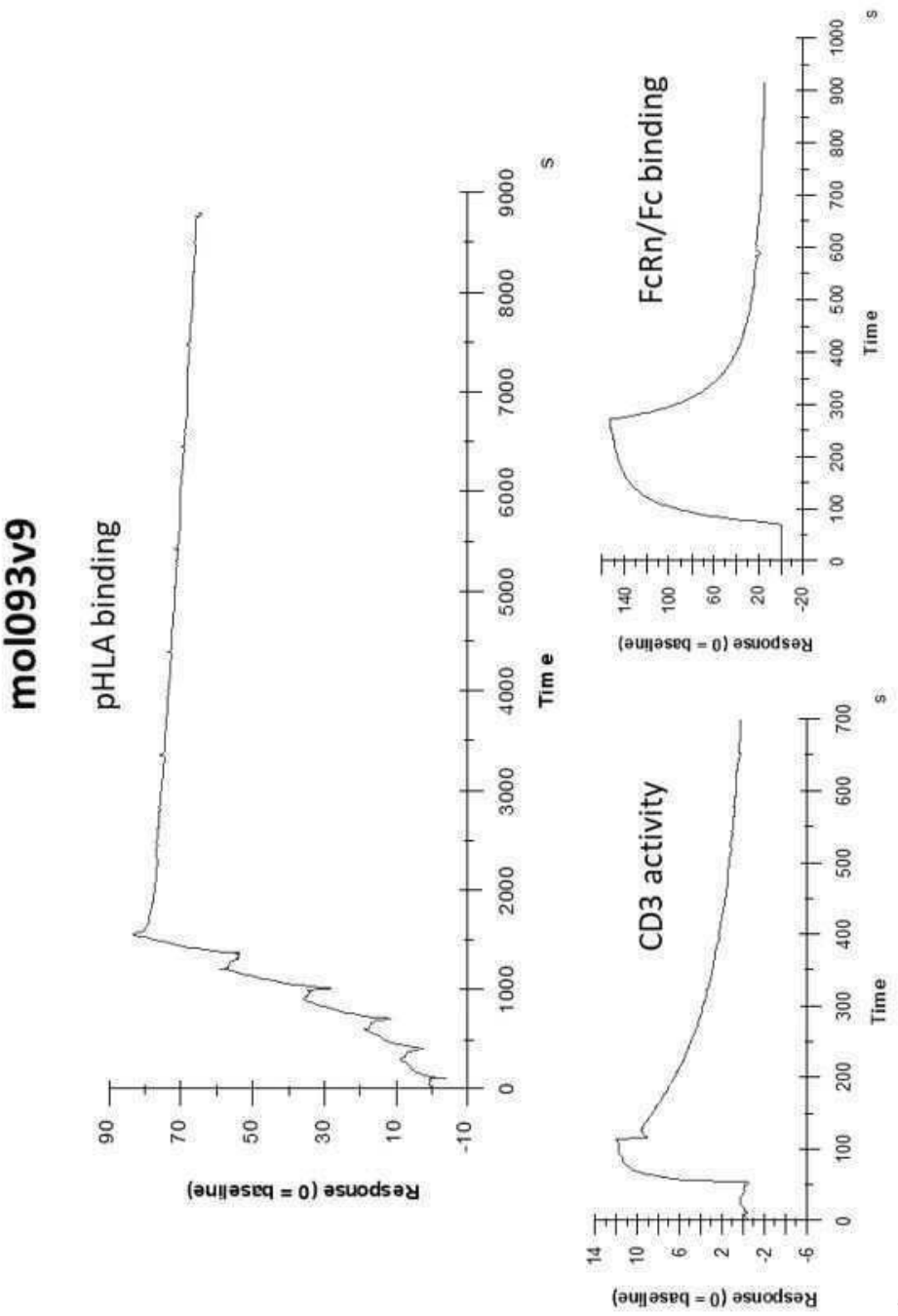
도면1


C
FC2
IgG Hinge
Flexible linker
Constant
Variable
VC2
Flexible linker
FC1
IgG Hinge
Flexible linker
Constant
Variable
VC1
Flexible linkers
TCE-VH
TCE-VL
N
A)
C
N
B)

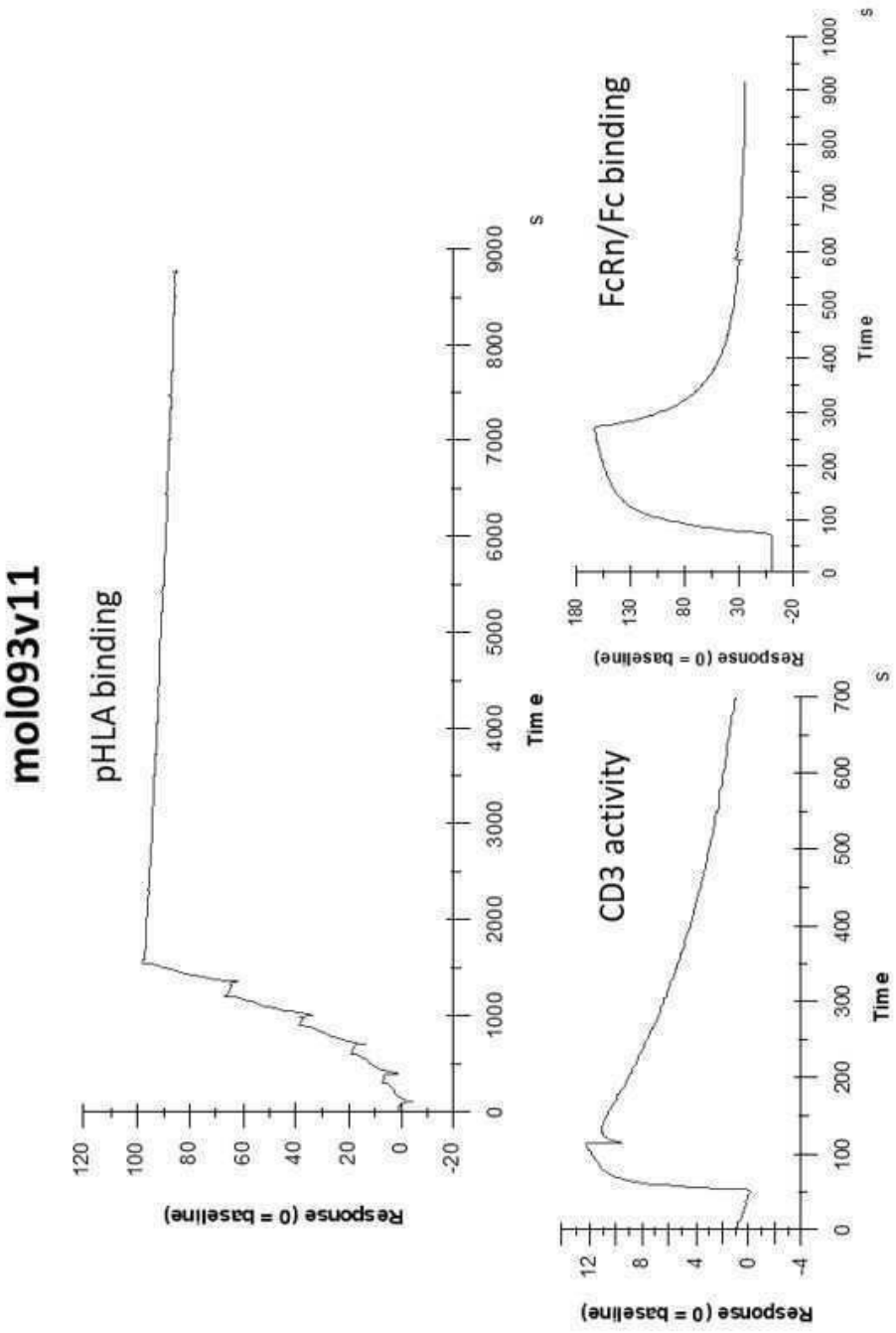
도면2


1000
800
600
400
200
0
Mol093
Mol014
IFNγ release
(no. spots +/- SEM)
Controls
10-11
10-10
10-9
10-8
[Multidomain molecule] M
N
C

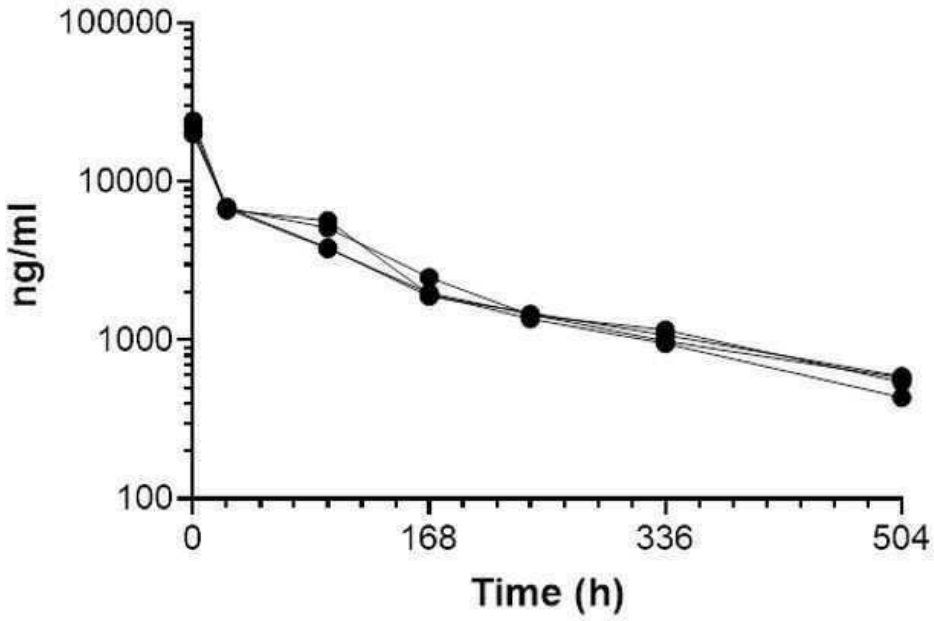
도면3a


mol093v9
pHLA binding
Response (0 = baseline)
Time
s
FcRn/Fc binding
CD3 activity

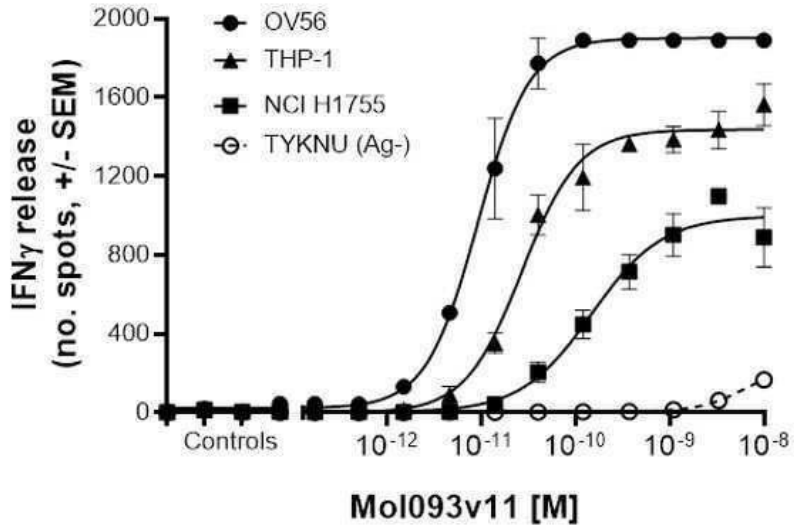
도면3b


mol093v11
pHLA binding
Response (0 = baseline)
Time
s
FcRn/Fc binding
CD3 activity

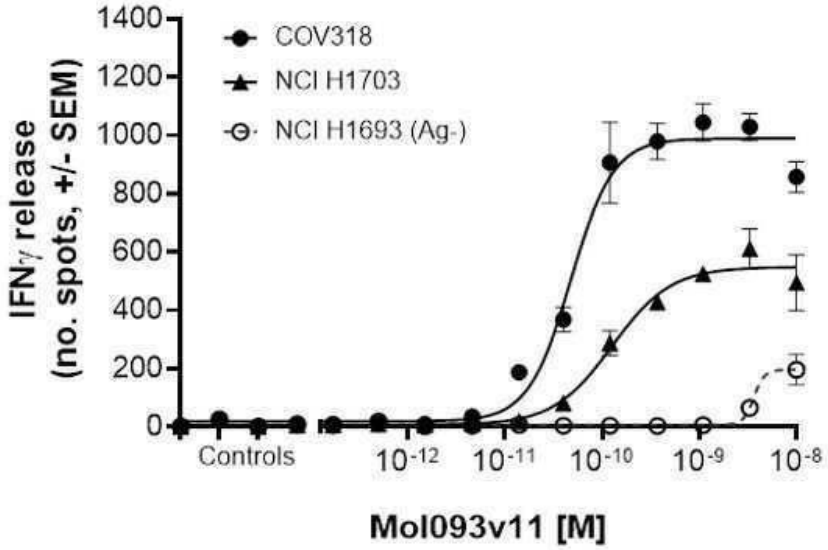
도면4


100000
10000
1000
100
ng/ml
0
168
336
504
Time (h)

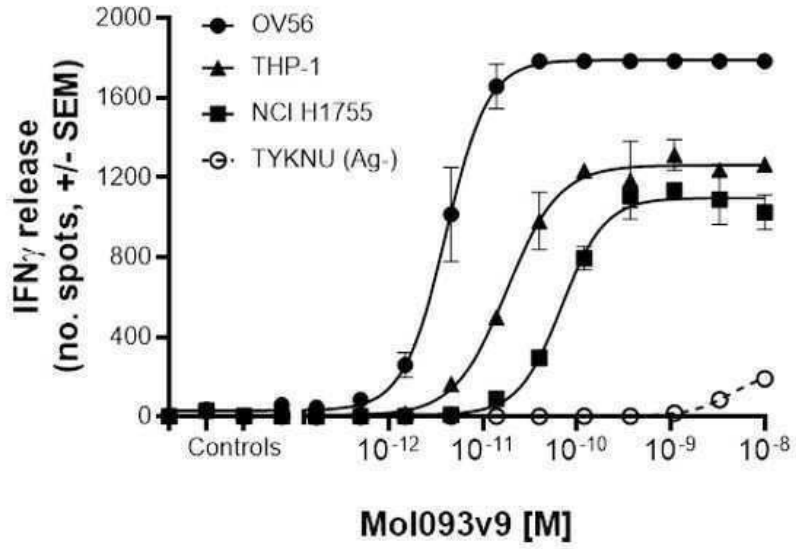
도면5a


2000
1600
1200
800
400
0
IFNγ release
(no. spots, +/- SEM)
OV56
THP-1
NCI H1755
TYKNU (Ag-)
Controls
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v11 [M]

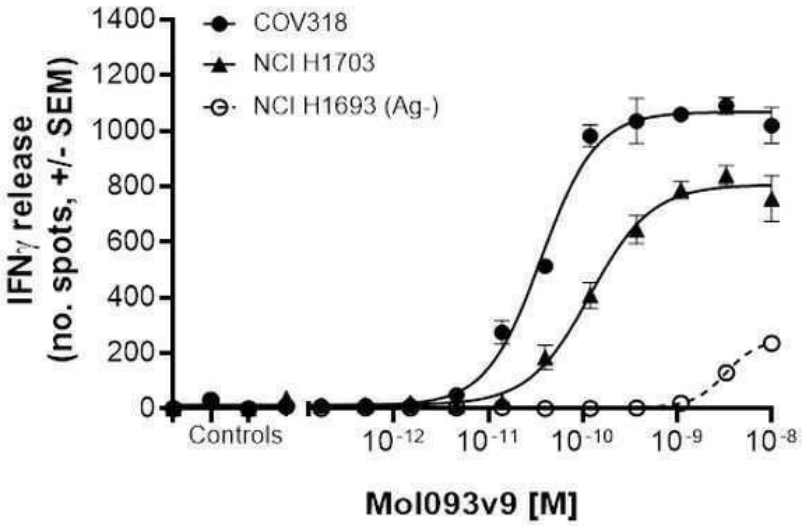
도면5b


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IFNγ release
(no. spots, +/- SEM)
COV318
NCI H1703
NCI H1693 (Ag-)
Controls
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v11 [M]

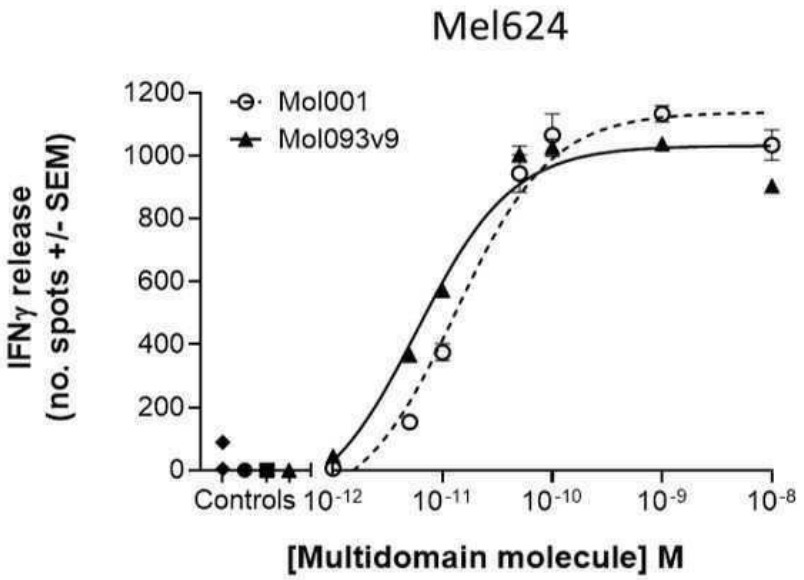
도면5c


2000
1600
1200
800
400
0
IFNγ release
(no. spots, +/- SEM)
OV56
THP-1
NCI H1755
TYKNU (Ag-)
Controls
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v9 [M]

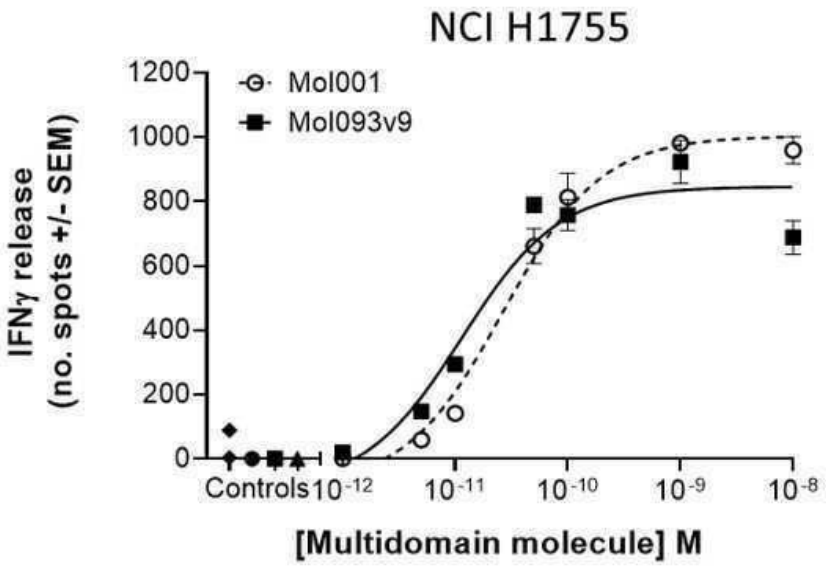
도면5d


COV318
NCI H1703
NCI H1693 (Ag-)
IFNγ release
(no. spots, +/- SEM)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Controls
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v9 [M]

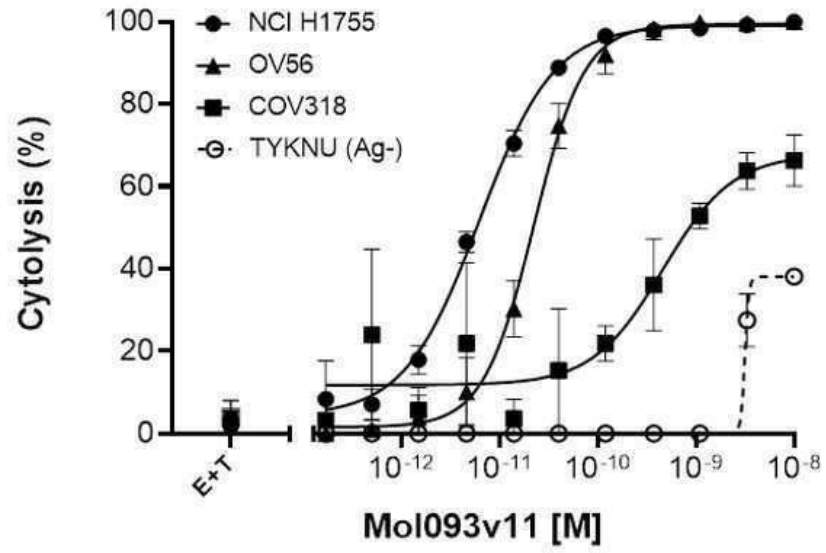
도면6a


Mel624
Mol001
Mol093v9
IFNγ release
(no. spots +/- SEM)
1200
1000
800
600
400
200
0
Controls 10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
[Multidomain molecule] M

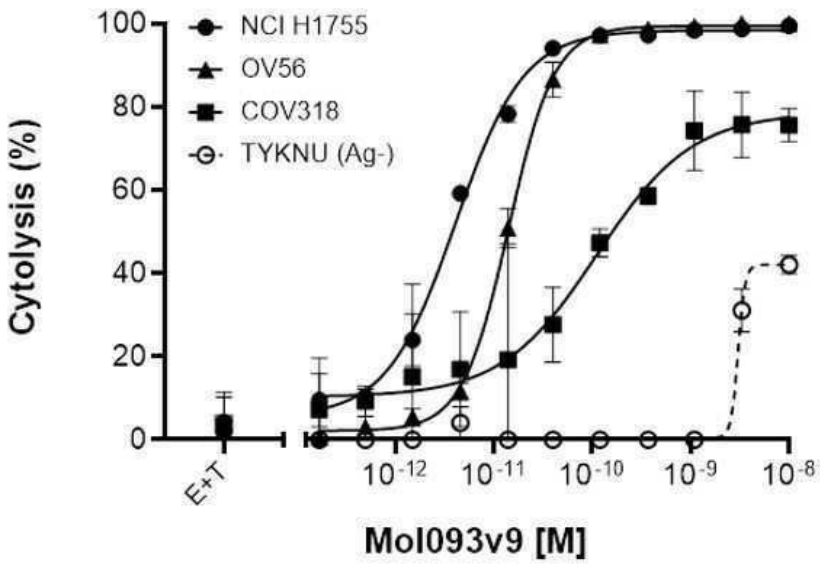
도면6b


NCI H1755
Mol001
Mol093v9
IFNγ release
(no. spots +/- SEM)
1200
1000
800
600
400
200
0
Controls
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
[Multidomain molecule] M

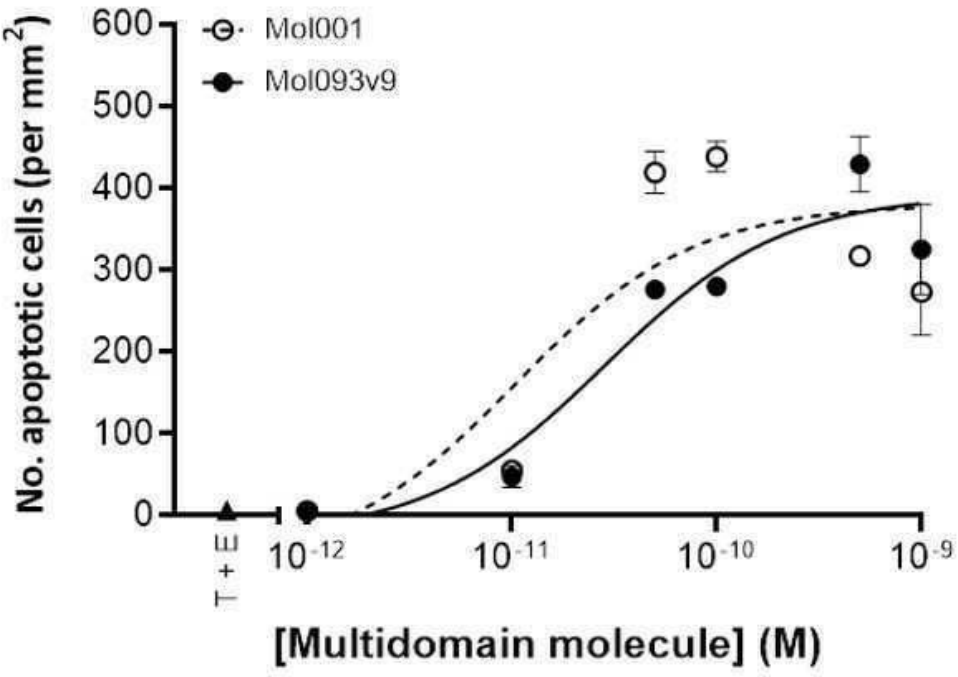
도면7a


NCI H1755
OV56
COV318
TYKNU (Ag-)
Cytolysis (%)
100
80
60
40
20
0
E+T
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v11 [M]

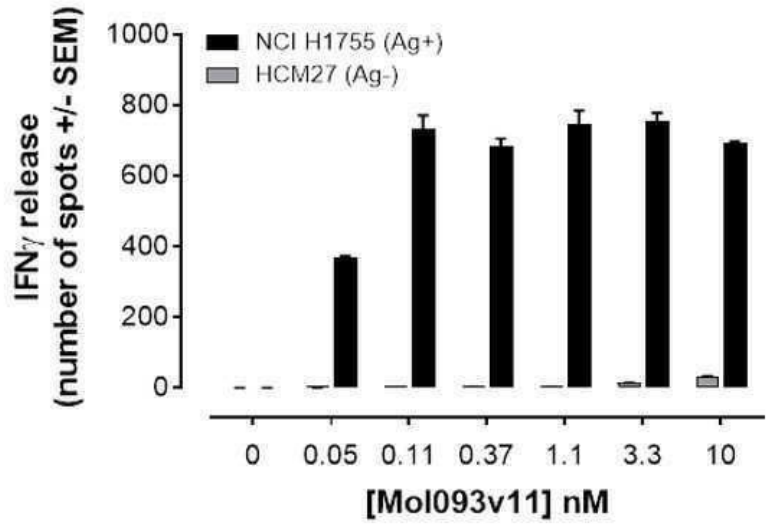
도면7b


100
80
60
40
20
0
Cytolysis (%)
NCI H1755
OV56
COV318
TYKNU (Ag-)
E+T
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
Mol093v9 [M]

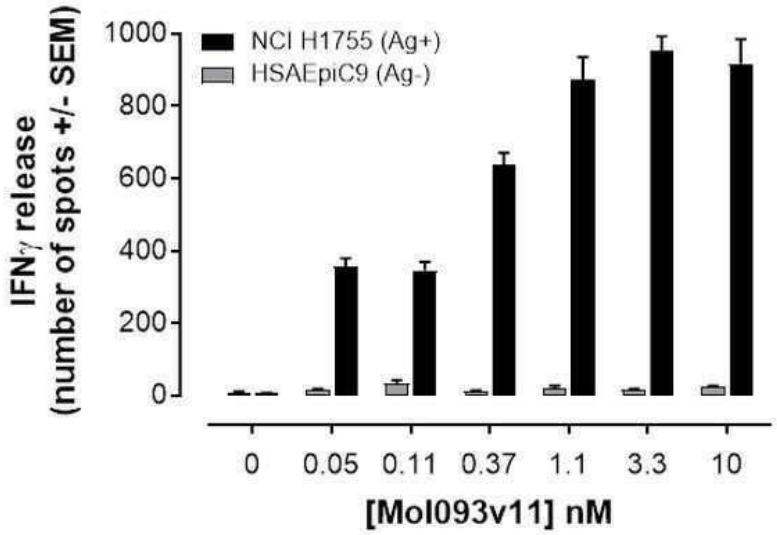
도면8


600
500
400
300
200
100
0
No. apoptotic cells (per mm2)
Mol001
Mol093v9
E+T
10-12
10-11
10-10
10-9
[Multidomain molecule] (M)

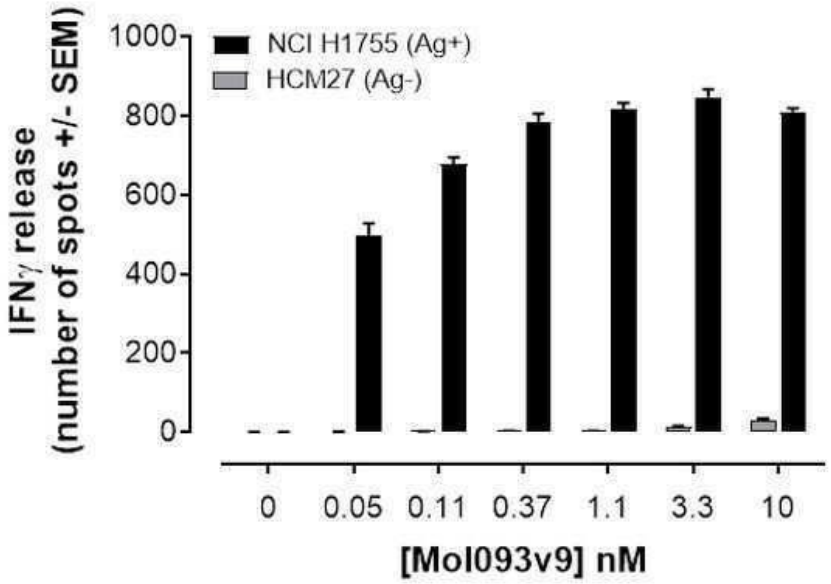
도면9a


NCI H1755 (Ag+)
HCM27 (Ag-)
IFNγ release
(number of spots +/- SEM)
1000
800
600
400
200
0
0
0.05
0.11
0.37
1.1
3.3
10
[Mol093v11] nM

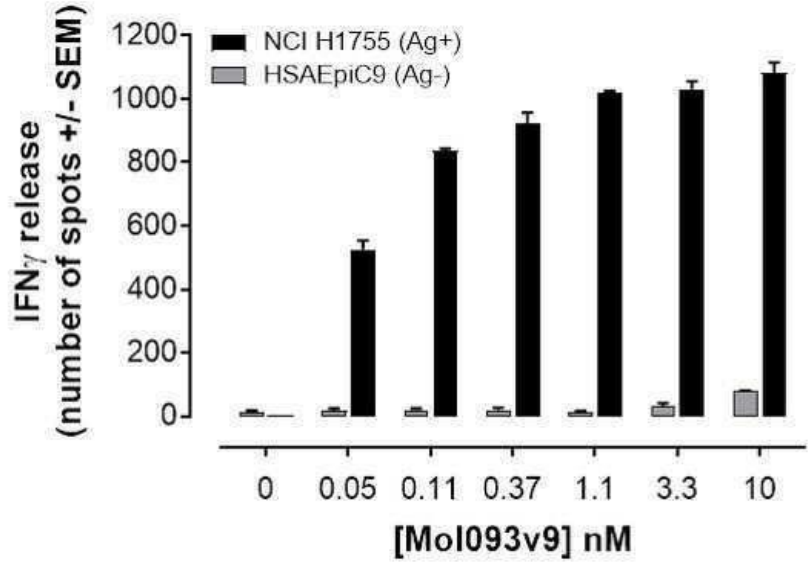
도면9b


NCI H1755 (Ag+)
HSAEpiC9 (Ag-)
IFNγ release
(number of spots +/- SEM)
1000
800
600
400
200
0
0
0.05
0.11
0.37
1.1
3.3
10
[Mol093v11] nM

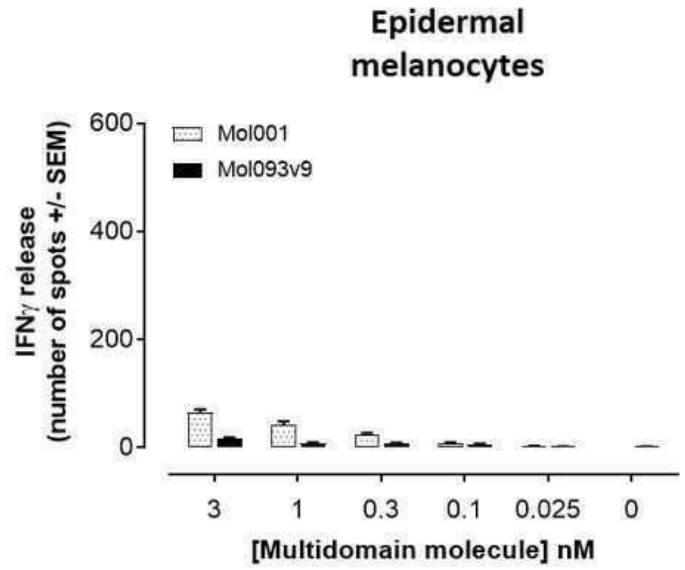
도면9c


NCI H1755 (Ag+)
HCM27 (Ag-)
IFNγ release
(number of spots +/- SEM)
1000
800
600
400
200
0
0
0.05
0.11
0.37
1.1
3.3
10
[Mol093v9] nM

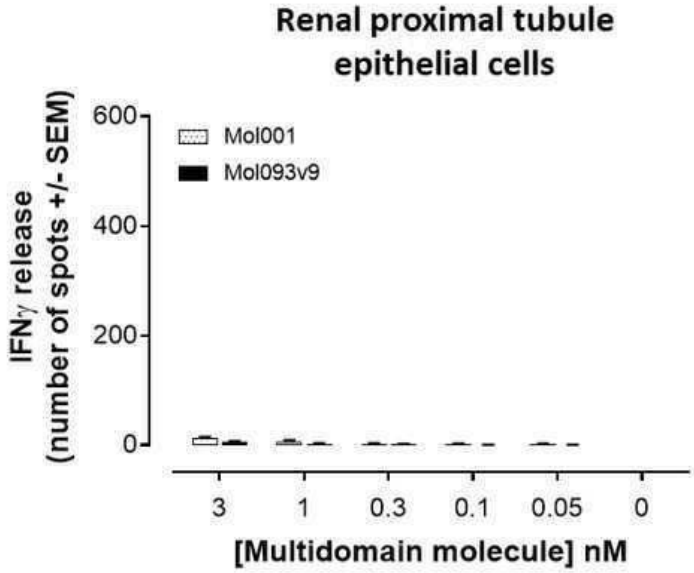
도면9d


NCI H1755 (Ag+)
HSAEpiC9 (Ag-)
IFNγ release
(number of spots +/- SEM)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
0.05
0.11
0.37
1.1
3.3
10
[Mol093v9] nM

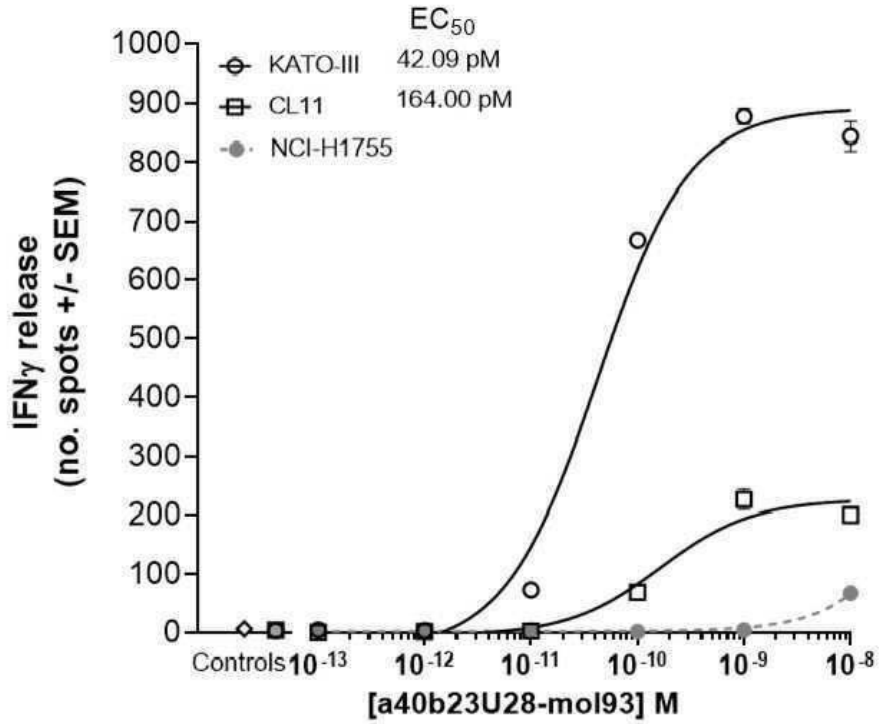
도면10a


Epidermal melanocytes
IFNγ release (number of spots +/- SEM)
600
400
200
0
Mol001
Mol093v9
3
1
0.3
0.1
0.025
0
[Multidomain molecule] nM

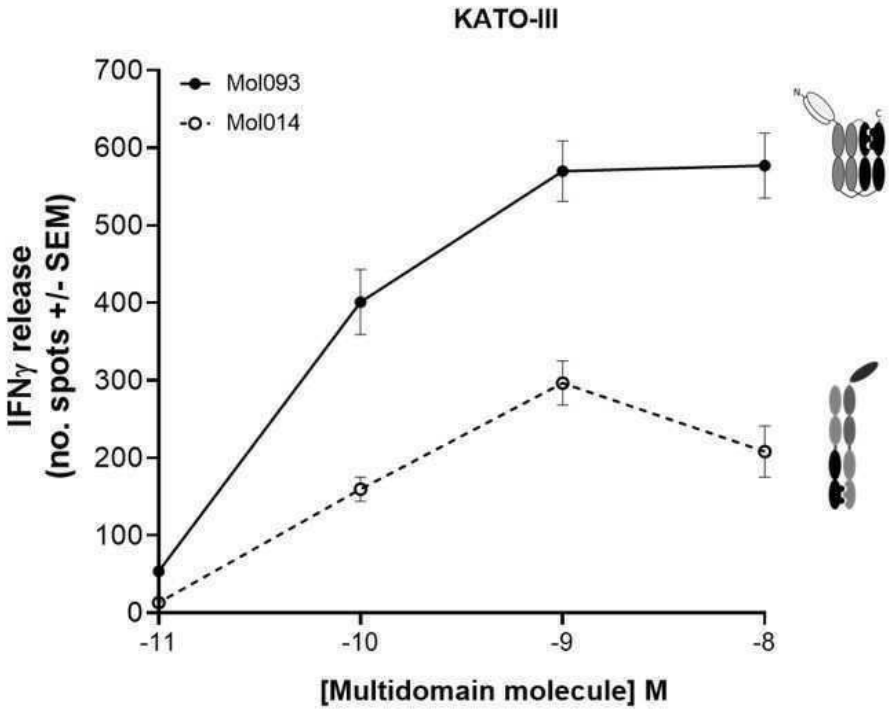
도면10b


Renal proximal tubule epithelial cells
IFNγ release (number of spots +/- SEM)
600
400
200
0
Mol001
Mol093v9
3
1
0.3
0.1
0.05
0
[Multidomain molecule] nM

도면11


EC50
KATO-III 42.09 pM
CL11 164.00 pM
NCI-H1755
IFNγ release (no. spots +/- SEM)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Controls
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
[a40b23U28-mol93] M

도면12


KATO-III
Mol093
Mol014
IFNγ release (no. spots +/- SEM)
700
600
500
400
300
200
100
0
-11
-10
-9
-8
[Multidomain molecule] M

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.