



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0040586
(43) 공개일자 2025년03월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7043084
(22) 출원일자(국제) 2023년06월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/066062
(87) 국제공개번호 WO 2023/242319
국제공개일자 2023년12월21일
- (30) 우선권주장
22179264.1 2022년06월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
라바 테라퓨틱스 엔.브이.
네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 62
- (72) 발명자
파렌 폴 빌렘 앙리 이다
네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60
루버스 로베르투스 코르넬리스
네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

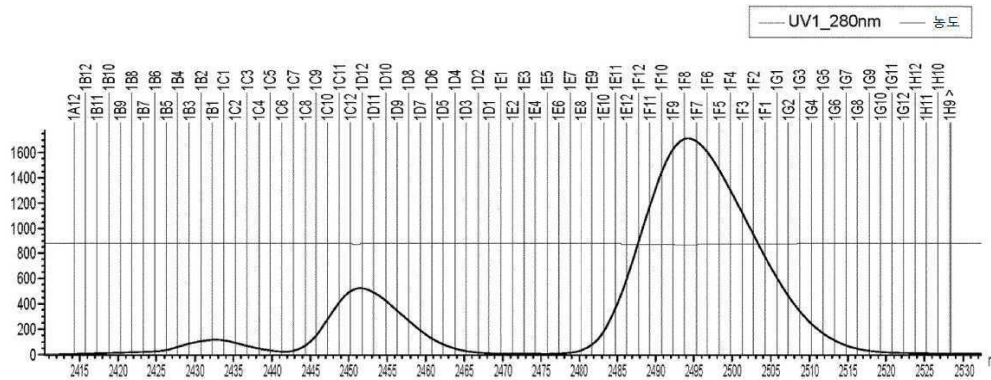
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 감마-델타 T 세포 수용체에 결합하는 변이체 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 V γ 9V δ 2 T 세포 수용체에 결합할 수 있는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 약학 조성물 및 본 발명의 항체의 의학적 치료 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 16/3069 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)

(72) 발명자

반 데르 블리에트 요하네스 젤
 네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60
루트제 홀식 데이비드
 네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60
마히엘센 페터 알렉산더 게라르두스 마리아
 네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60
반 베스테르호벤 미힐
 네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60

킹 리사 안나

네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60

페네만 펠릭스-렌나르트

네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60

무셋 살롯 메레트

네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60

아당 안톤 에그베르트 페터

네덜란드 3584 씨엠 위트레흐트 예일란 60

명세서

청구범위

청구항 1

인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체로서, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 12에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 13에 제시된 CDR2 서열 및 서열 번호 14에 제시된 CDR3 서열을 포함하는, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이거나,

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이거나,

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이거나, 또는

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)인, 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이고 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이거나, 또는

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이고 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)인, 항체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이거나, 또는

서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)인, 항체.

청구항 5

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체인, 항체.

청구항 6

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은:

서열 번호 16에 제시된 서열, 또는

서열 번호 16에 제시된 서열에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성되며, 이 때 X1은 S(Ser)이고, X2는 F(Phe)이고 X3은 A(Ala)인, 항체.

청구항 7

인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체로서, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 17, 18, 19, 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는, 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 다음을 포함하는 항체:

- (a) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 17의 CDR3 서열;
- (b) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 18의 CDR3 서열;
- (c) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 19의 CDR3 서열; 또는
- (d) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 20의 CDR3 서열.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 25, 26, 27, 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성되는, 항체.

청구항 10

인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체로서, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 21, 22, 23, 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는, 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 다음을 포함하는 항체:

- (a) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 21의 CDR3 서열;
- (b) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 22의 CDR3 서열;
- (c) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 23의 CDR3 서열; 또는
- (d) 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 24의 CDR3 서열.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 29, 30, 31, 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성되는, 항체.

청구항 13

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 제2 항원 결합 영역을 추가로 포함하고 제2 항원 결합 영역은 바람직하게는 단일 도메인 항체인, 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 항체는 이중특이성 항체인, 항체.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 제2 항원 결합 영역은 CD123, PSMA, CD1d, CD40, 및 벡틴 4에서 선택된 항원에 결합할 수 있는, 항체.

청구항 16

제15항에 있어서:

- (a) 제2 항원 결합 영역은 CD123에 결합할 수 있고 서열 번호 37의 CDR1 서열, 서열 번호 38의 CDR2 서열, 및 서열 번호 39의 CDR3 서열을 포함하거나;
- (b) 제2 항원 결합 영역은 PSMA에 결합할 수 있고 서열 번호 41의 CDR1 서열, 서열 번호 42의 CDR2 서열, 및 서열 번호 43의 CDR3 서열을 포함하거나;
- (c) 제2 항원 결합 영역은 CD1d에 결합할 수 있고 서열 번호 45의 CDR1 서열, 서열 번호 46의 CDR2 서열, 및 서열 번호 47의 CDR3 서열을 포함하거나;
- (d) 제2 항원 결합 영역은 CD40에 결합할 수 있고 서열 번호 49의 CDR1 서열, 서열 번호 50의 CDR2 서열, 및 서

열 번호 51의 CDR3 서열을 포함하거나; 또는

(e) 제2 항원 결합 영역은 넥틴 4에 결합할 수 있고 서열 번호 53, 57, 61, 65, 69, 73, 및 77에서 선택된 CDR1 서열, 서열 번호 54, 58, 62, 66, 70, 74, 및 78에서 선택된 CDR2 서열, 및 서열 번호 55, 59, 63, 67, 71, 75, 및 79에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는, 항체.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서:

(a) 제2 항원 결합 영역은 CD123에 결합할 수 있고 서열 번호 40을 포함하거나 이로 구성되거나;

(b) 제2 항원 결합 영역은 PSMA에 결합할 수 있고 서열 번호 44를 포함하거나 이로 구성되거나;

(c) 제2 항원 결합 영역은 CD1d에 결합할 수 있고 서열 번호 48을 포함하거나 이로 구성되거나;

(d) 제2 항원 결합 영역은 CD40에 결합할 수 있고 서열 번호 52를 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

(e) 제2 항원 결합 영역은 넥틴 4에 결합할 수 있고 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있는, 항체.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 항원 결합 영역과 제2 항원 결합 영역은 펩티드 링커를 통해 공유적으로 연결되는, 항체.

청구항 19

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 반감기 연장 도메인, 예를 들어, Fc 영역을 추가로 포함하는, 항체.

청구항 20

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 Fc 영역을 포함하고, 이 때 Fc 영역은 2개 Fc 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이며, 이때 제1 항원-결합 영역은 제1 Fc 폴리펩티드에 융합되며, 제2 항원-결합 영역은 제2 Fc 폴리펩티드에 융합되고, 이때 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 동종이량체의 형성보다는 이중이량체의 형성을 선호하는 비대칭 아미노산 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, Fc 폴리펩티드의 CH3 영역은 전술한 비대칭 아미노산 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 제1 Fc 폴리펩티드는 T366W 치환을 포함하고, 제2 Fc 폴리펩티드는 T366S, L368A 및 Y407V 치환을 포함하거나, 또는 이의 반대를 포함하고, 이 때 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따라 인간 IgG1에 상응하는, 항체.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 234 및/또는 235에서 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 L234F 및 L235E 치환을 포함하고, 이때 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따라 인간 IgG1에 상응하는, 항체.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 83에 제시된 서열을 포함하고 제2 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 84에 제시된 서열을 포함하거나, 또는

제1 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 84에 제시된 서열을 포함하고 제2 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 83에 제시된 서열을 포함하는, 항체.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 다음을 포함하거나 다음으로 구성되는, 항체:

서열 번호 86에 제시된 서열, 및

서열 번호 87, 서열 번호 88, 서열 번호 89 및 서열 번호 90에 제시된 서열들의 군에서 선택된 서열.

청구항 25

전술한 청구항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 26

약제로서 사용하기 위한, 바람직하게는 암 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 약학 조성물.

청구항 27

치료를 필요로 하는 인간 대상체에 대한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체의 투여를 포함하는, 질환의 치료 방법.

청구항 28

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 구조체.

청구항 29

제28항의 핵산 구조체를 포함하는 발현 벡터.

청구항 30

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 구조체를 포함하는 숙주 세포.

청구항 31

항체를 제작하는 방법으로서, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함하고, 이 때 숙주 세포는 바람직하게는 중국 햄스터 난소 세포, 인간 배아 신장 세포 또는 피키아 파스토리스 세포인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 6월 15일에 출원된 EP 22179264.1에 대한 우선권을 주장하며, 해당 내용은 본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 전자 버전

[0004] 전자 서열 목록(LVAT_024_01WO_SeqList_ST26.xml; 크기: 101,824바이트; 작성일: 2023년 6월 14일)의 내용은 본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 인간 $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포 수용체의 $V\delta 2$ 사슬에 결합할 수 있는 새로운 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 약학 조성물 및 의학적 치료를 위한 본 발명의 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 발명의 배경

[0008] 감마-델타($\gamma\delta$) T 세포는 감마 사슬과 델타 사슬로 구성된 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포이다. 대부분의 $\gamma\delta$ T 세포는 $V\gamma 9$ 와 $V\delta 2$ 영역을 포함하는 TCR을 발현한다. $V\gamma 9V\delta 2$ T 세포는 다양한 병원균과 종양 세포

에 반응할 수 있다. 이러한 광범위한 반응성은 TCR 의존적 방식으로 이 T 세포 하위집단을 특이적으로 활성화할 수 있는 인산항원(phosphoantigens)에 의해 부여되는 것으로 이해된다. V γ 9V δ 2 T 세포의 광범위한 항균 및 항암 반응성은 암과 감염에 대한 면역 조절에 직접적으로 관여함을 시사한다.

[0009] V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화 할 수 있는 제제는 병원체나 감염된 세포 또는 암 세포에 대한 V γ 9V δ 2 T 세포의 반응을 증진시킬 수 있으므로 감염이나 암 치료에 유용할 수 있다. WO2015156673은 V γ 9V δ 2 TCR에 결합하고 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화 할 수 있는 항체를 설명한다. WO2020060405는 V γ 9V δ 2 T 세포와 종양 세포 표적 모두에 결합하여, 이를 통해 V γ 9V δ 2 T 세포를 종양으로 동원하여 치료 효과를 자극할 수 있는 잠재력을 가진 이중 특이성 항체를 설명한다.

발명의 내용

[0010] **발명의 요약**

[0011] 숙주 세포에서 항체를 재조합적으로 생산하면 종종 폴리펩티드 사슬의 번역 후 변형 유형과 정도가 다양한, 서로 다른 형태의 항체를 포함하는 이질적인 생성물들이 생긴다. 이러한 이질성은 의학적 용도를 위한 항체 생성물에 대해서는 바람직하지 않은데, 왜냐하면 번역 후 변형으로 인해, 예를 들어, 표적 항원에 대한 친화도, 약동학적 특성, 생성물 안정성, 응집 등의 측면에서 항체의 기능적 특성이 변경될 수 있기 때문이다.

[0012] 본 발명은 숙주 세포에서 생산 시 더욱 균질한 생성물을 생성하면서도 표적 결합 및 표적 세포에 대한 기능적 효과와 관련한 우수한 기능적 특성, 뿐만 아니라 안정성과 같은 우수한 구조적 특성을 유지하는 개선된 V γ 9V δ 2 TCR 결합 항체 서열을 제공한다.

[0013] V γ 9V δ 2-TCR 결합 항체 5C8(WO 2015/156673에 기술됨)을 포함하는 이중특이성 항체를 포유류 세포에서 생산한 결과, 항체 분자의 하위집단이 5C8의 CDR3 영역 내에서 단백질 분해로 인해 절단되어 항체 생성물의 이질성이 발생하는 것으로 나타났으며, 이는 정제된 단백질의 질량 분석에 의해 확인되었다. 이러한 절단은 내부단백질 분해가 일어나기 쉬운 것으로 예상되지 않는 서열에서 발생한다. 게다가 놀랍게도, 단백질분해 절단 부위 바로 앞의 잔기는 이러한 잔기가 CDR3 영역에 위치한다 하더라도 항체의 항원 결합 특성에 영향을 미치지 않고 돌연변이될 수 있다. CDR3 영역은 항체의 항원 결합 영역에서 항원 결합 특이도의 주요 결정인자로 알려져 있다.

[0014] 나아가, 본 발명의 발명자들은 항체 5C8이 번역 후 변형이 일어날 것으로 예상되지 않았던 항체 부위에서 황산화 되는 것을 발견했다. 황산화는 다양한 숙주 세포에서 부분적으로 발생하여 이질성 항체 생성물 또한 생성하였다. 놀랍게도 황산화가 일어나게 되는 티로신 잔기는 해당 아미노산이 CDR3 영역에 위치하더라도 항체의 항원 결합 특성에 영향을 미치지 않고 돌연변이될 수 있다. 돌연변이를 통해 황산화 부위를 제거함으로써 더 균질한 항체 생성물이 생성되었다.

[0015] 따라서, 제1 양상에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체를 제공하며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 12에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 13에 제시된 CDR2 서열 및 서열 번호 14에 제시된 CDR3 서열을 포함한다.

[0016] 추가 양상에서, 본 발명은 본 명세서에서 정의된 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 결합 영역 및 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함하는 이중특이성 항체를 제공하며, 이 때 제2 항원은 인간 EGFR, CD123, PSMA, CD1d, CD40 및 넥틴 4에서 선택된다. 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 포함하는 약학 조성물, 의학적 치료에 있어서 본 발명의 항체의 용도, 및 핵산 구조체, 본 발명의 항체를 생산하기 위한 발현 벡터 및 이러한 핵산 구조체 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 더욱 균질한 생성물을 생산하는 발명의 항체를 생산하는 공정에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 추가적인 양상 및 실시형태는 아래에 설명되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도면의 간단한 설명**

도 1: Superdex-75 컬럼을 사용하여 정제된 단백질 A LAVA 화합물(VHH 5C8)의 크기 배제 프로파일의 대표적인 크로마토그램. 우세한 단량체 피크의 분획(분획 1E11-1G2)을 모아 정량화했다.

도 2: 정제된 VHH 5C8의 랩칩 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동의 대표적인 예. 왼쪽: 비환원 조건, 오른쪽: 환원 조건.

도 3: 정제된 VHH 5C8(A) 및 VHH 5C8var1(B)의 HP-SEC 프로파일.

도 4: 정제된 이중특이성 VHH(bsVHH) 1D12var5-5C8var1의 대표적인 HP-SEC 프로파일. A: 피키아 파스토리스의 상층액으로부터 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통해 발현 및 정제된 bsVHH 1D12var5-5C8var1 배치. B: 단백질 A와 크기 배제 크로마토그래피를 통해 HEK-293 E 세포로부터 발현 및 정제된 bsVHH 1D12var5-5C8var1 배치.

도 5: 비환원 조건하에서 정제된 VHH 5C8var1-Y105F 및 5C8var1-Y105S의 랩칩 분석.

도 6: VHH 5C8var1-Y105F(A) 및 5C8var1-Y105S(B)의 HP-SEC 분석.

도 7: BLI를 사용하여 재조합 V_γ9V_δ2-TCR 단백질에 대한 VHH 단편 결합의 친화도 측정. 단백질 질량(반응, nm)은 시간의 함수로 플롯된다. 점선 수직선은 결합 단계(왼쪽)를 해리 단계(오른쪽)와 구분한다. A: VHH 5C8var1; B: VHH 5C8var1-Y105F; C: VHH 5C8var1-Y105S. 직선인 검은색 선은 실제 측정된 반응에 적합한 데이터를 나타낸다.

도 8: bsVHH 7D12var8-5C8var1-Y105F와 bsVHH 7D12-5C8은 모두 강력한 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화를 유도하고 V_γ9V_δ2 T 세포 매개 종양 세포 용해를 일으킨다. A: 4시간 탈과립화 검정: CD107A(LAMP-1)+ V_γ9V_δ2 T 세포의 백분율을 사용된 항체 농도의 함수로 플롯한다. 왼쪽: 7D12-5C8(비인간화); 오른쪽: 7D12var8-5C8var1-Y105F. B: A431 종양 세포 사멸의 백분율을 사용된 항체 농도의 함수로서 보여주는 24시간 세포독성 검정법. 왼쪽: 7D12-5C8(비인간화); 오른쪽: 7D12var8-5C8var1-Y105F.

도 9: 유세포 분석기를 사용하여 건강한 인간 PBMC에서 분리한 1차 V_γ9V_δ2 T 세포에 대한 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc의 결합. 두 패널은 두 명의 다른 기증자를 나타낸다.

도 10: 세포 기반 ELISA를 통한 종양 세포 상의 EGFR에 대한 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc 결합.

도 11: A431 세포주에 의존하는 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc에 의해 유도된 V_γ9V_δ2 T 세포(_{γδ} T 세포로 표시)의 탈과립화.

도 12: V_γ9V_δ2 T 세포(GDT 세포로 표시) 및 7D12-5C8과 공동 배양한 A-388 세포의 생존력.

도 13: 해리된 종양 세포 현탁액(1차 CRC: n=10, 복막 CRC 전이: n=5, 간 CRC 전이: n=3, 1차 HNSCC: n=5, 및 1차 NSCLC: n=4)을 건강한 기증자 유래 V_γ9V_δ2 T 세포(1:1 E:T 비율) 및 7D12-5C8(50nM) 또는 배지 대조군과 함께 4시간 배양한 후 용해된 종양 세포.

도 14: 해리된 종양 세포 현탁액(복막 CRC 전이: n=4)을 건강한 기증자에서 유래한 V_γ9V_δ2 T 세포(1:1 E:T 비율) 및 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc(50nM), gp120-5C8var1(Y105S)-Fc(50nM) 또는 배지 대조군과 함께 24시간 배양한 후 용해된 종양 세포.

도 15: 비인간 영장류 연구를 위한 구조체의 구조.

도 16: 항원 표적에 대한 7A5-7D12var8-Fc 결합.

도 17: 7A5-7D12var8-Fc에 의해 매개되는 탈과립화 및 세포독성.

도 18: 3마리의 치료된 동물의 혈중 7A5-7D12var8-Fc 농도에 대한 PK 분석. 농도-시간 곡선은 분자가 IgG와 유사한 PK를 가지고 있음을 보여준다.

도 19: 치료된 동물의 혈중 총 T 세포 수(CD3+, 왼쪽 그래프) 및 V_γ9 양성 세포 수(CD3+집단의 백분율). 화살표는 화합물을 주입한 것을 나타낸다. 범례에 나오는 숫자는 치료받은 원숭이의 수이다.

도 20: 시간 경과에 따른 치료된 동물의 혈중 IL-6 사이토카인 수준. 낮은 수준의 사이토카인만이 관찰되었으며 방출은 대체로 1차 주사 이후에만 제한되었다. 화살표는 치료 시점을 나타낸다.

도 21: 정제된 VHH-Fc '중쇄 단독' 항체의 SDS-PAGE 분석. (절단된) 불순물 생성물을 더 잘 식별하기 위해 정제된 단백질 1 및 2 마이크로그램을 로딩했다.

도 22: VHH-Fc 단일 도메인 항체의 역합성곱(Deconvoluted) 질량 스펙트럼. 신호의 강도는 분자량(Da)의 함수로 플롯된다. 78,000 내지 79,000Da의 신호는 역합성곱 아티팩트에 의한 것이다. 68.8kDa에 유의미한 신호가 있다.

도 23| VHH 5C8의 CDR3 아미노산 서열(서열 번호 19) 및 황산화 및/또는 절단을 피하기 위해 도입된 변형(서열 번호 36). Y105(황산화)는 F로 변경되었고 108 및 109 위치는 A(108 및 109) 또는 K(109)로 변경되었다. 또한

R109A 돌연변이 옆에서, CDR3영역의 LGIR 서열이 결실되었다((ΔLGIR, "절단형").

도 24|BLI를 사용한 재조합 V_γ9V_δ2-TCR 단백질에 대한 VHH 단편 결합의 친화도 측정. 단백질 질량(반응, nm)은 시간의 함수로 플롯된다. 점선 수직선은 결합 단계(왼쪽)를 해리 단계(오른쪽)와 구분한다. A: VHH 5C8var1-Y105F; B: VHH 5C8var1-Y105F/G108A; C: VHH 5C8var1-Y105F/R109A; D: VHH 5C8var1-Y105F/R109K; E: VHH 5C8var1-Y105F/R109A/ΔLGIR.

도 25| 유세포 분석기로 측정된, 1차 확장된 V_γ9V_δ2 T 세포에 대한 5C8의 108 및 109 위치 변이체를 포함하는 Fc 함유 이중특이성 CD123xV_δ2 결합, 분자의 결합. FACS에서 측정된 형광 신호의 강도는 사용된 항체 농도의 함수로 플롯된다.

도 26| V_γ9V_δ2 T 세포 표면에서 탈과립화 마커 LAMP-1(즉, CD107A)이 나타나는 것으로 측정된, Fc 함유 이중특이성 분자에 의해 유도된 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화. V_γ9V_δ2 T 세포와 종양 표적 세포(1:1 E:T 비율)를 24시간 동안 공동 배양한 후, CD107A를 발현하는 V_γ9V_δ2 T 세포(탈과립화, 활성화된 V_γ9V_δ2 T 세포)의 백분율을 해당 검정에 사용된 화합물 농도의 함수로서 유세포 분석기로 측정했다. 두 개의 표적 세포주가 사용되었다: MOLM-13 및 THP-1(표시된 바와 같음).

도 27A - 도 27B는 Fc 함유 항-CD123 x V_δ2 이중특이성 분자-의존성, V_γ9V_δ2 T 세포 매개 종양 세포 독성을 보여준다. 24시간 동안 V_γ9V_δ2 T 세포와 종양 표적 세포(1:1 E:T 비율)를 공동 배양한 후 유세포 분석기를 사용하여 생존 세포(7AAD 음성)의 백분율을 결정하고 사용된 화합물 농도의 함수로 플롯한다. 도 27A는 MOLM-13 세포를 사용한 결과를 보여준다. 도 27B는 THP-1 세포를 사용한 결과를 보여준다.

도 28A - 도 28B는 정제된 단백질을 CE-SDS(모세관 전기영동)로 분석한 결과를 보여준다. 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-Fc(도 28A) 및 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc(도 28B)의 전기영동 이미지를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

발명의 상세한 설명

[0020]

정의

[0021]

본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 V_δ2"는 V_γ9V_δ2-T 세포 수용체(TCR)의 재배열된 δ2 사슬을 의미한다. UniProtKB - A0JD36(A0JD36_HUMAN)은 가변 TRDV2 서열의 예를 제공한다.

[0022]

본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 V_γ9"는 V_γ9V_δ2-T 세포 수용체(TCR)의 재배열된 γ9 사슬을 의미한다. UniProtKB - Q99603_HUMAN은 가변 TRGV9 서열의 예를 제공한다.

[0023]

본 명세서에서 사용되는 용어 "EGFR"이라는 용어는 인간 EGFR 단백질(UniProtKB - P00533(EGFR_HUMAN))을 의미한다.

[0024]

본 명세서에서 사용되는 용어 "CD123"은 인간 CD123 단백질을 의미하며, 인터루킨-3 수용체 알파 사슬(GenBank 접근 번호 NM_002183.4, NCBI 참조 서열: NP_002174.1)이라고도 한다. IL3 수용체는 일반적인 베타 사슬인 CD131과 CD123의 이종이량체이다(NCBI 참조 서열: NP_000386.1).

[0025]

본 명세서에서 사용되는 용어 "PSMA"는 인간 전립선 특이적 막 항원 단백질(UniProtKB - Q04609(FOLH1_HUMAN))을 의미한다.

[0026]

본 명세서에서 사용되는 용어 "CD40"은 CD40 단백질을 의미하며, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 5(UniProtKB - P25942(TNR5_HUMAN)), 이소형 I로도 알려져 있다.

[0027]

본 명세서에서 사용되는 용어 "CD1d"는 인간 CD1d 단백질(UniProtKB - P15813(CD1D_HUMAN))을 의미한다.

[0028]

본 명세서에서 사용되는 용어 "넥틴 4"는 인간 넥틴 4 단백질(UniProtKB - Q96NY8(NECT4_HUMAN))을 의미한다.

[0029]

용어 "항체"는 전형적인 생리학적 조건에서 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 가진 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 단편 또는 그 중 하나의 유도체를 지칭하는 것으로, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 이상, 약 48시간 이상, 약 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 그 이상 등과 같이 상당한 기간의 반감기를 갖거나, 또는 그 외 다른 관련 기능적으로 정의된 기간(항체가 항원에 결합하는 것과 관련된 생리적 반응을 유도, 촉진, 향상 및/또는 조절하기에 충분한 시간 및/또는 항체가 효과기 활성을 동원하기에 충분한 시간)을 갖는 것을 의미한다. 항원과

상호작용하는 항원 결합 영역(또는 항원 결합 도메인)은 면역글로불린 분자의 중쇄와 경쇄 모두의 가변 영역을 포함할 수도 있고, 단일 도메인 항원 결합 영역, 예를 들어, 중쇄 가변 영역 단독일 수도 있다. 항체의 불변 영역이 존재하는 경우, 면역글로불린이 숙주 조직이나 인자, 즉, 면역 체계의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포 및 T 세포) 및 보체 활성화의 고전적 경로에서 첫 번째 구성 성분인 C1q와 같은 보체계 구성 성분에 결합되도록 매개할 수 있다.

[0030] 면역글로불린의 Fc 영역은 과파인으로 항체를 소화한 후 일반적으로 생성되는 항체의 단편으로 정의되며, 면역글로불린의 두 CH2-CH3 영역과 연결 영역, 예를 들어, 힌지 영역을 포함한다. 항체 중쇄의 불변 도메인은 항체 이소형, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD 또는 IgE를 정의한다. Fc 영역은 보체계 단백질과 Fc 수용체라고 불리는 세포 표면 수용체를 통해 항체의 효과기 기능을 매개한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 면역글로불린 중쇄의 힌지 영역을 지칭하는 것으로 한다. 그러므로, 예를 들어, 인간 IgG1 항체의 힌지 영역은 EU 넘버링에 따르면 아미노산 216-230에 상응한다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CH2 영역" 또는 "CH2 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 CH2 영역을 지칭하는 것으로 한다. 그러므로, 예를 들어, 인간 IgG1 항체의 CH2 영역은 EU 넘버링에 따르면 아미노산 231-340에 상응한다. 그러나 CH2 영역은 본 명세서에 설명된 다른 하위 유형일 수도 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CH3 영역" 또는 "CH3 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 CH3 영역을 지칭하는 것으로 한다. 그러므로, 예를 들어, 인간 IgG1 항체의 CH3 영역은 EU 넘버링에 따르면 아미노산 341-447에 상응한다. 그러나 CH3 영역은 본 명세서에 설명된 다른 하위 유형일 수도 있다.

[0034] 본 발명에서 Fc 영역/Fc 도메인의 아미노산 위치에 대한 참조는 EU 넘버링에 따른다(Edelman 외, Proc Natl Acad Sci US A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat 외, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH 공개 번호 91-3242).

[0035] 위에서 언급했듯이, 본 명세서에서 사용되는 항체라는 용어는 달리 명시되지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체 단편들을 포함한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 용어 "항체"에 포함되는 결합 단편들의 예에는 (i) Fab' 또는 Fab 단편, 즉, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편, 또는 W02007059782에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) F(ab')₂ 단편, 즉, 힌지 영역에서 이황화물 가교로 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 본질적으로 구성된 Fd 단편; 및 (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 구성된 Fv 단편이 포함된다. 또한, Fv 단편의 두 도메인인 VL과 VH는 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들을 단일 단백질 사슬로 만들 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있으며, 상기 단일 단백질 사슬에서 VL 및 VH 영역은 쌍을 이루어 1가 분자(단일 사슬 항체 또는 단일 사슬 Fv(scFv)로 알려짐, 예를 들어, Bird 외, Science 242, 423-426 (1988) 및 Huston 외, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 참고.). 이러한 단일 사슬 항체는 문맥상 달리 명시되지 않는 한 항체라는 용어에 포함된다. 이러한 단편은 일반적으로 항체의 의미에 포함되지만, 이들은 전체적으로 그리고 각각 독립적으로 본 발명의 고유한 특징으로, 서로 다른 생물학적 특성과 유용성을 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 용어 항체는 다중 클론 항체, 단일클론 항체(mAb), 키메라 항체 및 인간화 항체와 효소 절단, 펩티드 합성 및 재조합 기술과 같은 알려진 기술을 통해 제공된 항체 단편도 포함한다.

[0036] 본 발명의 항체의 일부 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역 또는 제2 항원 결합 영역, 또는 둘 모두는 단일 도메인 항체이다. 단일 도메인 항체는 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Hamers-Casterman 외, (1993) Nature 363:446, Roovers 외, (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327 및 Krah 외, (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21 참조). 단일 도메인 항체는 단일 CDR1, 단일 CDR2, 및 단일 CDR3를 포함한다. 단일 도메인 항체의 예에는 중쇄 단독으로 구성된 항체의 가변 단편, 자연적으로 경쇄를 포함하지 않는 항체, 기존 항체에서 파생된 단일 도메인 항체, 엔지니어링된 항체 등이 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 상어, 염소, 토끼, 및 소를 포함한 모든 종에서 유래될 수 있다. 예를 들어, 단일 도메인 항체는 낙타, 드로메다리, 라마, 알파카, 과나코 등의 낙타과 동물에서 키운 항체에서 유래될 수 있다. 전 항체와 마찬가지로, 단일 도메인 항체는 특정 항원에 선택적으로 결합할 수 있다. 단일 도메인 항체는 면역글로불린 사슬의 가변 도메인, 즉 CDR1, CDR2 및 CDR3과 프레임워크 영역만 함유할 수 있다. 이러한 항체는 Nanobody® 또는 VHH라고도 한다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린"은 두 쌍의 폴리펩티드 사슬, 한 쌍의 경쇄(L) 사슬 및 한 쌍의 중쇄(H) 사슬로 구성된 구조적으로 관련된 당단백질의 분류를 지칭하고자 하는 것이며, 네 개 모두 이황화물 결합

에 의해 잠재적으로 서로 연결되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 중쇄", "면역글로불린의 중쇄" 또는 "중쇄"는 면역글로불린의 사슬 중 하나를 지칭하고자 하는 것이다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가변 영역(이하 VH로 약칭)과 면역글로불린의 이소형을 정의하는 중쇄 불변 영역(이하 CH로 약칭)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 일반적으로 CH1, CH2 및 CH3의 3개 도메인으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 힌지 영역을 추가로 포함한다. 면역글로불린(예를 들어, IgG)의 구조 내에서, 두 개의 중쇄는 힌지 영역의 이황화물 결합을 통해 서로 연결되어 있다. 중쇄와 마찬가지로 각 경쇄도 일반적으로 여러 영역; 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 또한 VH 및 VL 영역은 초가변 영역(또는 서열에 있어서 초가변적 일 수 있고/있거나 구조적으로 정의된 루프를 형성할 수 있는 초가변 영역)으로 세분될 수 있으며, 이를 상보성 결정 영역(CDR)이라고도 하며, 보다 잘 보존된 영역인 프레임워크 영역(FR)이 삽입되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 일반적으로 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. CDR 서열은 다양한 방법, 예를 들어 Chothia 및 Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901 또는 Kabat 외, (1991) Sequence of protein of immunological interest, 5판. NIH 출판사에 제공된 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 다양한 CDR 결정 방법과 아미노산 넘버링 방법은 [www.abysis.org\(UCL\)](http://www.abysis.org(UCL))에서 비교할 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이소형"은 면역글로불린 (하위)분류(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE 또는 IgM) 또는 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 인코딩되는 IgG1m(za) 및 IgG1m(f)와 같은 이의 모든 동종형을 지칭한다. 각 중쇄 이소형은 카파(κ) 또는 람다(λ) 경쇄와 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0039] "모체 항체"라는 용어는 본 발명에 따른 항체와 동일한 항체로 이해되어야 하지만, 모체 항체에는 지정된 돌연변이 중 하나 이상이 없다. 본 발명의 "변이체" 또는 "항체 변이체" 또는 "모체 항체의 변이체"는 "모체 항체"와 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 항체 분자이다. 아미노산 치환은 천연 아미노산을 다른 자연적으로 발생하는 아미노산으로 바꾸거나, 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 유도체로 바꾸는 것일 수 있다. 아미노산 치환은 보존적일 수도 있고 비보존적일 수도 있다. 본 발명의 맥락에서, 보존적 치환은 다음 세 개의 표 중 하나 이상에 반영된 아미노산 분류 내의 치환으로 정의될 수 있다:

[0040] **보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 분류**

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
하전되지 않은 친수성 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
하전되지 않은 지방족 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비-극성의, 하전되지 않은 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0041]

[0042] **다른 보존적 아미노산 잔기 치환 분류**

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0043]

[0044] 아미노산 잔기의 또 다른 물리적 및 기능적 분류

알코올 기 함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐 관련 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음전하 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양전하 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴 형성에 관련된 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, N, D, E, 및 R

[0045]

[0046] 본 발명의 맥락에서 변이체의 치환은 다음과 같이 표시된다: 원래 아미노산 - 위치 - 치환된 아미노산. 아미노산 잔기를 나타내는 코드 Xaa 및 X를 포함하는 3글자 코드 또는 1글자 코드가 사용된다. 따라서 "T366W"라는 표기는 변이체가 모체 항체의 위치 366에 있는 아미노산에 상응하는 변이체 아미노산 위치에서 트레오닌이 트립토판으로 치환된 것을 의미한다.

[0047] 또한, "치환"이라는 용어에는 다른 19가지 천연 아미노산 중 하나로의 치환이나 비천연 아미노산과 같은 다른 아미노산으로의 치환이 포함된다. 예를 들어, 위치 366의 아미노산 T의 치환에는 다음 치환이 모두 포함된다: 366A, 366C, 366D, 366G, 366H, 366F, 366I, 366K, 366L, 366M, 366N, 366P, 366Q, 366R, 366S, 366E, 366V, 366W, 및 366Y.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 용어 "전장 항체"는 일반적으로 해당 이소형 항체의 야생형 항체에서 발견되는 것과 상응하는 모든 중쇄 및 경쇄 불변 및 가변 도메인을 함유하는 항체를 지칭한다.

[0049] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역이 비인간 종(예를 들어, 설치류에서 유래)에서 유래되고 불변 영역이 인간과 같은 다른 종에서 유래된 항체를 지칭한다. 키메라 항체는 유전공학을 통해 생성될 수 있다. 치료에 사용하기 위한 키메라 단일클론 항체는 항체 면역원성을 줄이기 위해 개발되었다.

[0050] "인간화 항체"라는 용어는 인간 항체 불변 도메인 및 인간 가변 도메인과 높은 수준의 서열 상동성을 포함하도록 변형된 비인간 가변 도메인을 함유하는 유전자 조작된 비인간 항체를 지칭한다. 이는 항원 결합 부위를 형성하는 6개의 비인간 항체 상보성 결정 영역(CDR)을 동종 인간 수용체 프레임워크 영역(FR)에 이식하여 달성할 수 있다. 모체 항체의 결합 친화도 및 특이성을 완전히 재구성하기 위해서는, 모체 항체(즉, 비인간 항체)의 프레임워크 잔기를 인간 프레임워크 영역으로 치환(역돌연변이)하는 것이 필요할 수 있다. 구조적 상동성 모델링은 항체의 결합 특성에 중요한 프레임워크 영역의 아미노산 잔기를 식별하는 데 도움이 될 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비인간 CDR 서열, 주로 비인간 아미노산 서열에 대한 하나 이상의 아미노산 역돌연변이를 선택적으로 포함하는 인간 프레임워크 영역, 그리고 선택적으로 완전히 인간의 불변 영역을 포함할 수 있다. 선택적으로, 반드시 역돌연변이는 아니지만 추가적인 아미노산 변형을 도입하여 친화도 및 생화학적 특성과 같은 원하는 특성을 갖는 인간화 항체를 얻을 수 있다. 비인간 치료용 항체의 인간화는 인간에서의 면역원성을 최소화하기 위해 수행되지만, 이러한 인간화 항체는 동시에 비인간 유래 항체의 특이성과 친화도를 유지한다.

[0051] 용어 "다중특이성 항체"는 일반적으로 중복되지 않는 적어도 2개의 서로 다른(예: 적어도 3개) 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 에피토프는 동일하거나 다른 표적 항원에 존재할 수 있다. 에피토프가 다른 표적에 존재하는 경우, 이러한 표적은 같은 세포에 존재할 수도 있고, 다른 세포 또는 세포 유형에 존재할 수도 있다. 일부 실시형태에서, 다중특이성 항체는 하나 이상의 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다.

[0052] 용어 "이중특이성 항체"는 일반적으로 중복되지 않는 2개의 서로 다른 에피토프에 대한 특이성을 갖는 항체를 지칭한다. 이러한 에피토프는 동일하거나 다른 표적에 존재할 수 있다. 에피토프가 다른 표적에 존재하는 경우, 이러한 표적은 같은 세포에 존재할 수도 있고, 다른 세포 또는 세포 유형에 존재할 수도 있다. 일부 실시형태에

서, 이중특이성 항체는 하나 또는 두 개의 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다.

- [0053] 이중특이성 항체와 같은 다중특이성 항체의 다양한 분류들의 예에는 (i) 이중 이량체화를 강제하기 위한 상보적 CH3 도메인을 갖는 IgG 유사 분자, (ii) 분자의 두 면이 각각 적어도 두 개의 다른 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부를 함유하는, 재조합 IgG 유사 이중 표적화 분자, (iii) 전장 IgG 항체가 추가 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부에 융합된 IgG 융합 분자, (iv) 단일 사슬 Fv 분자 또는 안정화된 디아바디가 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 이의 일부에 융합된 Fc 융합 분자, (v) 서로 다른 Fab 단편이 함께 융합되거나 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 그 일부에 융합된 Fab 융합 분자; 및 (vi) ScFv 및 디아바디 기반 및 중쇄 항체(예: 도메인 항체, Nanobodies®)(이 때 서로 다른 단일 사슬 Fv 분자 또는 서로 다른 디아바디 또는 서로 다른 중쇄 항체(예: 도메인 항체, Nanobodies®)는 서로 융합되거나 중쇄 불변 도메인, Fc 영역 또는 그 일부에 융합된 또 다른 단백질 또는 담체 분자에 융합됨)가 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상보적인 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG-유사 분자의 예에는 Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech), 옵-인투-홀(Genentech), CrossMAbs (Roche) 및 정전기적으로-매칭되는 (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik 외, J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-바디 및 PIG-바디(Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), 가닥 교환 조작된 도메인 항체 (Strand Exchange Engineered Domain body, SEED바디)(EMD Serono), 바이클로닉스(Merus, WO2013157953), Fc ΔAdp (Regeneron), 이중특이성 IgG1 및 IgG2 (Pfizer/Rinat), 아지메트릭 스캐폴드(Zymeworks/Merck), mAb-Fv (Xencor), 2가 이중특이성 항체(Roche, WO2009080254) 및 DuoBody® 분자(Genmab)가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자의 예에는 이중 표적화(DT)-Ig(GSK/Domantis, WO2009058383), 투-인-원(Two-in-one) 항체(Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610-1614), 가교된 Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star), Zybodies™ (Zyngenia, LaFleur 외, Mabs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), 공통 경쇄로 접근, κ λBodies (NovImmune, WO2012023053) 및 CovX-바디® (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501-506)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] IgG 융합 분자의 예에는 이중 가변성 도메인 (DVD)-Ig (Abbott), 이중 도메인 이중 머리 항체 (Unilever; Sanofi Aventis), IgG-유사 이중특이성 (ImClone/Eli Lilly, Lewis 외, Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi 외, J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) 및BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), HERCULES (Biogen Idec), scFv 융합 (Novartis), scFv 융합 (Changzhou Adam Biotech Inc) 및 TvAb (Roche)이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] Fc 융합 분자의 예에는 scFv/Fc 융합(Academic Institution, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, 외, AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), 이중 친화도 재표적화 기술(Fc-DARTTM) (MacroGenics) 및 이중(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China)이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] Fab 융합 이중특이성 항체의 예에는 F(ab)2 (Medarex/AMGEN), 이중-작용 또는 Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), 2가 이중특이성(Biotechnol) 및 Fab-Fv (UCB-Celltech)가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] ScFv-, 디아바디-기반의, 도메인 항체에는 이중특이성 T 세포 인게이지 (BiTE®) (Micromet, 텐덤 디아바디 (Tandab) (Affimed), 이중 친화력 재표적화 기술(DARTTM) (MacroGenics), 단일-사슬 디아바디(Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-유사 항체 (AIT, ReceptorLogics), 인간 혈청 알부민 ScFv 융합 (Merrimack, WO2010059315) 및 COMBODY 분자 (Epigen Biotech, Zhu 외, Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75), 이중 표적화 나노바디® (Ablinx, Hmila 외, FASEB J. 2010), 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 항원에 결합하는 항체의 맥락에서, 용어 "결합하다" 또는 "특이적으로 결합하다"는 해당 결합이 전형적으로, 예를 들어, 본 명세서의 실시예에서 기술된 바와 같이 유세포 측정기를 이용하여 측정하였을 때, 약 10^{-6} M 또는 그 미만, 예를 들어, 10^{-7} M 또는 그 미만, 예를 들어, 약 10^{-8} M 또는 그 미만, 예를 들어, 약 10^{-9} M 또는 그 미만, 약 10^{-10} M 또는 그 미만, 또는 약 10^{-11} M 또는 심지어 이보다 더 적은 KD에 상응하는 겉보기 친화도로 사

전결정된 항원 또는 표적에 결합하는 것을 지칭한다. 대안적으로, KD 값은 예를 들어, 항원을 리간드로 사용하고, 결합 모이어티 또는 결합 분자를 분석물로 사용하는 Octet RED96 기기의 BIAcore T200 또는 바이오층 간섭계(BLI)의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 특이적 결합은 사전결정된 항원 또는 밀접하게-관련된 항원 이외의, 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카제인)에 결합하기 위해 이의 친화도보다 항체가 적어도 10배 더 낮은, 예를 들어, 적어도 100배 더 낮은, 예를 들어, 적어도 1,000 배 더 낮은, 예를 들어, 적어도 10,000 배 낮은, 예를 들어, 적어도 100,000 배 더 낮은 KD에 해당하는 친화도로 사전-결정된 항원에 결합하는 것을 의미한다. 친화도가 낮은 정도는 결합 모이어티 또는 결합 분자의 KD에 따라 달라지며, 따라서 결합 모이어티 또는 결합 분자의 KD가 매우 낮은 경우(즉, 결합 모이어티 또는 결합 분자의 특이성이 매우 높음), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 낮은 정도는 적어도 10,000배일 수 있다. 본 명세서에서 이용된 용어 "KD" (M)는 항원과 결합 모이어티 또는 결합 분자 사이의 특정 상호작용의 해리 평형 상수를 의미한다.

[0061] 본 발명의 내용에서, "경쟁하다" 또는 "경쟁할 수 있다" 또는 "경쟁한다"란 특정 결합 분자가 특정 결합 짝에 결합하는 또 다른 분자의 존재 하에 이의 결합 짝에 결합하는 경향이 감지할 수 있을 만큼 유의하게 감소한 것을 의미한다. 전형적으로, 경쟁이란 2개 또는 그 이상 경쟁하는 분자, 예를 들어, 항체의 충분한 양을 이용한 예를 들어, ELISA 분석 또는 유동세포 측정에 의해 결정하였을 때 여기된 결합에서 적어도 약 25 퍼센트 감소, 예를 들어, 적어도 약 50 퍼센트, 예를 들어, 적어도 약 75 퍼센트, 예를 들어, 적어도 90 퍼센트 감소를 의미한다. 경쟁적 억제에 의해 결합 특이성을 결정하는 추가 방법은 예를 들어, Harlow 외, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan 외, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993), 및 Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983))에서 찾을 수 있다.

[0062] 한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 항체 7D12와 동일한 EGFR 상의 에피토프에 결합하고, 항체 1D2와 동일한 CD123 상의 에피토프에 결합하고, 항체 1D12와 동일한 CD1d 상의 에피토프에 결합하고, 항체 LV1050과 동일한 PSMA 상의 에피토프에 결합하고, 항체 v19와 동일한 CD40 상의 에피토프에 결합하고, 항체 LV1184, LV1181, LV1185, LV1186, LV1178, LV1183 또는 LV1187과 동일한 넵틴 4 상의 에피토프에 결합하고, 항체 5C8 또는 이의 변이체와 동일한 V δ 2 상의 에피토프에 결합한다. 당업계에 공지된 표적 항원에 대한 항체 에피토프를 매핑하는데 사용할 수 있는 여러 가지 방법이 있는데, 여기에는 에피토프의 일부인 펩티드를 식별할 수 있는 가교 결합 질량 분석법과 에피토프를 형성하는 항원의 개별 잔기를 식별하는 X-선 결정학이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 에피토프 잔기는 항체로부터 5Å 이거나 또는 이보다 적은 적어도 하나의 원자를 갖는 모든 아미노산 잔기로 결정될 수 있다. 반 데르 발스(van der Waals) 반경 내의 원자와 가능한 물-매개된 수소 결합을 허용하기 위해, 에피토프 컷오프 거리로 5Å가 선택되었다. 다음으로, 에피토프 잔기는 8 Å 이거나 또는 그 이하인 적어도 하나의 원자를 갖는 모든 아미노산 잔기로 결정될 수 있다. 아르기닌 아미노산의 길이 연장을 허용하기 위해, 8Å 이거나 또는 그 이하를 에피토프 컷오프 거리로 선택한다. 가교 결합된 질량 분석법은 항체와 항원을 질량 라벨된 화학적 가교제로 결합시키는 것으로 시작된다. 다음으로, 고-질량 MALDI 검출을 사용하여 복합체의 존재를 확인한다. 화학 가교 후 Ab/Ag 복합체는 매우 안정적이기 때문에, 다양한 효소와 절단 조건을 복합체에 적용하여 상이한 많은 중첩 펩티드를 제공할 수 있다. 이러한 펩티드들의 식별은 고분해능 질량 분석법 및 MS/MS 기술을 사용하여 수행된다. 가교결합된 펩티드의 식별은 가교결합 시약에 연결된 질량 태그를 사용하여 결정된다. MS/MS 단편화 및 데이터 분석 후 가교되고 항원에서 파생된 펩티드는 에피토프의 일부이고, 항체에서 파생된 펩티드는 파라토프의 일부다. 발견된 개별 가교 펩티드의 가장 N-말단과 C-말단 가교 잔기 사이의 모든 잔기는 에피토프 또는 파라토프의 일부로 간주된다. 항체 7D12의 에피토프는 Schmitz 외, (2013) *Structure* 21:1214에 기술된 X선 결정학에 의해 결정되었으며 도메인 III 리간드 결합 부위에 상응하는 도메인 III(잔기 R353, D355, F357, Q384, N420)의 평평한 표면으로 구성된다.

[0063] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "제1" 및 "제2" 항원-결합 영역은 항체 내 방향/위치를 지칭하는 것이 아니다, 즉, N- 또는 C-말단과 관련된 의미는 아니다. 용어 "제1" 및 "제2"는 청구범위 및 상세한 설명에서 2개의 상이한 항원-결합 영역을 정확하고, 일관되게 지칭하는 역할만 한다.

[0064] 본 명세서에서 사용될 때 "% 서열 동일성"이란 최적 배열을 위하여 도입이 필요했던 각 갭의 수, 각 갭의 길이를 고려하여, 상이한 서열들에 의해 공유되는 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치의 수를 지칭한다(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 # x 100). 두 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은 예를 들어, E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988)의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있으며, 이는 PAM120 중량 잔기 테이블, 갭 길이 페널티 12 그리고 갭 페널티 4를 이용하여 ALIGN 프로

그램 (버전 2.0)에 통합되었다.

[0065] 본 발명의 추가 양상 및 실시형태

- [0066] 상기 설명한 바와 같이, 제1 양상에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 12에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 13에 제시된 CDR2 서열 및 서열 번호 14에 제시된 CDR3 서열을 포함한다.
- [0067] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G(Gly)이다.
- [0068] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 다음으로 구성된 군에서 선택된다: A, C, D, E, G, H, F, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y. 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 F 또는 S이다.
- [0069] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 다음으로 구성된 군에서 선택된다: A, C, D, E, G, H, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y.
- [0070] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이다.
- [0071] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 3의 X2는 F이다.
- [0072] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 3의 X2는 S이다.
- [0073] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고 서열 번호 3의 X2는 F이다.
- [0074] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고 서열 번호 3의 X2는 S이다.
- [0075] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X3는 다음으로 구성된 군에서 선택된다: A, C, D, E, G, H, F, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W 및 Y.
- [0076] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X3는 다음으로 구성된 군에서 선택된다: A, C, D, E, G, H, F, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W 및 Y.
- [0077] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)이다.
- [0078] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X3는 A이다.
- [0079] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X3는 K이다.
- [0080] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고 서열 번호 14의 X3는 A이다.
- [0081] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고 서열 번호 14의 X3는 K이다.
- [0082] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0083] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0084] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0085] 한 실시형태에서, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0086] 한 실시형태에서:
- [0087] (a) 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X2는 F이거나,
- [0088] (b) 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X2는 S이거나,
- [0089] (c) 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X3은 A이거나, 또는
- [0090] (d) 서열 번호 12의 X1은 S이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0091] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0092] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0093] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0094] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 S이고, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.

- [0095] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0096] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고, 서열 번호 14의 X2는 F이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0097] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 A이다.
- [0098] 한 실시형태에서, 서열 번호 12의 X1은 G이고, 서열 번호 14의 X2는 S이고 서열 번호 14의 X3은 K이다.
- [0099] 한 실시형태에서:
- [0100] (a) 서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이고 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이고, 또는
- [0101] (b) 서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 F(Phe)이고 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)이다.
- [0102] 한 실시형태에서:
- [0103] (a) 서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 A(Ala)이고, 또는
- [0104] (b) 서열 번호 12의 X1은 S(Ser)이고, 서열 번호 14의 X2는 S(Ser)이고 서열 번호 14의 X3은 K(Lys)이다.
- [0105] 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 17의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 21의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0106] 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 18의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 22의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0107] 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 19의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 23의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0108] 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 20의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 항체에 관한 것이며, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 24의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V δ 2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하며, 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0109] 한 바람직한 실시형태에서, 항체는 인간 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화시킬 수 있다. V γ 9V δ 2 T 세포의 활성화는

유전자-발현 및/또는 (표면) 마커 발현(예를 들어, 활성화 마커, 예를 들어, CD25, CD69, 또는 CD107a) 및/또는 분비 단백질(예를 들어, 사이토킨 또는 케모카인) 프로파일에서의 변경을 측정하여 측정될 수 있다. 한 바람직한 실시형태에서, 항체는 V_γ9V_δ2 T 세포에 의한 CD107a 발현 및/또는 사이토카인 생산(예를 들어, TNF, IFN_γ) 증가로 표시된 탈과립을 초래하는 활성화(예를 들어, CD69 및/또는 CD25 발현의 상향 조절)를 유도할 수 있다.

[0110] 추가의 바람직한 실시형태에서, 항체는 본 명세서의 실시예 9에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 1nM, 바람직하게는 100pM, 바람직하게는 10pM, 바람직하게는 1pM, 훨씬 더 바람직하게는 100fM의 농도에서 테스트할 경우, CD107a에 대해 양성인 세포의 수를 적어도 2배, 예를 들어, 적어도 5배 증가시킬 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 본 명세서의 실시예 9에서 기술된 바와 같이 V_γ9V_δ2 T 세포 및 A431 표적 세포를 이용하여 테스트하였을 때, CD107a 양성 세포의 백분율을 증가시키기 위한 100 pM 또는 그 미만, 예를 들어, 50 pM 또는 그 미만, 예를 들어, 25 pM 또는 그 미만, 예를 들어, 20 pM 또는 그 미만, 예를 들어, 15 pM 또는 그 미만의 EC50 값을 갖는다.

[0111] 한 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체이다. 그러므로, 한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체를 포함하고, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 12에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 13에 제시된 CDR2 서열 및 서열 번호 14에 제시된 CDR3 서열을 포함한다.

[0112] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 17의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 21의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 18의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 22의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0114] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 19의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 23의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0115] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 20의 CDR3 서열을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 인간 V_δ2에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함하는 단일 도메인 항체를 포함하고, 이 때 상기 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 8의 CDR1 서열, 서열 번호 13의 CDR2 서열 및 서열 번호 24의 CDR3 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 V_δ2에 결합할 수 있고 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0116] 또 다른 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역은 인간화되어 있으며, 이 때 이러한 항원 결합 영역은 바람직하게는 다음을 포함하거나 다음으로 구성된다: (a) 서열 번호 16에 제시된 서열, 또는 (b) 서열 번호 16에 제시된 서열에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열(이 때 X1은 S(Ser)이고, X2는 F(Phe)이고 X3은 A(Ala)임). 또 다른 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역은 인간화되어 있으며 서열 번호 25, 26, 27, 또는 28을 포함하거나 이로 구성된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역은 인간화되어 있으며 서열 번호 29, 30, 31, 또는 32를 포함하거나 이로 구성된다.

- [0117] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 이중특이성 항체와 같은 다중특이성 항체이다. 그러므로, 한 실시형태에서, 항체는 제2 항원 결합 영역을 추가로 포함한다. 한 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 단일 도메인 항체이다.
- [0118] 추가 실시형태에서, 항체는 이중특이성 항체이며, 이때 상기 제1 항원-결합 영역 및 제2 항원-결합 영역은 모두 단일 도메인 항체이다. 추가 실시형태에서, 상기 다중특이성 항체는 이중특이성 항체이며, 이때 상기 제1 항원-결합 영역은 단일 도메인 항체이고, 상기 제2 항원-결합 영역은 단일 도메인 항체이다. 한 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 인간화되어 있다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 EGFR에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. V γ 9V δ 2-T 세포 및 EGFR 모두를 표적으로 하는 이중특이성 항체는 시험관 내와 생체 내 마우스 이종이식 모델에서 강력한 V γ 9V δ 2 T 세포 활성화와 종양 세포 용해를 유도하는 것으로 나타났다(de Bruin 외, (2018) Oncoimmunology 1, e1375641).
- [0120] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 33에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 34에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 35에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 36을 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 36에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 36에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 EGFR에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 36에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 EGFR 상의 에피토프에 결합한다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 33을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 34를 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 35를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23, 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 33을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 34를 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 35를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 36을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 36을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0124] 한 추가 실시형태에서, 항체는 인간 EGFR을 발현하는 세포의 사멸을 매개할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 본 명세서의 실시예 9에 기술된 바와 같이 테스트할 경우 EGFR을 발현하는 세포, 예를 들어, A431 세포에 대한 V γ 9V δ 2 T 세포 매개 사멸을 적어도 25%, 예를 들어, 적어도 50%, 예를 들어, 적어도 2배 증가시킬 수 있다.
- [0125] 한 추가 실시형태에서, 항체는 EGFR 음성 세포, 예를 들어, EGFR 음성 인간 세포의 사멸을 매개할 수 없다.
- [0126] 한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 CD123에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 37에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 38에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 39에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 40을 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 40에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.
- [0128] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 40에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 CD123에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 40에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 CD123 상의 에피토프에 결합한다.
- [0129] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 37을 포함

하는 CDR1 서열, 서열 번호 38을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 39를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23, 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 37을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 38을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 39를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 40을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 40을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 PSMA에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 인간 PSMA에 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 갖는 다중특이성 항체는, 예를 들어, WO 2022/008646(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

[0132] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 41에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 42에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 43에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 44를 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 44에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 44에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 PSMA에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 44에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 PSMA 상의 에피토프에 결합한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 41을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 42를 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 43을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 41을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 42를 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 43을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 44를 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 44를 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0136] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 CD1d에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 본 발명에 사용될 다중특이성 항체에 통합시키기에 적합한, 인간 CD1d에 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 갖는 항체는, 예를 들어, WO 2016/122320 및 WO 2020/060405(두 문헌 모두 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 45에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 46에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 47에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 48을 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 48에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 48에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 CD1d에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 48에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 CD1d 상의 에피토프에 결합한다.

[0139] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 45를 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 46을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 47을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23, 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합

영역; 및 (b) 서열 번호 45를 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 46을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 47을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0140] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 48을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 48을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0141] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 CD40에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 본 발명에 사용될 다중특이성 항체에 통합시키기에 적합한, 인간 CD40에 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 갖는 항체는, 예를 들어, WO 2020/159368(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

[0142] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 49에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 50에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 51에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 52를 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 52에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0143] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 52에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 CD40에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 52에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 CD40 상의 에피토프에 결합한다.

[0144] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 49를 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 50을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 51을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 49를 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 50을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 51을 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0145] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 52를 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 52를 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0146] 일부 실시형태에서, 항체는 인간 벡틴 4에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0147] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 53에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 54에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 55에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 57에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 58에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 59에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 61에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 62에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 63에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 65에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 66에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 67에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 69에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 70에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 71에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 73에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 74에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 75에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 77에 제시된 CDR1 서열, 서열 번호 78에 제시된 CDR2 서열, 서열 번호 79에 제시된 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0148] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성되거나, 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80에 적어도 90%, 예를 들어, 적어도 92%, 예를 들어, 적어도 94%, 예를 들어, 적어도 96%, 예를 들어, 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0149] 일부 실시형태에서, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80에 제시된 서열을 갖는 항체와 인간 벡틴 4에 대한 결합을 위해 경쟁하며(즉, 경쟁할 수 있으며), 바람직하게는 제2 항원 결합 영역은 서

열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80에 제시된 서열을 갖는 항체와 동일한 인간 벡틴 4 상의 에피토프에 결합한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 17, 18, 19 및 20에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73 및 77에서 선택된 CDR1 서열, 서열 번호 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74 및 78을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75 및 79를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 8을 포함하는 CDR1 서열, 서열 번호 13을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 21, 22, 23 및 24에서 선택된 CDR3 서열을 포함하는 제1 항원 결합 영역; 및 (b) 서열 번호 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73 및 77에서 선택된 CDR1 서열, 서열 번호 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74 및 78을 포함하는 CDR2 서열, 및 서열 번호 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75 및 79를 포함하는 CDR3 서열을 포함하는 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 25, 26, 27 및 28에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76 및 80을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열 번호 29, 30, 31 및 32에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된 제1 항원 결합 영역 및 서열 번호 56, 60, 64, 68, 72, 76, 및 80을 포함하거나 이로 구성된 제2 항원 결합 영역을 포함한다.

[0152] 예시적인 결합 도메인의 조합을 아래 표 A에 제공한다.

[0153] 표 A: 예시적인 결합 도메인 조합

제 1 항원 결합 도메인					제 2 항원 결합 도메인				
표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)	표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)
V62	8	13	17	25	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	18	26	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	19	27	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	20	28	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	21	29	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	22	30	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	23	31	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	24	32	EGFR	33	34	35	36
V62	8	13	17	25	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	18	26	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	19	27	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	20	28	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	21	29	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	22	30	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	23	31	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	24	32	CD123	37	38	39	40
V62	8	13	17	25	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	18	26	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	19	27	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	20	28	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	21	29	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	22	30	PSMA	41	42	43	44

[0154]

제 1 항원 결합 도메인					제 2 항원 결합 도메인				
표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)	표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)
V62	8	13	23	31	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	24	32	PSMA	41	42	43	44
V62	8	13	17	25	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	18	26	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	19	27	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	20	28	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	21	29	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	22	30	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	23	31	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	24	32	CD1d	45	46	47	48
V62	8	13	17	25	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	18	26	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	19	27	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	20	28	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	21	29	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	22	30	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	23	31	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	24	32	CD40	49	50	51	52
V62	8	13	17	25	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	18	26	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	19	27	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	20	28	넥틴 4	53	54	55	56

[0155]

제 1 항원 결합 도메인					제 2 항원 결합 도메인				
표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)	표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)
V62	8	13	21	29	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	22	30	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	23	31	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	24	32	넥틴 4	53	54	55	56
V62	8	13	17	25	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	18	26	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	19	27	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	20	28	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	21	29	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	22	30	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	23	31	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	24	32	넥틴 4	57	58	59	60
V62	8	13	17	25	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	18	26	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	19	27	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	20	28	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	21	29	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	22	30	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	23	31	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	24	32	넥틴 4	61	62	63	64
V62	8	13	17	25	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	18	26	넥틴 4	65	66	67	68

제 1 항원 결합 도메인					제 2 항원 결합 도메인				
표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)	표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)
V62	8	13	19	27	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	20	28	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	21	29	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	22	30	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	23	31	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	24	32	넥틴 4	65	66	67	68
V62	8	13	17	25	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	18	26	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	19	27	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	20	28	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	21	29	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	22	30	넥틴 4	69	70	71	72
V62	8	13	17	25	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	18	26	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	19	27	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	20	28	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	21	29	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	22	30	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	23	31	넥틴 4	73	74	75	76
V62	8	13	24	32	넥틴 4	73	74	75	76

제 1 항원 결합 도메인					제 2 항원 결합 도메인				
표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)	표적 항원	CDR1 (서열 번호)	CDR2 (서열 번호)	CDR3 (서열 번호)	VHH (서열 번호)
V62	8	13	17	25	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	18	26	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	19	27	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	20	28	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	21	29	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	22	30	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	23	31	넥틴 4	77	78	79	80
V62	8	13	24	32	넥틴 4	77	78	79	80

[0156] 한 실시형태에서, 항체는 제1 항원-결합 영역 및 상기 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 이 때 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역은 펩티드 링커, 예를 들어, 1 내지 20개 아미노산, 예를 들어, 1 내지 10개 아미노산, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 10개 아미노산 길이를 갖는 링커를 통하여 서로 공유적으로 연결된다. 한 실시형태에서, 펩티드 링커는 서열 번호 81에 제시된 서열 GGGGS를 포함하거나 이로 구성된다.

[0157] 또 다른 실시형태에서, 항체는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 이 때 인간 V62에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역은 인간 EGFR, CD123, PSMA, CD1d, CD40 또는 넥틴 4에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역의 C 말단에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 제1 항원 결합 영역 및 제2 항원 결합 영역을 포함하며, 이 때 인간 V62에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역은 인간 EGFR, CD123, PSMA, CD1d, CD40 또는 넥틴 4에 결합할 수 있는 제2 항원 결합 영역의 N 말단에 위치한다.

[0158] 본 발명의 한 실시형태에서, 항체는 반감기 연장 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시형태에서, 항체는 인간 대상체에게 투여할 때 약 168 시간 이상 더 긴 말단 반감기를 갖는다. 가장 바람직하게는 말단 반감기는 336 시간 또는 더 길다. 본 명세서에서 사용될 때, 본 명세서에서 사용된 항체의 "말단 반감기"란 최종 제거 단계에서 생체 내에서 폴리펩티드의 혈청 농도가 50% 감소하는 데 걸리는 시간을 의미한다.

[0159] 한 실시형태에서, 항체는 반감기 연장 도메인을 추가로 포함하고, 반감기 연장 도메인은 Fc 영역이다. 한 추가 실시형태에서, 항체는 Fc 영역을 포함하는 이중특이성 항체와 같은 다중특이성 항체이다. 이중특이성 항체를 제

조하는 다양한 방법이 당업계에 기재되어 있고, 예를 들어, Brinkmann and Kontermann (2017) MAb 9:182에 의해 검토되었다. 본 발명의 한 실시형태에서, Fc 영역은 2개 Fc 폴리펩티드를 포함하는 이중이량체이며, 이때 상기 제1 항원-결합 영역은 상기 제1 Fc 폴리펩티드에 융합되며, 상기 제2 항원-결합 영역은 상기 제2 Fc 폴리펩티드에 융합되고, 이때 상기 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 동종이량체의 형성보다는 이중이량체의 형성을 선호하는 비대칭 아미노산 돌연변이를 포함한다(예를 들어, Ridgway 외, (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617 참고). 이의 추가 실시형태에서, Fc 폴리펩티드의 CH3 영역은 전술한 비대칭 아미노산 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 상기 제1 Fc 폴리펩티드는 T366W 치환을 포함하고, 상기 제2 Fc 폴리펩티드는 T366S, L368A 및 Y407V 치환을 포함하거나, 또는 이의 반대를 포함하고, 이 때 상기 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따라 인간 IgG1에 상응한다. 추가 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 위치 220에서 시스테인 잔기는 결실되거나 또는 치환되었고, 이 때 상기 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따라 인간 IgG1에 대응한다. 한 추가 실시형태에서, 상기 영역은 서열 번호 82에 제시된 힌지 서열을 포함한다.

- [0160] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 폴리펩티드는 항체를 비활성으로 만드는, 즉, 효과기 기능을 매개할 수 없거나 매개하는 능력이 감소된 돌연변이를 함유한다. 한 실시형태에서, 상기 비활성 Fc 영역은 C1q에 또한 결합할 수 없다. 한 실시형태에서, 상기 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 위치 234 및/또는 235에서 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 상기 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드는 L234F 및 L235E 치환을 포함하고, 이때 상기 아미노산 위치는 EU 넘버링 체계에 따라 인간 IgG1에 대응한다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 L234A 돌연변이, L235A 돌연변이 및 P329G 돌연변이를 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 L234F 돌연변이, L235E 돌연변이 및 D265A 돌연변이를 함유한다.
- [0161] 한 바람직한 실시형태에서, 제1 항원 결합 영역은 서열 번호 16에 제시된 서열을 포함하고, 제2 항원 결합 영역은 서열 번호 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 및 80에서 선택된 서열을 포함하고, (a) 제1 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 83에 제시된 서열을 포함하고 제2 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 84에 제시된 서열을 포함하거나, 또는 (b) 제1 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 84에 제시된 서열을 포함하고 제2 Fc 폴리펩티드는 서열 번호 83에 제시된 서열을 포함한다.
- [0162] 한 실시형태에서, 서열 번호 83의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 83의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0163] 한 실시형태에서, 서열 번호 84의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 87의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0164] 한 추가적인 바람직한 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 85에 제시된 서열, 및 (b) 서열 번호 87, 서열 번호 88, 서열 번호 89 및 서열 번호 90에 제시된 서열들의 군에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0165] 한 추가적인 바람직한 실시형태에서, 항체는 (a) 서열 번호 86에 제시된 서열, 및 (b) 서열 번호 87, 서열 번호 88, 서열 번호 89 및 서열 번호 90에 제시된 서열들의 군에서 선택된 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0166] 한 실시형태에서, 서열 번호 85의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 85의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0167] 한 실시형태에서, 서열 번호 86의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 86의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0168] 한 실시형태에서, 서열 번호 87의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 22의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0169] 한 실시형태에서, 서열 번호 87의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 23의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0170] 한 실시형태에서, 서열 번호 88의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 24의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0171] 한 실시형태에서, 서열 번호 88의 X7은 존재하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 서열 번호 25의 X7은 존재하고 K(리신)이다.
- [0172] 추가적인 주요 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 본 발명에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를

포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

- [0173] 항체는 통상적인 기술, 예를 들어, Rowe 외, 2012 Handbook of Pharmaceutical Excipients, ISBN 9780857110275에 개시된 기술들에 따라 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 부형제 뿐만 아니라 기타 담체, 희석제 또는 보조제는 항체 및 선택된 투여 방식에 적합해야 한다. 약학 조성물의 부형제 및 기타 성분에 대한 적합성은 본 발명의 선택된 항체 또는 약학 조성물의 원하는 생물학적 특성에 대한 유의미한 부정적인 영향(예를 들어, 항원 결합시 실질적인 영향 (10% 또는 그 미만 상대적 억제, 5% 또는 그 미만 상대적 억제, 등등))이 없음을 기준으로 결정된다.
- [0174] 약학 조성물에는 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제 (예를 들어, 비이온성 세제, 예를 들어, Tween-20 또는 Tween-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-없는 아미노산), 방부제, 조직 고정제, 가용화제, 및/또는 약학 조성물에 포함시키기에 적합한 기타 물질들이 포함될 수 있다. 추가추가의 약학적으로 허용되는 부형제에는 본 발명의 항체와 생리학적으로 양립가능한 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수-지연제 및 이와 유사한 것들이 포함된다.
- [0175] 추가 주요 양상에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 항체에 관한 것이다.
- [0176] 본 발명에 따른 항체는 V γ 9V δ 2 T 세포가 종양 세포를 사멸시키는 데 유익한 미세환경을 조성하는 것을 가능하게 한다. 따라서, 바람직한 실시형태에서, 항체는 암 치료에 사용된다.
- [0177] 한 실시형태에서, 항체는 EGFR을 표적으로 하며 원발성 또는 전이성 결장암이나 직장암의 치료에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 복막암의 치료에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 간암의 치료에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 두경부 편평세포 암종(HNSCC)의 치료에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 비소세포 폐암종(NSCLC)의 치료에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 항체는 피부 편평세포 암종의 치료에 사용된다.
- [0178] 또 다른 실시형태에서, 항체는 CD123을 표적으로 하며 급성 골수성 백혈병, B-세포 급성 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병, 호지킨 림프종, 모세포성 형질세포양 수지상 종양, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 만성 림프증식성 질환 또는 골수이형성 증후군의 치료에 사용된다.
- [0179] 또 다른 실시형태에서, 항체는 CD1d를 표적으로 하며 T 세포 림프종, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 림프종, 급성 골수종, 호지킨 림프종, 골수 단핵구성 백혈병, 림프형질세포 림프종, 털세포 백혈병 또는 비장 변연부 림프종과 같은 혈액학적 악성 종양, 또는 신세포 암, 흑색종, 결장직장 암, 두경부 암, 유방암, 전립선암, 폐암, 췌장암, 위식도암, 소장암, 중추 신경계 종양, 수질모세포종, 간세포 암종, 난소암, 신경교종, 신경모세포종, 요로 상피암종, 방광암, 육종, 음경암, 기저세포암종, 메르켈세포암종, 신경내분비암종, 신경내분비종양, 원발성 불명암종(CUP), 흉선종, 외음부암, 자궁경부암, 고환암, 담관암종, 사지암종, 중피종, 췌대부암종, 항문암 또는 융모막암종과 같은 고형 종양의 치료에 사용된다.
- [0180] 또 다른 실시형태에서, 항체는 PSMA를 표적으로 하며 전립선암, 예를 들어, 비전이성 또는 전이성 전립선암, 예를 들어, 전이성 거세 저항성 전립선암, 예를 들어, 치료 불응성 전이성 거세 저항성 전립선암의 치료에 사용된다. 예를 들어, 항체는 PSMA에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 영역을 포함할 수 있으며 탁산 기반 화학요법을 적어도 1회 실패하였고 선택적으로 2세대 또는 그 이후의 안드로겐 수용체 표적 요법/안드로겐 생합성 억제제 (예를 들어, 아비라테론, 엔잘루타미드 및/또는 아팔루타미드)를 투여받은 환자의 전립선암 치료에 사용될 수 있다.
- [0181] 또한, PSMA에 결합할 수 있는 항체는 PSMA가 결장직장암, 폐암, 유방암, 자궁내막암 및 난소암, 위장암, 신세포암, 요로상피암, 간세포암, 구강 편평세포암, 갑상선 종양 및 신경교종을 포함한 원발성 또는 전이성 종양의 종양 신생 혈관 또는 종양 관련 내피 세포 상에서 발현되는 암의 치료에 사용될 수 있다. 더욱이, PSMA에 결합할 수 있는 항체는 두경부의 아테노이드 낭종 암종을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0182] 유사하게, 본 발명은 본 발명에 기술된 본 발명에 따른 다중특이성 항체를 치료를 필요로 하는 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 한 실시형태에서, 질환은 암이다.
- [0183] 일부 실시형태들에서, 항체는 단일요법으로 투여된다. 그러나, 본 발명의 항체는 또한 조합 요법, 즉, 치료될 질환 또는 병태와 관련된 기타 치료제와 조합되어 투여될 수 있다.

- [0184] "치료" 또는 "치료하는"이란 증상 또는 질병 상태를 완화, 개선, 저지, 근절(치유) 또는 예방할 목적으로 본 발명에 따른 효과량의 항체를 투여하는 것을 지칭한다. "효과량"이란 원하는 치료 결과를 달성하는데 필요한 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 폴리펩티드, 예를 들어, 항체의 효과량은 해당 개체의 질환 단계, 연령, 성별, 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 항체의 능력에 따라 달라질 수 있다. 효과량이란 해당 항체의 임의의 독성 또는 해로운 효과를 증가하는 양을 또한 말한다. 투여는 임의의 적합한 경로로 수행될 수 있으나, 일반적으로 정맥내, 근육내 또는 피하와 같은 비경구 투여일 것이다.
- [0185] 본 발명의 다중특이성 항체는 일반적으로 재조합적으로 생성될 수 있다, 즉, 적합한 숙주 세포에서 항체를 코딩하는 핵산 구조체를 발현시킨 후, 생산된 재조합 항체를 세포 배양물로부터 정제함으로써 생산된다. 핵산 구조체들은 해당 분야에 잘 알려진 표준 분자 생물학적 기술에 의해 생산될 수 있다. 이러한 구조체는 일반적으로 발현 벡터를 사용하여 숙주 세포에 도입된다. 적합한 핵산 구조체 및 발현 벡터는 당업계에 공지되어 있다. 항체의 재조합적 발현에 적합한 숙주 세포가 해당 분야에 공지되어 있으며, CHO, HEK-293, Expi293F, PER-C6, NS/O 및 Sp2/O 세포가 포함된다.
- [0186] 따라서, 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 구조체에 관한 것이다. 한 실시형태에서, 구조체는 DNA 구조체다. 또 다른 실시형태에서, 구조체는 RNA 구조체이다.
- [0187] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 구조체를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0188] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 핵산 구조체 또는 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 핵산 구조체를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0189] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함한다.
- [0190] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 임상 배치(batch)를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "임상 배치"는 인간에게 사용하기에 적합한 생성물 조성을 지칭한다.
- [0191] 또 다른 양상에서, 본 발명은 단백질 분해 및/또는 티로신 황산화가 없는 항체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 숙주 세포에서 발현시키는 단계를 포함한다.
- [0192] 한 추가 양상에서, 본 발명은 인간 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화 할 수 있는 항체의 단백질 분해 및/또는 티로신 황산화를 피하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 항체를 인코딩하는 핵산을 제작하는 단계 및 숙주 세포에서 상기 핵산을 발현시켜 상기 항체를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0193] 한 추가 양상에서, 본 발명은 인간 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화 할 수 있는 항체의 균질한 항체 제제를 생산하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 항체를 인코딩하는 핵산을 제작하는 단계 및 숙주 세포에서 상기 핵산을 발현시켜 상기 항체를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0194] 한 실시형태에서, 상기 제작 방법에서 숙주 세포는 CHO 세포 또는 HEK 세포와 같은 포유류 세포이거나, 피키아 파스토리스 세포와 같은 효모 세포이다.

[0195]

표 1: 서열 목록

서열 번호	코드	설명	서열
1	5C8	CDR1	NYAMG
2	5C8	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
3	5C8	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
4	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSPKPEDTAIYY CAAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
5	5C8 var	CDR1	NYAMX ₁ , 이 때 X ₁ 은 S 또는 G 임
6	5C8 var	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
7	5C8 var	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
8	5C8 var1	CDR1	NYAMS
9	5C8 var1	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
10	5C8 var1	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
11	5C8var1	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
12	5C8 var (Y105+R109)	CDR1	NYAMX ₁ , 이 때 X ₁ 은 S 또는 G 임
13	5C8 var (Y105+R109)	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
14	5C8 var (Y105+R109)	CDR3	QFSGADX ₂ GFGX ₃ LGIRGYEYDY, 이 때 X ₂ 는 임의의 아미노산일 수 있고, 이 때 X ₃ 은 R 이 아님
15	5C8 var (Y105+R109)ΔLGIR	CDR3	QFSGADX ₂ GFGX ₃ GYEYDY, 이 때 X ₂ 는 임의의 아미노산일 수 있고, 이 때 X ₃ 은 R 이 아님
16	5C8 var (Y105+R109)	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMX ₁ WFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADX ₂ GFGX ₃ LGIRGYEYDYWGQGTQ

[0196]

서열 번호	코드	설명	서열
			VTVSS, 이 때 x_1 은 S 또는 G 이고, x_2 는 임의의 아미노산 일 수 있고, x_3 은 R 이 아님
17	5C8 var1 (Y105F+R109A)	CDR3	QFSGADFGFGALGIRGYEYDY
18	5C8 var1 (Y105S+R109A)	CDR3	QFSGADSGFGALGIRGYEYDY
19	5C8 var1 (Y105F+R109K)	CDR3	QFSGADFGFGKLGIRGYEYDY
20	5C8 var1 (Y105S+R109K)	CDR3	QFSGADSGFGKLGIRGYEYDY
21	5C8 var1 (Y105F+R109A) ΔLGIR	CDR3	QFSGADFGFGAGYEYDY
22	5C8 var1 (Y105S+R109A) ΔLGIR	CDR3	QFSGADSGFGAGYEYDY
23	5C8 var1 (Y105F+R109K) ΔLGIR	CDR3	QFSGADFGFGKGYEYDY
24	5C8 var1 (Y105S+R109K) ΔLGIR	CDR3	QFSGADSGFGKGYEYDY
25	5C8 var1 (Y105F+R109A)	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFGALGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
26	5C8 var1 (Y105S+R109A)	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGALGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
27	5C8 var1 (Y105F+R109K)	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFGKLGIRGYEYDYWGQGTQV

서열 번호	코드	설명	서열
			TVSS
28	5C8 var1 (Y105S+R109K)	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGKLGIRGYEYDYWGQGTQV TVSS
29	5C8 var1 (Y105F+R109A) ΔLGIR	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFGAGYEYDYWGQGTQVTVSS
30	5C8 var1 (Y105S+R109A) ΔLGIR	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGAGYEYDYWGQGTQVTVS S
31	5C8 var1 (Y105F+R109K) ΔLGIR	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFGKGYEYDYWGQGTQVTVSS
32	5C8 var1 (Y105S+R109K) ΔLGIR	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGKGYEYDYWGQGTQVTVSS
33	7D12 (EGFR)	CDR1	SYGMG
34	7D12 (EGFR)	CDR2	GISWRGDSTGYADSVKG
35	7D12 (EGFR)	CDR3	AAGSAWYGTLYEYDY
36	7D12var8 (EGFR)	VHH	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTSRSY GMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADS VKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLRAEDTAVYY CAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS
37	1D2 (CD123)	CDR1	GRTASSYVMX ₄ , 이 때 X ₄ 는 G 또는 S 임
38	1D2 (CD123)	CDR2	VINWNGDSTYYX ₅ DSVKG, 이 때 X ₅ 는 A 또는 T 임

서열 번호	코드	설명	서열
39	1D2 (CD123)	CDR3	DTRREWYRDGX ₆ WGPPARYEYDY, 이 때 X ₆ 은 Y 또는 F 임
40	1D2 (CD123)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREFVAVINWNGDSTYYTDS VKGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLPEDTAVYY CAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGT QVTVSS
41	LV1050 (PSMA)	CDR1	RFMISEYSMH
42	LV1050 (PSMA)	CDR2	TINPAGTTDYADSVKG
43	LV1050 (PSMA)	CDR3	DGYGY
44	LV1050 (PSMA)	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYS MHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC DGYGYRGQGTQVTVSS
45	1D12 (CD1d)	CDR1	DNVMG
46	1D12 (CD1d)	CDR2	TIRTGGSTNYADSVKG
47	1D12 (CD1d)	CDR3	TIPVPSTPYDY
48	1D12 (CD1d)	VHH	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSMFSD NVMGWYRQAPGKQRELVAITIRTGGSTNYADS VKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLPEDTAVYY CRHTIPVPSTPYDYWGQGTQVTVSS
49	v19 (CD40)	CDR1	RSAMG
50	v19 (CD40)	CDR2	AIGTRGGSTKYADSVKG
51	v19 (CD40)	CDR3	RGPGYPSAAIFQDEYHY
52	v19 (CD40)	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGR SAMGWFRQAPGKEREFVAAIGTRGGSTKYAD SVKGRFTISTDNASNTVYLQMDSLKPEDTAVY RCAVRGPGYPSAAIFQDEYHYWGQGTQVTVS S
53	LV1184 (넥틴 4)	CDR1	INLMG
54	LV1184 (넥틴 4)	CDR2	SISPGGSVRYADSVKG
55	LV1184 (넥틴 4)	CDR3	ESERTYYFDS
56	LV1184 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSINL

서열 번호	코드	설명	서열
			MGWFRQAPAKQRELVTSPGGSVRYADSVK GRFTISRDAKNTVDLQMNSLKPEDTAVYYCA AESERTYYFDSWGQGTQVTVSS
57	LV1181 (넥틴 4)	CDR1	TITRGGSTNYADSVKG
58	LV1181 (넥틴 4)	CDR2	VEPSGMGWRDY
59	LV1181 (넥틴 4)	CDR3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISS
60	LV1181 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSINL MGWHRQAPGKQRELVATITRGGSTNYADSVK GRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAAYYCV DVEPSGMGWRDYWGQGTQVTVSS
61	LV1185 (넥틴 4)	CDR1	LNIMG
62	LV1185 (넥틴 4)	CDR2	TITTGGSTNYADSVRG
63	LV1185 (넥틴 4)	CDR3	ELVRRGPTTY
64	LV1185 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSTFSLNI MGWYRQAPGKQREYVATITTGGSTNYADSVR GRFTISRDAEDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCT AELVRRGPTTYWGRGTQVTVSS
65	LV1186 (넥틴 4)	CDR1	LNIMG
66	LV1186 (넥틴 4)	CDR2	TITSGGSTNYADSVRG
67	LV1186 (넥틴 4)	CDR3	ELVRRGPTTY
68	LV1186 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSTFSLNI MGWYRQAPGKQREYVATITSGGSTNYADSVR GRFTISRDAENTVYLQMDSLKPEDTAVYYCT AELVRRGPTTYWGRGTQVTVSS
69	LV1178 (넥틴 4)	CDR1	RLTMG
70	LV1178 (넥틴 4)	CDR2	RVYASGGGLTDYADSVKG
71	LV1178 (넥틴 4)	CDR3	GLWADMRTMTSTRGY
72	LV1178 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGALVQAGGSLRLSCSVSGLTASRLT MGWFRQAPGKEREFVARVYASGGGLTDYADSV KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLEPEDTAVYYC VAGLWADMRTMTSTRGYWGQGTQVTVSS
73	LV1183 (넥틴 4)	CDR1	INLMG
74	LV1183 (넥틴 4)	CDR2	SITRGGSTWYVDSVKG

서열 번호	코드	설명	서열
75	LV1183 (넥틴 4)	CDR3	ESIGSYTFDR
76	LV1183 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFDINL MGWYRQAPGKRLRELVASITRGGSTWYVDSVK GRFIISRDSAKNTVYLQMNSLKPGDTAVYYCA AESIGSYTFDRWGQGTQTVSS
77	LV1187 (넥틴 4)	CDR1	INVMG
78	LV1187 (넥틴 4)	CDR2	GITSGGSRRLADSVKG
79	LV1187 (넥틴 4)	CDR3	EAVVGDEPY
80	LV1187 (넥틴 4)	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGFLRLSCAASRSVFRINV MGWYRQAPGKQRELVAGITSGGSRRLADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCF AEAVVGDEPYWGQGTQTVSS
81	링커		GGGS
82		변형된 힌지	AAASDKTHTCPPCP
83	IgG1 L234F L235E T366W	중쇄 불변 영역 변이체	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGX _i , 이 때 x_i 은 k 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
84	IgG1 L234F L235E T366S L368A Y407V	중쇄 불변 영역 변이체	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGX _i , 이 때 $x_i은 k 이며 존재하거나존재하지 않을 수 있음$
85	7D12var8-Fc	VHH-Fc	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRTSRSY

서열 번호	코드	설명	서열
			GMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADS VKGRFTISRDNNAKNTVDLQMNSLRAEDTAVYY CAAAAGSAWYGTLEYDYWGQGLTVSSAA ASDKTHTCPPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRLWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGX ₇ , 이 때 X ₇ 은 K 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
86	1D2-Fc	VHH-Fc	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRASSY VMGWFRQAPGKEREFSVAVINWNGDSTYYTDS VKGRFAISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYGQGT QYTVSSAAASDKTHTCPPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGX ₇ , 이 때 X ₇ 은 K 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
87	5C8var1 (Y105F R109A)-Fc	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFSVAISWGGSTSYADS VKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFALGIRGYEYDYWGQGTQV TVSSAAASDKTHTCPPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

[0197]

서열 번호	코드	설명	서열
			QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGX _i , 이 때 x _i 은 K 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
88	5C8var1 (Y105S R109A)-Fc	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWGGSTSYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGALGIRGYEYDYWGQGTQV TVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGX _i , 이 때 x _i 은 K 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
89	5C8var1 (Y105F R109K)-Fc	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWGGSTSYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADFGFGKLGIRGYEYDYWGQGTQV TVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGX _i , 이 때 x _i 은 K 이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
90	5C8var1 (Y105S R091K)-Fc	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMSWFRQAPGKEREFVSAISWGGSTSYADS

서열 번호	코드	설명	서열
			VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAQFSGADSGFGKLGIRGYEYDYGQGTQV TVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHY TQKSLSPGX ₇ , 이 때 X ₇ 은 K이며 존재하거나 존재하지 않을 수 있음
91	1D2 var1	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREFVSVINWNGDSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQT QVTVSS
92	1D2 var2	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWVRQAPGKEREWVSVINWNGDSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQ GTLVTVSS
93	1D2 var3	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMSWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQG TLVTVSS
94	1D2 var4	VHH	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMSWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQG TTVTVSS
95	1D2 var5	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMSWFRQAPGKEREFVAVINWNGDSTYYADS

서열 번호	코드	설명	서열
			VKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY CAADTRREWYRDGYWGPPARYEYD YRGQGT LTVSS
96	1D2 var6	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTASSY VMGWVRQAPGKGLEWVSVINWNGDSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYD YRGQ GTLTVSS
97	1D2 var7	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTASSY VMSWVRQAPGKGLEWVSVINWNGDSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYD YRGQG TLTVSS
98	1D2 var8	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTASSY VMSWFRQAPGKGLEWVAVINWNGDSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYD YRGQG TLTVSS
99	1D2 var9	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYTD SVKGRFAISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYD YRGQG TQVTSS
100	1D2 var10	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREFVSVINWNGDSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAADTRREWYRDGFWGPPARYEYD YRGQGT QVTSS

[0198] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 참조로 포함된다. 그러나, 본 명세서에 인용된 참고문헌, 기사, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원에 대한 언급은 해당 기술이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계 어느 나라에서나 공통된 일반 지식의 일부를 구성한다는 것을 인정하거나 어떤 형태로든 암시하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0199] 실시예

[0200] 실시예 1 / VHH 화합물의 생산 및 정제

[0201] VHH 화합물은 대부분 HEK293-E 253 세포에서 인코딩 플라스미드를 일시적으로 형질감염시키고, (생성 1주일 후) 조건화된 배지로부터 단백질을 침출하고 크로마토그래피 후, 분취용 겔 여과하여 단백질을 정제하여 생산되었다. Superdex-75 컬럼을 사용하여 분취용 크기 배지에서 관찰된 우세한 단량체 피크(분획 1E11-1G2)가 정제되었다. 도 1.

[0202] 정제된 단백질은 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에서 환원 및 비환원 조건하에서 단일 밴드로서 이동하는 것으로 나타났다. 도 2는 대표적인 예를 보여준다.

[0203] 실시예 2 / 정제된 VHH 화합물의 HP-SEC 분석

[0204] 정제된 VHH 화합물의 HP-SEC 분석에 Waters Acquity ARC-bio 시스템이 사용되었다. 10 μg의 항체(농도가 1 mg/mL인 항체 10 μL)를 Waters BEH200 SEC 컬럼(비드 크기 2.5 μm, 컬럼 치수 7.8 x 300 mm)에 주입했다. 이동상은 50 mM 인산나트륨, 0.2 M 염화나트륨 완충액 pH 7.0으로 구성되었으며, 실험에는 0.8 mL/분의 완충액 속도가 사용되었다. 단백질은 214nm 파장에서 흡광도를 측정하여 검출되었다. 총 분석 시간은 주입당 15분이었다. VHH 화합물은 실시예 1에 설명된 대로 생산 및 정제되었다. 놀랍게도, VHH 5C8(서열 번호 13)(이전에 W02015156673에 기술됨) 및 5C8var1(서열 번호 14)(이전에 W02020060405에 기술됨)을 무결성 및 단량체성에 대한 HP-SEC 분석에서 테스트했을 때 두 개의 피크가 관찰되었다: 도 3.

[0205] **실시예 3 / 5C8의 질량 분석에서 80Da의 추가 질량이 확인됨**

[0206] 5C8의 두 이소형의 질량이 다른지 확인하기 위해, 5C8의 단백질 제제를 LC-ESI-MS 질량 분석법으로 분석했다. 이번 분석에서 발견된 주요 종은 번역 후 변형이나 신호 펩티드가 없는 5C8이었다. 두 번째 종은 +80.3 달톤 (Da)의 질량 차이를 나타내는 단백질이었는데, 이는 황산화나 인산화의 가능성을 나타냈다. 이는 추가로 포스와 타제나 설파타제로 처리한 다음, 단백질 분해 후 펩티드의 LC-ESI-MS 질량 분석하여 조사되었다. 설파타제 처리로 인해 CDR3의 7번째 잔기인 Y105(서열 번호 15)를 함유하는 펩티드의 질량이 80Da 감소한 반면, 포스파타제 처리로는 효과가 없는 것으로 나타났다. 이는 5C8의 Y105가 황산화에 의해 번역 후 변형되었다는 것을 증명한다. 이러한 황산화는 단백질 제제의 약 30%에서 나타났다.

[0207] **실시예 4 / 동일한 항-Vδ2 VHH를 함유하는 1D12var5-5C8var1은 HP-SEC에서 동일한 이질성과 동일한 80Da의 추가 질량을 나타낸다.**

[0208] 1D12var5-5C8var1은 가요성 링커를 통해 5C8var1(W02020060405의 서열 번호 87에 기재됨)에 결합된 항-CD1d VHH로 구성된 이중특이성 VHH 화합물이다. 이 단백질은 상기 설명한 바와 같이 HEK 293E 세포에서 발현되었다. 또한, 다양한 발현 시스템에서 단백질 제제를 얻었다: 이중특이성 VHH는 또한 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서도 발현되었다. HP-SEC 분석에서 다양한 단백질 제제를 테스트했을 때 사전 피크가 체계적으로 관찰되었다. 도 4.

[0209] 관찰된 사전 피크는 단백질의 상당한 백분율이 다시 상이한 이소형임을 나타낸다. 5C8 VHH가 황산화된 것으로 나타났고 5C8var1이 정확히 동일한 CDR3 서열을 함유하고 있기 때문에, 1D12var5-5C8var1 배치 또한 질량 분석계를 통해 그 분자량을 분석했다. 단백질 배치(batch)에 따라, 15% 내지 40%가 80Da의 추가 질량을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 이는 VHH 5C8에서 관찰된 황산화와 일치한다.

[0210] **실시예 5 / VHH 5C8 및 5C8var1의 인실리코 분석**

[0211] 5C8과 5C8var1의 상동성 모델은 PDB ID 5M2W를 기반으로 Maestro(Schrodinger)를 사용하여 구축되었다. CDR1과 CDR3은 Prime(Schrodinger)을 이용한 신생(de novo) 루프 예측을 통한 개선이 필요했다. 생성된 모델은 CDR3 잔기 Y105가 5C8var1 모델에서는 205.1 Å, 5C8 모델에서는 122.2 Å의 높은 용매 접근성 표면적을 보이며, 따라서 항원 결합에 기여할 것으로 예상된다는 것을 보여주었다. 이후, 해당 모델을 반응성 잔기들에 대해 분석하였으며, 이들 잔기들은 번역 후 변형(PTM)이 일어나기 쉬움을 나타내는 것이다. 다음으로, 단백질 서열은 서열 기반 PTM 예측 도구인 ModPred를 사용하여 분석되었다. 구조와 서열 모두에서 예측된 변형들이 표 2에 나열되어 있다. 개별적으로 예측된 PTM은 HP-SEC 분석에서 관찰된 질량 차이를 설명할 수 없었다.

[0212] 표 2 | 5C8 및 5C8var1에 대한 Maestro 및 ModPred의 예측 PTM.

잔기 번호	잔기	유형
13*	Q	탈아미드화
32	Y	산화
39	Q	탈아미드화
60	Y	산화
62	D	단백질 분해(ASP)
73	D	단백질 분해(ASP)
74	N	탈아미드화
80	Y	산화
84	N	탈아미드화
90	D	단백질 분해(ASP)
94	Y	산화
95	Y	산화
104	D	단백질 분해(ASP)
105	Y	산화
115	Y	산화
117	Y	산화
118	D	단백질 분해(ASP)
119	Y	산화
122	Q	탈아미드화

[0213]

[0214] * Q13 탈아미드화는 5C8에서만 예측되었다. 유형은 Maestro가 예측한 PTM을 설명한다.

[0215] **실시예 6 | 5C8var1 VHH CDR3 돌연변이체 Y105F 및 Y105S의 설계 및 생산**

[0216] 실시예 5에 설명된 바와 같은 상동성 모델을 사용하여 5C8 및 5C8var1에서 Y105의 황산화물을 방지하는 돌연변이를 도입하였다. VHH의 모델 구조를 기반으로 다음과 같은 두 가지 다른 돌연변이체가 설계되었다: Y105S(알코올 기능을 유지) 및 Y105F(방향족 고리를 유지). 잔기 Y105는 CDR3의 7번째 잔기이며, 돌연변이를 도입함으로써 결합에 대한 효과가 예상되었다. 두 돌연변이 모두 인간화 VHH 서열 5C8var1에서 설계되었으며 두 단백질 모두 HEK293E 세포에서 생산되어 상기 설명한 바와 같이 정제되었다. 인간화된 VHH의 CDR3 아미노산 서열은 비인간화된 VHH의 CDR3 아미노산 서열과 동일하게 유지되었다.

[0217] 5C8var1-Y105F와 5C8var1-Y105S는 둘 다 잘 생산되었고, 분취용 크기 배제에서 단량체 단백질로 나타났다(데이터 미제시). 두 단백질 모두 순도가 매우 높았으며(도 5) 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에서 단일 종으로서 이동했다.

[0218] **실시예 7 | 설계된 CDR3 돌연변이를 함유하는 정제된 VHH의 HP-SEC 분석**

[0219] HP-SEC 분석은 5C8에 대해 설명한 바와 같이 수행되었다. 5C8var1-Y105F와 5C8var1-Y105S가 모두 분석되었다(도 6).

[0220] 설계된 CDR3 돌연변이를 함유하는 정제된 VHH 분자의 HP-SEC 분석에서 알 수 있듯이, 두 돌연변이체 모두에서 더 이상 이질성이 관찰되지 않았다. 이는 관찰된 Y105 번역 후 변형이 없었고 단백질이 균질하였음을 나타낸다.

[0221] **실시예 8 | 생물층 간섭계(BLI)를 사용한 5C8var1, 5C8var1-Y105F 및 5C8va1-Y105S의 친화도 측정은 친화도에 차이가 없음을 보여준다**

[0222] 5C8var1 VHH 항체 단편과 변이체 5C8var1-Y105F 및 5C8var1-Y105S의 Vy9Vδ2 TCR에 대한 결합은 Octet RED96

기기(ForteBio)를 사용하여 생물층 간섭계로 측정했다. 제조합 인간 Vy9Vδ2-Fc 융합 단백질(20 μg/ml)이 항인간 Fc 포획 바이오센서의 리간드로서 포획되었다. 리간드 포획된 바이오센서를 10X 동역학 완충액(ForteBio)에서 VHH 항체 단편의 연속 희석액(40 내지 0.63nM)과 함께 인큐베이션했을 때 센서그램이 기록되었다. 1:1 결합 모델에 적합한 글로벌 데이터를 사용하여 kon(결합 속도 상수) 및 koff(해리 속도 상수) 값을 추정했다. 이러한 값은 $KD = koff/kon$ 을 사용하여 KD(평형 해리 상수)를 계산하는 데 사용되었다.

도 7과 표 3에서 알 수 있듯이, 두 가지 다른 Y105 VHH 돌연변이체에 대해 발견된 KD 값은 5C8var1에 대해 발견된 값과 크게 다르지 않았다. 특히 Y105F 돌연변이체는 5C8var1에서 발견된 것과 비등한 친화도를 가지고 있었다.

표 3 | 제조합 Vy9Vδ2 TCR 단백질에 대한 5C8var1, 5C8var1-Y105F 및 5C8var1-Y105S VHH의 결합의 BLI 측정에서 발견된 친화도 값.

VHH 화합물	KD (nM) +/- SD
5C8var1	0.81 +/- 0.02
5C8var1-Y105F	0.78 +/- 0.23
5C8var1-Y105S	1.59 +/- 0.31

표시된 값은 적어도 3개의 독립적인 측정값의 평균 +/- 표준 편차이다.

실시예 9 | Y105F 돌연변이를 함유하는 항-(EGFR x Vδ2 TCR) 이중특이성 VHH의 기능은 완전히 유지된다

5C8var1과 비교하여 동일한 VHH 5C8var1-Y105F의 친화도가 비등한 기능성으로 변환될 수 있는지 확인하기 위해, 다음과 같이 이중특이성 VHH 7D12var8-5C8var1-Y105F가 설계되었다: 인간화 항-EGFR VHH 7D12var8(Gainkam 외, (2008) J Nucl Med 49(5):788에 설명된 VHH 기반)을 G4S 링커를 통해 5C8var1-Y105F VHH에 결합시켜 7D12var8-5C8var1-Y105F를 형성했다. 두 개의 VHH 분자는 가요성 G4S 링커 서열에 의해 분리되었다. 이 분자는 상기 설명한 바와 같이 생산 및 정제한 다음, EGFR 양성 종양 세포주(A431)에 의존하여 Vy9Vδ2 T 세포 활성화를 유도하고 Vy9Vδ2 T 세포 매개 종양 세포 용해를 일으키는 능력을 테스트했다. 간단히 말해, Vy9Vδ2 T 세포는 표준화된 절차에 따라 항-Vδ2 항체와 함께 자기 활성화 세포 분류(MACS)를 사용하여 건강한 기증자의 혈액으로부터 분리되었다. 그런 다음 이들 세포를 사이토카인과 방사선 조사된 공급 세포(JY 세포주와 다른 기증자의 PBMC를 혼합한 것)를 혼합하여 일주일 동안 확장시켰다. Vy9Vδ2 T 세포는 검정에 사용되었을 때 항상 > 90% 순도였다(FACS에서 Vy9 및 Vδ2에 대해 이중 양성으로 염색). A431 세포주(ATCC, 카탈로그 번호 CRL-1555)는 공급업체의 권장 사항에 따라 배양되었다. 활성화 또는 세포독성 검정을 위해, 검정 전날 96웰 조직 배양 플레이트에 50,000개의 종양 표적 세포를 도말했다. 다음 날, 50,000개의 확장되고 정제된 Vy9Vδ2 T 세포를 일정 농도 범위의 이중특이성 VHH 화합물과 함께 배지에 첨가했다. 활성화 검정에서는, 표시된 항-CD3 항체와 항-CD107A 항체의 혼합물을 사용하여 Vy9Vδ2-T 세포 탈과립화를 평가하였는데, Vy9Vδ2-T 세포를 상기 혼합물에 첨가하여 평가하였다. 4시간 후 세포를 수확하여 세척한 후, 탈과립화 마커 CD107A의 발현에 대해 FACS로 분석하였다. 세포독성 검정을 위해, 공동 배양액의 상층액을 프로테아제(세포 사멸의 지표)의 존재 여부에 대해 다음 날 CytoTox-Glo 세포독성 검정 키트(Promega G9290)를 사용하여 검사했다. 분석 마지막 단계에서 세제를 사용한 세포 용해를 사용하여 100% 사멸을 달성하였다. 도 8은 데이터를 보여준다.

도 8은 7D12var8-5C8var1-Y105F와 비인간화 7D12-5C8이 강력한 Vy9Vδ2 T 세포 활성화와 종양 세포 용해를 유도했음을 보여준다. 이러한 결과는 Y105 돌연변이가 없는 비인간화 '전구체' 분자 7D12wt-5C8의 효능과 일치한다. 표 4는 곡선 적합 후 얻은 EC50 값을 보여준다. 세포독성 검정에서 7D12var8-5C8var1-Y105F는 7D12-5C8에 비해 EC50이 약간 낮았다.

표 4 | GraphPad 소프트웨어를 사용하여 도 8에 나타난 데이터의 곡선 적합 후 발견된 EC50 값.

사용된 항체	EC50 탈과립화(pM)	EC50 세포독성(pM)
7D12-5C8	10	9
7D12var8-5C8var1-Y105F	11	2.5

[0232] 7D12-5C8에서 관찰된 종양 세포 사멸 수준과 비교했을 때 7D12var8-5C8var1-Y105F의 경우 최대 종양 세포 사멸 수준이 약간 낮았다. 그러나 이는 두 가지 다른 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포 기증자를 사용한 두 가지 다른 측정값이었으며 이러한 최대 세포독성 수준은 특히 기증자에 따라 다를 수 있다.

[0233] **실시예 10 / Y105 돌연변이를 함유하는 VHH 5C8var1의 온도 안정성은 변화되지 않았다**

[0234] 다양한 변이체들에 도입된 돌연변이가 VHH 폴딩의 열 안정성에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 돌연변이체들의 녹는점을 NanoDSF(시차 주사 형광 측정법)를 사용하여 측정했다. 항체 샘플을 PBS를 사용하여 최저 농도의 샘플과 동일해질 때까지 희석했다. 항체 샘플들을 이후 나노DSF 등급 모세관에 채우고 Prometheus NT.48로 측정하였다. 실험 동안, 온도는 20에서 95°C로 상승되었다. 단백질의 고유 형광은 350 및 330nm에서 감지되었으며 반사광의 양과 함께 기록되었다. 이러한 측정을 통해, 겔보기 용융 온도(T_m)와 응집 시작점(Tagg)이 결정되었다. 세 가지 항체 단편 모두에 대해, VHH가 완전히 펼쳐지는 용융 개시 온도(T_{on})와 용융 온도(T_m)가 보고되었다(표 5). 5C8var1-Y105F 및 5C8var1-Y105S에 대해 측정된 용융 온도는 5C8var1의 용융 온도와 일치했다: 표 5.

[0235] **표 5 | 5C8var1-Y105F와 5C8var1-Y105S는 5C8var1과 유사한 용융 온도를 보여, 도입된 돌연변이로 인해 안정성이 손상되지 않음을 나타낸다.**

	T_{on} (°C)	T_m (°C)
5C8var1	61.8	86.7
5C8var1-Y105F	64.5	85.5
5C8var1-Y105S	63.9	86.6

[0236]

[0237] **실시예 11 / 반감기 연장된(F_c 함유) 이중특이성 구조체**

[0238] 더 긴 생체 내 혈장 반감기를 가진 분자를 얻기 위해, 7D12var8-5C8var1-Y105F 이중특이성 VHH를 인간 F_c 를 함유하는 치료용 항체 형식으로 재구성했다. 두 VHH 도메인은 다음과 같은 특성을 지닌 인간 IgG1 F_c (즉, CH2 및 CH3) 도메인에 커플링되었다: VHH는 변형된 힌지(AAA, 이어서 SDKTHTCPPCP, 시스테인 220이 결실됨) 및 인간 CH2 및 CH3 도메인에 커플링되었다. CH2 도메인은 LFLE 돌연변이 쌍(L234F, L235E)에 의해 F_c -침묵화되었고, CH3 도메인은 동일 세포에서 두 사슬의 공발현 시, 이중이량체화를 강제하는 '놉-인투-홀' 돌연변이(놉: T366W, 및 홀: T366S, L368A 및 Y407V)로 돌연변이되었다. 이러한 돌연변이 쌍은 과학 문헌(Ridgway 외, (1996) Protein Eng 9:617)에 설명되어 있다. 상기 구조체의 서열들은 서열 번호 16 및 서열 번호 17에 제시되어 있다. F_c 영역을 포함하는 생성된 항체 구조체 7D12var8-5C8var1(Y105F)는 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 로 명명되었다. 마찬가지로, 위치 105의 Y가 S로 대체된 구조체(7D12var8-5C8var1(Y105S)- F_c)가 제조되었다. 상기 구조체의 서열들은 서열 번호 16 및 서열 번호 18에 제시되어 있다.

[0239] 실시예 1에서 설명한 바와 같이, 단백질은 인코딩된 두 개의 발현 벡터를 HEK293E 세포에 공동 형질감염시켜 만들어졌으며 단백질 A 친화도 크로마토그래피 후, 분취용 크기 배제 크로마토그래피하여 배양 상층액으로부터 정제되었다. 이를 통해 단량체성이 높은 단백질 제제가 만들어졌다.

[0240] **실시예 12 / 건강한 인간 PBMC로부터 분리된 일차 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포에 대한 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 의 결합**

[0241] 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 가 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포 수용체(TCR)에 결합하는 것을 보여주기 위해, 건강한 말초혈 단핵세포(PBMC)에서 자기 활성화 세포 분류(MACS)를 통해 인간 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포를 분리한 다음 (de Bruin 외, Clin. Immunology 169(2016), 128-138; de Bruin 외, J. Immunology 198(1)(2017), 308-317)에 설명된 대로 확장했다. 확장된 다클론 및 순수(>95%) $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포를 50000개 세포/웰의 농도로 접종한 다음 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 항체 또는 GP120-5C8var1(Y105F)- F_c 항체와 함께 양성 대조군으로 100nM에서 시작하여 4°C에서 1시간 동안 반로그 적정을 실시했다. 형광 표지된 이차 항-IgG1 항체를 사용하여 유세포 분석으로 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ TCR에 대한 항체 결합을 시각화했다. 도 9는 두 명의 다른 PBMC 기증자(D336 및 D339)에서 유세포 분석기로 측정한 항-IgG1 항체 염색의 평균 형광 강도(MFI) 신호를 보여준다. 시그모이드 곡선은 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 가 낮은 나노몰 범위(~3nM)의 절반 최대 유효 농도(EC50)로 $V_{\gamma}9V_{\delta}2$ T 세포에 대해 유의하게 결합함을 강조하고 있다.

[0242] **실시예 13 / 세포 기반 ELISA에 따른 EGFR 양성 종양 세포에 대한 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 결합**

[0243] EGFR을 발현하는 종양 세포주인 A-431, HCT-116 및 HT-29를 사용하여 7D12var8-5C8var1(Y105F)- F_c 의 상피 성장

인자 수용체(EGFR)에 대한 결합을 세포 기반 효소 결합 면역 흡착 검사(ELISA)로 테스트하였다. 이를 위해, 종양 세포를 먼저 -1일차에 다양한 농도로 접종하고 0일차에 약 50,000개 세포/웰의 농도에 도달하도록 했다. 0일차에, 음성 대조군으로서 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc 항체 또는 GP120-5C8var1(Y105F)-Fc 항체의 절반-대수 적정을 100nM에서 시작하여 37℃에서 1시간 동안 종양 세포에 첨가했다. 이어서 결합된 항체를 2차 인큐베이션 단계에서 37℃에서 1시간 동안 항-IgG1-HRP로 표지하였다. 2차 항체 결합은 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘을 첨가하고 HRP에 의해 유도된 비색 변화를 통해 분석되었으며, 이후 반응을 멈추기 위해 H2SO4를 첨가했다. 광학 밀도(OD)는 파장 450nm에서 UV 분광기로 측정되었다. 도 10은 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc가 A-431, HCT-116 및 HT-29 종양 세포에 ~7nM의 EC50으로 강력하게 결합하는 반면, 비 표적화 대조 항체는 어떠한 테스트 세포주에도 측정 가능하게 결합하지 않았음을 보여준다.

[0244] **실시예 14 / 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc에 의해 유도된 A-431 세포에 의존하는 V γ 9V δ 2 T 세포의 탈과립화**

[0245] 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc가 V γ 9V δ 2 T 세포를 활성화시킬 가능성을 조사하기 위해, V γ 9V δ 2 T 세포를 먼저 단리하여 전술한 바와 같이 확장시켰다. 다음으로, V γ 9V δ 2 T 세포를 다양한 농도의 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc 항체와 PE 표지된 항-CD107a 형광 항체가 존재하는 상태에서 A-431 종양 세포와 함께 1:1 E:T 비율로 배양했다. 24시간 후, 세포를 수확하여 형광 표지된 항-V γ 9 및 항-CD3 항체로 염색하여 V γ 9V δ 2 T 세포를 종양 세포와 구분하였다. 유세포 분석기를 사용하여, 표적 의존성 탈과립화를 반영하는 V γ 9V δ 2 T 세포에서의 CD107a 발현 정도를 조사했다. 도 11은 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc의 농도가 증가함에 따라 V γ 9V δ 2 T 세포가 A-431 세포에 의존적으로 효율적으로 탈과립화하도록 유도되었음을 보여준다. 7D12var8-5C8var1(Y105F)-Fc에 의해 유도된 V γ 9V δ 2 T 세포 탈과립화에 대한 EC50은 피코몰 범위(~40-90 pM)에 있다.

[0246] **실시예 15 / 항체 7D12-5C8은 T 세포 매개 표적 세포 세포독성을 유도한다**

[0247] 이중특이성 VHH 7D12-5C8이 표적 세포에 대한 V γ 9V δ 2 T 세포 매개 세포독성을 유도하는 데 효율적인지 조사하기 위해, A-388 유포피종양 세포주(ATCC, CRL-7905)의 생존력을 V γ 9V δ 2 T 세포와 bsVHH 항체 단편과 함께 공동 배양하여 평가했다. 본 분석에서, 이전에 설명된 바와 같이 건강한 PBMC에서 단리한 V γ 9V δ 2 T 세포를 사용했지만, 이후 이를 동결하여 -150℃에 보관했다. 동결된 V γ 9V δ 2 T 세포를 해동하여 IL-2가 보충된 배지에서 하룻밤 동안 휴식시켰다. A-388 종양 세포를 7D12-5C8(10nM)의 존재 또는 부재 하에 단독으로 또는 휴식시킨 V γ 9V δ 2 T 세포와 함께 1:1 또는 1:0.1의 표적 대 효과기 비율로 접종했다. 추가 대조를 위해, 항체 7D12-5C8(10nM)의 존재 또는 부재 하에 V γ 9V δ 2 T 세포를 단독으로 접종했다. 72시간 후, ATP Lite(Perkin Elmer, 6016731)를 첨가하고 마이크로플레이트 리더로 발광 신호를 판독하여 세포의 생존력을 확인했다. 도 12는 ATP에서 유래된 형광 신호를 보여주며, 이는 대사적으로 활성화된 세포와 그에 따른 생존 가능한 세포의 수를 나타낸다. E:T 비율이 1:1일 때 상기 항체는 생존 가능한 세포의 약 50% 감소를 유도하는 반면, 항체 처리되지 않은 A-388 및 V γ 9V δ 2 T 세포를 공동 배양한 경우에는 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었는데, 이는 항체가 T 세포 매개 세포독성을 유도할 가능성을 보여주는 것이다.

[0248] **실시예 16 / 7D12-5C8 및 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc 활성화 V γ 9V δ 2 T 세포에 의한 종양 세포 사멸**

[0249] bsVHH 7D12-5C8과 항체 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc가 환자 유래 종양 세포에 대해 V γ 9V δ 2 T 세포 매개 세포독성을 유도할 수 있는지 조사하기 위해, 이러한 종양 세포의 생존력을 V γ 9V δ 2 T 세포 및 항체와 함께 공동 배양하여 평가했다. 다양한 유형의 종양 세포를 테스트하였다.

[0250] 조직 샘플(즉, 원발성 및 전이성 결장직장암, 두경부 편평세포 암종(HNSCC), 비소세포 폐암종(NSCLC) 샘플)을 암스테르담 UMC(VUmc 위치)에서 암 환자들로부터 서면 동의를 받은 후 수집하였다. 조직을 수술용 칼날(크기 번호 22; Swann Morton Ltd)로 작은 조각으로 자른 다음, 0.1% DNase I, 0.14% 콜라게나제 A, 5% FCS, 100 IU/ml 페니실린나트륨, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 황산염 및 2.0 mM L-글루타민이 보충된 IMDM으로 구성된 해리 매질에 현탁시키고, 교반 막대가 있는 멸균 플라스크로 옮겨 37℃ 수조에서 45분 동안 자석 교반기에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포 현탁액을 100 μ M 세포 여과기를 통해 흘려보냈다. 종양을 세 번 해리시킨 후 생존 세포 수를 측정하기 위해 트리판 블루 배제법을 사용해 세포를 세척했다.

[0251] 해리된 환자 유래 종양 세포들을 건강한 기증자 유래 V γ 9V δ 2 T 세포와 함께(E:T 비율 1:1) 50nM 7D12-5C8의 존재 또는 부재 하에 4시간 동안 또는 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc 또는 gp120-5C8var1(Y105S)-Fc와 함께 24시간 동안 인큐베이션했다.

[0252] 부착된 세포를, 필요한 경우, 배양 기간 후 트립신-EDTA를 사용하여 분리하고, FACS 완충액(0.5% 소 혈청 알부민과 20 μ g/ml NaN3가 보충된 PBS)에 재현탁시키고 형광 염료로 표지된 항체와 함께 4도에서 30분 동안 인큐베

이션 한 후 LSR Fortessa XL-20(BD)을 사용하여 유세포 분석기로 염색을 측정했다.

- [0253] 제조업체의 지침에 따라 생존/사멸 마커인 7AAD를 123counting eBeads™과 함께 사용하여 살아있는 세포를 식별했다. Kaluza Analysis 버전 1.3(Beckman Coulter) 및 FlowJo 버전 10.6.1 및 10.7.2(Becton Dickinson)를 사용하여 유세포 분석 데이터를 분석했다.
- [0254] 7D12-5C8 및 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc로 유도된 V γ 9V δ 2 T 세포 매개 종양 세포독성은 건강한 기증자 유래 V γ 9V δ 2 T 세포를 다양한 악성 종양(원발성 CRC, 복막 및 간의 CRC 전이, 두경부 편평세포 암종 및 비소세포 폐암종)의 단일 세포 현탁액과 함께 인큐베이션하여 평가되었다.
- [0255] 도 13에 도시된 바와 같이, 7D12-5C8은 V γ 9V δ 2 T 세포에 의한 환자 종양 세포의 실질적인 용해를 유도했다(7D12-5C8에 의해 유도된 용해의 평균 %: CRC 원발성 52.3% 및 p-값 0.0003, CRC 복막 46.0% 및 p-값 0.0052, CRC 간 31.8% 및 p-값 0.0360, 두경부 편평세포 암종 46.1% 및 p-값 0.0187, 비소세포 폐암종 64.1% 및 p-값 0.0153).
- [0256] 또한, 도 14에서 보는 바와 같이, 7D12-5C8var1(Y105S)-Fc는 V γ 9V δ 2 T 세포에 의해 환자 종양 세포의 상당량의 용해를 유도했다(7D12-5C8var1(Y105S)-Fc에 의해 유도된 용해의 평균 %: 71.2% 및 p < 0.0001 및 0.0012). 대조 화합물 gp120-5C8var1(Y105S)-Fc는 측정 가능한 종양 세포 용해를 유도하지 않았다.
- [0257] **실시예 17 / 비인간 영장류 연구에 사용하기 위한 구조체 7A5-7D12var8-Fc의 설계, 생산 및 정제**
- [0258] 비인간 영장류에 대한 생체 내 연구를 위해, 사이노몰구스 V γ 9 TCR 사슬과 교차 반응하는 결합 도메인을 보유한 구조체를 생성하였다(도 15). 이 결합 도메인은 TCR V γ 9 특이성 항체인 항체 7A5를 기반으로 했다(Janssen 외, J. Immunology 146(1) (1991), 35-39). 7A5 기반 항체는 사이노몰구스 V γ 9V δ 2 T 세포에 결합하는 것으로 밝혀졌다(WO2021052995의 실시예 1 참조). 7A5와 항-EGFR VHH 7D12var8을 포함하는 이중특이성 Fc 함유 항체를 제작하였다. 이 분자는 늑-인-홀 기술(KiH; Carter 외, 2001 Imm. Meth. 2001: 248, 7; 늑: T366W; 홀: T366S, L368A 및 Y407V)을 사용하여 이중이량체화를 위해 설계된 인간 IgG1 Fc 꼬리를 함유하였다. 7A5 항체의 V γ 9 결합 scFv는 '늑' 사슬에 커플링되었고; EGFR 결합 VHH 7D12var8은 KiH Fc 쌍의 '홀' 사슬과 인프레임으로 복제되었다. 또한, 상부 힌지는 일반적으로 CL에 연결시키는 시스테인(C220)을 제거하고 'EPK'를 'AAA'로 변경하여 더 많은 가요성을 도입시키기 위해 'AAASDKTHTCPPCP'로 설계되었다. CH2의 N-말단 부분은 FcRn 결합을 유지하면서도 Fc 수용체(CD16, -32 및 -64) 상호 작용을 제거(침묵 돌연변이 L234F, L235E)하도록 설계되었다. 그 결과로 생성된 구조체는 7A5-7D12var8-Fc로 명명되었다.
- [0259] 이 분자는 HEK293E 세포에서 두 가지 다른 사슬을 인코딩하는 두 가지 플라스미드의 일시적 공동 형질감염을 통해 생산되었으며, 단백질 A 친화도 크로마토그래피 후, 분취용 크기 배제 크로마토그래피하여 배양 상층액으로부터 정제되었다(실시예 1). ELISA와 두 항원의 제조합 형태를 사용하여 해당 분자가 각 표적에 약 3나노몰(nM)의 겔보기 친화도로 결합하는 것으로 나타났다(도 16). 해당 분자의 기능은 시험관 내에서 확장된 V γ 9V δ 2 T 세포의 표적 의존적 활성화(CD107a 발현)와 그에 따른 T 세포 매개 종양 세포 용해를 유발한다는 것을 보여줌으로써 입증되었다(도 17).
- [0260] **실시예 18 / 이중특이성 항체 7A5-7D12var8-Fc는 탐색적 다중 용량 비인간 영장류(NHP: 사이노몰구스 원숭이) 연구에서 내약성이 우수했다**
- [0261] 다중 용량 탐색적 NHP 연구에서, 7A5-7D12var8-Fc를 3마리의 암컷 사이노몰구스 원숭이에게 각각 1mg/kg, 5mg/kg 및 23mg/kg 용량으로 투여했다. 항체는 5mL/kg으로 30분 간격으로 주입되었으며; 4주마다 주입이 투여되었다. 처음 2개의 1mg/kg 및 5mg/kg 투여 군(투여 당 동물 1마리)에 동시에 투여하였고, 3회(매주) 투여 후, 세 번째 투여 군(23mg/kg)이 1차 투여를 받았다. PK 분석, 임상 화학 매개변수 분석, 사이토카인 수준 측정, 유세포 분석기에 의한 혈액 세포 하위집단 분석을 위해 정기적으로 동물의 혈액을 채취했다. 마지막 용량을 투여하고 하루 후에 동물을 안락사시키고 조직병리학적 검사와 면역조직화학(IHC)을 위해 조직을 채취하여 준비했다.
- [0262] 치료받은 동물의 혈중 7A5-7D12var8-Fc 농도에 대한 약동학 분석(ELISA로 측정, 도 18) 결과, 해당 항체는 반감기 범위가 84 내지 127시간인 IgG 유사 PK를 보인 것으로 나타났다. 1mg/kg을 투여받은 동물의 경우, 3차 주사 이후 항체의 반감기가 더 짧아졌는데, 이는 해당 동물에서 항약물 항체(ADA) 반응이 나타났기 때문일 수 있다.
- [0263] 발견된 클리어런스 값은 0.36 내지 0.72 mL/h/kg이고 분포 용적은 58.5 내지 115.2 mL/kg였다. 전신 노출은 1 내지 23mg/kg 사이에서 용량에 비례하여 증가했다. 그러나 반복 투약 후에는 축적이 관찰되지 않았다.
- [0264] IHC를 통해 다양한 조직(림프절, 근육, 피부, 결장)에서 화합물을 검출할 수 있었으며; 예상대로 이들 조직에서

화합물 염색 강도는 용량에 비례했다(데이터 미제시). 혈액 세포의 유세포 분석 결과, 림프구의 일시적인 감소가 여러 번 나타났는데(도 19) 이는 이런 종류의 다중 용량 연구에서 자주 관찰되는 것으로 이는 시술과 관련이 있다. 도 19는 투약 후 2시간마다 T 세포 수가 일시적으로 감소한 것을 보여준다. 그러나 T 세포의 수는 주사 후 2일 만에 기준선 수준으로 돌아왔다.

[0265] 대조적으로, V γ 9 양성 T 세포의 수는 말초혈액에서 감소했으며 이전의 빈도를 회복하지 못했다. 이들 세포는 연구 기간 동안 거의 나타나지 않았는데, 이는 해당 화합물의 특이적인 약력학적 효과를 입증한다. 치료받은 동물의 혈중 사이토카인을 측정된 결과, 해당 치료는 사이토카인을 거의 방출시키지 않았으며 이는 거의 전적으로 화합물의 1차 주사시에만 제한되었다. 도 20은 실시예로 측정된 IL-6 수준을 보여준다.

[0266] 일반적인 결론으로, 7A5-7D12var8-Fc를 이용한 NHP 치료는 내약성이 매우 우수하였으며 임상적 독성 징후는 나타나지 않았다. 더불어, 조직병리학적 검사에서 검사한 장기 중 어느 것에도 거시적, 미시적 이상이 발견되지 않았다(데이터 미제시). 비교: 31 μ g/kg/일의 지속 주입 용량에서 항-EGFR x CD3 BiTE는 NHP에 치명적이었다(Lutterbuese 외, Proc Natl Acad Sci USA 2010: 107(28), 12605).

[0267] **실시예 19 | VHH 5C8var1은 Fc 함유 이중특이성 항체 형식의 생산에서 위치 Y105의 잔기와 상관없이 위치 109에서 부분적으로 절단된다**

[0268] 위에서 설명한 바와 같이, Fc를 보유하는 형식은 변형된 인간 IgG1 Fc에 융합된 두 개의 VHH 분자를 포함하며, 인간화된 '중쇄 단독' 항체 분자를 형성한다. CHO 세포에서 V δ 2 결합 VHH 5C8var1을 포함하는 치료용 Fc 함유 이중특이성 분자의 대량 생산을 위한 세포주 개발 중 SDS-PAGE 분석에서 절단된 적은 백분율의 생성물이 발견되었다(도 21).

[0269] LC-ESI-MS 질량 분석(도 22 및 표 6)은 놀랍게도 SDS-PAGE에서 볼 수 있는 절단된 종들이 VHH의 CDR3에 위치한 위치 109 이후에서 절단되는 적은 백분율의 5C8var1 VHH로 인한 것일 수 있음을 보여주었다. 인실리코 분석(실시예 5)에 기반하여서는 예측하지 못했던 이 현상은 서로 다른 Fc를 함유하는 이중특이성 분자에서 2번째 사슬 상의 (다른) 표적 VHH 팔과 무관하게 그리고 VHH 5C8var1의 위치 105의 아미노산과 무관하게 관찰되었다.

[0270] 위치 109 이후에서의 절단으로 인해 대부분의 VHH가 없어지고, 이로 인해 기능을 하지 않는 단백질이 생성된다. N-말단이 절단된 단백질의 백분율은 낮았고(1-3%) 시간이 지나도 일정했는데, 이는 상기 단백질의 세포 내 생산 및 가공 과정에서 절단이 일어났음을 시사하는 것이다.

[0271] **표 6 | VHH-Fc 중쇄 단독 항체의 LC-ESI-MS 측정값의 질량 주석화.**

화합물	이론 질량(Da)	측정 질량(Da)	질량 오차(Da)	상대 강도(MS 신호)
이종이량체, 리신의 2x C-말단 절단, 2x GOF 글리코실화, N-말단 절단(1-109)	68805.1	68806.7	+1.6	3.4%
이종이량체, 리신의 2x C-말단 절단, GOF 글리코실화	79111.6	79115.0	+3.4	<0.1%
이종이량체, 리신의 2x C-말단 절단, 2x GOF 글리코실화	80556.9	80558.7	+1.8	96.5%

[0272]

[0273] **실시예 20 | 생성물 동질성을 높이기 위한 5C8var1의 서열 변이체 설계**

[0274] 5C8의 CDR3 서열은 서로 다른 Fc를 함유하는 이중특이성 분자에서 관찰되었던 단백질 분해를 피하기 위해 두 위치에서 변경되었다. 위치 108의 G(G108)는 A로 변경되었고 위치 109의 R(R109)은 동일한 순진하를 유지하기 위해 K로 변경되거나, 또는 A로 변경되었다. 도 23. 또한, R109 위치가 'A'로 변경되었고 CDR3 영역으로부터 4개의 잔기가 결실된 (Δ GIR) 변이체(R109A Δ GIR)가 생산되었다.

[0275] 이러한 네 가지의 서로 다른 서열 변이체들(G108A, R109A, R109K 및 R109A Δ LGIR)은 단일 VHH 및 두 번째 결합

팔인 CD123-결합 표적화 VHH를 갖는 이중특이성 Fc 함유 분자(서열 번호 12)로서 발현 및 정제되었다(기존에 PCT/EP2022/054993에 설명되었음(참조로 포함됨)). Fc에 융합된 TCR에 대해 지향되는 (돌연변이된) VHH를 인코딩하는 단백질 사슬은 정제를 위해 C 태그로 연장되었다. 단백질은 HEK293E 세포에서 인코딩 플라스미드를 일시적으로 형질감염시켜 발현되었고, 분비된 단백질은 C-태그 친화도 크로마토그래피 후, 분취용 크기 배제 크로마토그래피하여 조건화된 세포 배양 상층액으로부터 정제되었다. 단백질의 무손상 질량 분석(LC-ESI-MS) 결과, 모든 단백질의 순도가 >98%이며 소규모 생산으로 생산된 모든 단백질 배치에서 절단이 관찰되지 않았음이 확인되었다.

[0276] 실시예 21 / BLI를 통한 친화도 측정은 위치 109가 허용적임을 보여준다.

[0277] 위치 108과 109에서의 돌연변이가 다양한 VHH 분자의 결합 특성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 옥텟 시스템을 사용한 생물층 간섭계(BLI)로 단일 VHH 단백질을 V_γ9V_δ2 T 세포 수용체의 재조합 형태에 대한 결합에 관해 테스트했다. 도 24와 표 7은 Y105F 돌연변이가 있는 원래의 인간화된 5C8 VHH(5C8var1)가 0.74nM의 친화도를 가지고 있으며, R109A 또는 R109K 돌연변이를 추가로 함유하는 VHH 분자가 결합을 유지했다는 것을 보여준다(친화도는 크게 유의하게 변하지 않음). 그러나 위치 108에 추가 돌연변이를 함유하는 5C8var1-Y105F의 친화도는 10배 감소했다. R109AΔLGIR 변이체는 더 이상 V_γ9V_δ2 TCR에 측정 가능한 결합을 하지 않았다. 이 데이터는, 모든 (돌연변이된) VHH 분자가 잘 발현되었지만 R109 위치만이 V_γ9V_δ2 T 세포 수용체 결합을 허용하고 서열의 변화를 허용했다는 것을 보여준다. R109AΔLGIR 변이체에서 관찰된 결합의 부재는 특정 결합에 CDR3가 필요하다는 것을 보여준다.

[0278] 표 7 | 재조합 V_γ9V_δ2 TCR 단백질에 대한 5C8var1-Y105F, 5C8var1-Y105F/G108A, 5C8var1-Y105F/R109A 및 5C8var1-Y105F/R109K VHH의 BLI 측정에서 발견된 친화도 값.

VHH 클론	BLI에서 측정된 친화도(nM)
5C8var1-Y105F	0.74
5C8var1-Y105F/G108A	9.2
5C8var1-Y105F/R109A	1.2
5C8var1-Y105F/R109K	0.82
5C8var1-Y105F-R109AΔLGIR	ND

[0279]

[0280] ND = 결합이 부족하여 측정되지 않음.

[0280]

[0281] 실시예 22 / 유세포 분석기를 사용한 위치 108 및 109 VHH 변이체의 겉보기 친화도 결정

[0282] 5C8var1 VHH의 위치 108 및 109에서의 돌연변이가 세포에서 발현되는 V_γ9V_δ2 T 세포 수용체와의 결합에 영향을 미치는지 테스트하기 위해, 돌연변이된 VHH 분자의 Fc 함유 형태들을 1차 확장된 V_γ9V_δ2 T 세포에 대한 결합에 관하여 유세포 분석기에서 테스트했다. 건강한 지원자로부터 얻은 혈액의 PBMC 분획으로부터 1차 V_γ9V_δ2 T 세포를 분리한 다음 방사선 조사된 공급자 세포와 사이토카인들의 혼합물을 사용한 혼합 림프구 반응을 사용하여 증식시켰다. 50,000개의 V_γ9V_δ2 T 세포의 분취량을 일정 농도 범위의 Fc 함유 이중특이성 분자와 함께 인큐베이션 한 후 PE 표지된 항-인간 IgG 검출 항체로 결합을 검출했다. BLI에서 얻은 결과와 마찬가지로, R109 돌연변이를 함유하는 분자는 겉보기 친화도(즉, V_γ9V_δ2 T 세포에 대한 결합)에 있어서 원래 분자와 구별할 수 없었다(도 25); 결합에 대한 EC50 값은 매우 유사했다. R109AΔLGIR CDR3를 함유하는 이중특이성 분자는 세포에 유의미하게 결합하지 않았고(미제시) G108 돌연변이는 매우 약한 결합을 보였다.

[0283] 실시예 23 / 이중특이성 Fc 함유 R109 돌연변이체 분자는 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화와 표적 의존성 V_γ9V_δ2 T 세포 매개 세포독성을 유도하는 데 있어 동일하게 강력하다.

[0284] 5C8var1의 위치 108 및 109 변이체들을 함유하는 이중특이성 Fc 함유 항-CD123 x TCR 이중특이성 분자를 표적 의존성 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화(CD107a 발현 분석을 통해 결정) 및 V_γ9V_δ2 T 세포 매개 표적 세포 세포독성을 유도하는 능력에 대해 실시예 14 및 15에서 설명한 바와 같이 테스트했다. 두 개의 표적 세포주(둘 다 CD123 분자를 발현): MOLM-13 및 THP-1가 사용되었다. 도면은 건강한 기증자 한 명의 V_γ9V_δ2 T 세포를 사용하여 대표적인 결과를 보여주는데; 두 명의 다른 V_γ9V_δ2 T 세포 기증자를 테스트한 결과, 두 기증자 모두에서 비슷한 결과를 얻었다.

[0285] 도 26 및 27은 모든 이중특이성 분자가 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화와 V_γ9V_δ2 T 세포 매개 표적 세포 세포독성을 유도할 수 있었음을 보여준다. (A 또는 K로의) R109 돌연변이를 함유하는 변이체들은 Y105F 돌연변이만 가진 원래 분자만큼 강력했다. R109A 변이체에 대한 EC50 값(표 8)은 다른 두 변이체들의 값보다 약간 더 낮았다.

[0286] 표 8 | Fc 함유 이중특이성 분자로 유도된 V_γ9V_δ2 T 세포 활성화 및 종양 세포 독성의 EC50 값.

화합물	Molm13 EC50 탈과립화(pM)	Molm13 EC50 세포독성(pM)	Thp-1 EC50 탈과립화(pM)	Thp-1 EC50 세포독성(pM)
항-CD123 x 5C8var1-Y105F	2.6	1.4	1.0	0.5
+ R109A	2.6	1.2	0.8	0.2
+ R109K	2.6	1.2	1.0	0.5

[0287]

[0288] 실시예 24 | 항체의 안정성

[0289] V_δ2 결합 VHH에서 위치 109에 변경을 도입하였을 때 항체의 열 및 콜로이드 안정성에 영향을 미치는지 확인하기 위해, Fc 함유 이중특이성 항체의 언폴딩(unfolding)을 나노-DSF(시차 주사 형광 측정법)를 사용하여 테스트했다. 표 9는 언폴딩이 관찰되었던 온도와 혼탁도(단백질 응집)가 나타났던 온도를 보여준다. R109 돌연변이체는 모체 분자와 비교하여 거의 동일한 열 안정성을 가졌다.

[0290] 표 9 | 다양한 Fc 함유 이중특이성 항체의 열 안정성 매개변수. IP: 변곡점.

화합물	IP #1 (°C)	IP #2 (°C)	혼탁도(°C)
항-CD123 x 5C8var1- Y105F	65.65	71.61	67.75
+ R109A	64.53	70.79	68.69
+ R109K	65.17	70.75	67.15

[0291]

[0292] 또한, 항체는 가속 스트레스 테스트에서 테스트되었다: 단백질은 고온 및 산성 또는 염기성 조건, 또는 산화 스트레스 조건에서 인큐베이션되었다.

[0293] 온도를 높이기 위해, 단백질 샘플을 인산 완충액(pH 7.4)으로 조정하여 1 g/L로 만들고 1주일 동안 인큐베이터에서 40°C에서 인큐베이션 한 후, 샘플들을 분취하여 분석할 때까지 2-8°C 또는 -80°C에서 보관했다.

[0294] 낮은 pH 조건의 경우, 단백질 샘플은 50 mM 아세트산 완충액(pH 5.0)에 대해 초여과(분자량 컷오프값(MWCO) 30 kDa)를 통해 1 g/L로 재완충된 후, 인큐베이터에서 1주일 동안 40°C 및 낮은 pH 조건에서 인큐베이션했다. 높은 pH 조건의 경우, 단백질 샘플은 100 mM 아세트산 완충액(pH 8.5)에 대해 초여과(MWCO 30 kDa)를 통해 1 g/L로 재완충된 후, 인큐베이터에서 1주일 동안 40°C 및 높은 pH 조건에서 인큐베이션했다.

[0295] 산화 조건의 경우, 단백질 샘플은 인산염 완충액(pH 7.4 및 0.05% H₂O₂)에 대해 초여과(MWCO 30 kDa)를 통해 1 g/L로 재완충된 후 실온에서 24시간 동안 인큐베이션했다.

[0296] 산성, 염기성 또는 산화 조건에서 인큐베이션 한 후, 샘플은 인산염 완충액(pH 7.4)으로 초여과(MWCO 10 kDa)하여 재완충된 후, 분취하여 분석할 때까지 2-8°C 또는 -80°C에서 보관했다.

[0297] 응집물과 단편들에 대한 분석은 SEC-UV에 의해 수행되었으며(표 10), 명시된 가속 스트레스 조건에서 인큐베이션 한 후 고분자량 중(HMWS) 및/또는 저분자량 중(LMWS)의 백분율에 변화가 전혀 없거나 미미한 변화만이 관찰되었다. 중요한 점은, R109 돌연변이체에서 관찰된 변화가 모체 분자의 변화와 거의 유사했다는 것이다.

[0298] 표 10 | 스트레스 처리 전후 다양한 Fc 함유 이중특이성 항체의 SEC-UV에 의해 결정된 HMWS, 주요 피크 및 LMWS의 요약.

화합물	품질 속성	스트레스 받지 않은 샘플	높은 온도	산성 조건	염기성 조건	산화 조건
항-CD123 x 5C8var1- Y105F	HMWS[%]	1.23	1.90	0.88	2.06	4.71
	주요 피크[%]	98.77	97.66	99.12	97.18	95.07
	LMWS[%]	n.d.	0.44	n.d.	0.75	0.23
+ R109A	HMWS[%]	3.36	3.54	2.30	3.49	4.66
	주요 피크[%]	96.64	96.36	97.55	95.99	95.34
	LMWS[%]	n.d.	0.10	0.15	0.51	n.d.
+ R109K	HMWS[%]	3.09	2.78	2.00	3.44	4.48
	주요 피크[%]	96.90	97.07	97.87	96.07	95.51
	LMWS[%]	n.d.	0.15	0.13	0.49	n.d.

[0299]

[0300]

환원 후 CGE/CE-SDS를 통해 단편들에 대한 추가 분석을 수행했다(표 11). LMWS의 백분율에는 변화가 없거나 미미한 변화가 관찰되었고, R109 돌연변이체에서 관찰되었던 변화는 모체 분자에서 발견된 변화들과 매우 유사했다.

[0301]

표 11| 스트레스 처리 전후 다양한 Fc 함유 이중특이성 항체의 SEC-UV에 의해 결정된 HMWS, 주요 피크 및 LMWS의 요약.

화합물	품질 속성	스트레스 받지 않은 샘플	높은 온도	산성 조건	염기성 조건	산화 조건
항-CD123 x 5C8var1- Y105F	LMWS(%)	1.00	1.14	0.96	4.52	1.02
	주요 피크(%)	99.00	98.86	99.04	95.48	98.98
+ R109A	LMWS(%)	6.71	7.13	6.57	9.36	7.14
	주요 피크(%)	93.29	92.87	93.43	90.64	92.86
+R109K	LMWS(%)	5.19	6.35	5.31	7.63	6.40
	주요 피크(%)	94.81	93.65	94.69	92.37	93.60

[0302]

[0303]

실시예 24 / CDR 이식을 사용한 항-CD123 VHH 1D2의 인간화

[0304]

1D2 VHH 항체 단편은 CDR-이식 기술을 사용하여 인간화되었다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,225,539 및 Williams, D.G. 외, 2010, Antibody Engineering, 제1권, 21장 참조). 첫째, IgBLAST를 사용하여 인간 생식 세포 서열을 식별했다(Ye J. 외, 2013, Nucleic Acids Res. 41:W34-40). 가장 가까운 인간 생식 세포 서열인 V 유전자 IGVH3-23 04가 식별되었다(78.4% 동일성). 이 생식세포 서열은 라마 CDR을 직접 이식하는 데 사용되었으

며(인간 생식 세포 IGVH3-23^{*}04와 91.8% 동일성), 그 결과 서열 번호 32의 구조체가 생성되었다. 다음으로, NCBI NR 데이터베이스(2020년 9월 27일 다운로드)에서 BLASTP(버전 2.10.0+)를 쿼리하여 1D2 서열과 가장 높은 동일성을 보이는 인간 템플릿 서열을 식별했다. 70% 이상의 유사도 점수를 보이고 유사한 CDR 길이, 바람직하게는 1D2 CDR1, CDR2, CDR3 각각에서와 동일한 CDR 길이를 보이는 두 개의 VH 서열들이 식별되었다. GenBank(Benson, D.A. 외, 2013, Nucleic Acids Res. 41(D1):D36-42) 접근 # CAD60357.1 및 AKU38567.1에 의해 인코딩된 프레임워크는 1D2 CDR들의 이식을 위한 템플릿으로 선택되어 다음과 같은 cDNA 구조체: 서열 번호 29 및 33 각각이 생성되었다. 프레임워크 및 CDR 정의는 Kabat 외,의 문헌("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., 외, US Department of Health and Human Services, (1983))에 의해 결정된 것과 같다. VHH 구조에 대한 인간화된 프레임워크 잔기들의 영향을 이해하기 위해, BioLuminate 4.2.156(Schrodinger) 내의 '항체 예측' 도구(기본 매개변수)를 사용하여 1D2 VHH의 상동성 모델을 만들었다. 상동성 모델은 PDB ID 6GKU를 기반으로 구축되었다. CDR을 인실리코 방식으로 이식하여 CDR의 루프 형태, 표면의 소수성 및 구조적 무결성(예를 들어, 강성 증가)과 같은 특성들에 대한 인간 잔기의 영향을 연구했다. 생성된 구조체들을 이러한 특징들에 대해 확인하여, 서열 번호 26, 27, 28, 30, 31, 34 및 35의 추가 구조체를 설계하였다. 이러한 인간화 1D2-VHH의 서열은 다음과 같은 방향의 V_H2 특이적 VHH(5C8var1; 서열 번호 18)가 있는 이중특이성 VHH로 재포맷되었다: N-말단-인간화 항-1D2 VHH-링커-항-V_H2 VHH-C-태그. 이후 이들 분자를 인코딩하는 cDNA를 합성하여 HEK293E 세포에서 발현시키기 위한 발현 벡터에 복제되었다. 단백질을 세포의 일시적 형질감염을 통해 만들어졌으며, C-태그 친화도 크로마토그래피 후, 분취용 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 배양 상층액으로부터 정제되었다.

[0305] 실시예 25 / 생물층 간섭법(BLI)을 사용하여 CD123을 결합시키기 위한 인간화 1D2-5C8var1(Y105F) 변이체들의 친화도 결정

[0306] 인간화 1D2-5C8var1 변이체들이 CD123에 결합하는 동역학을 확인하기 위해, 정제된 재조합 CD123-Fc 융합 단백질(Bio-Techne/R&D Systems)을 Octet Red96e(Sartorius) 기기에 사용하는 항 인간 IgG Fc 캡처 센서(5 µg/ml 농도 사용)에 1nm의 밀도로 로딩했다. 그런 다음 다양한 센서들을 50nM에서 시작하여 2배로 희석되는 다양한 농도의 인간화된 1D2-5C8var1 변이체들에 담갔으며; 희석은 공급업체에서 제공한 10x 동역학 완충액(10xKB)으로 이루어졌다. 수득된 센서그램으로부터, 곡선 적합을 통해 동역학적 결합 및 해리 속도 상수를 결정했다. 적합이 가능한 경우, 결합 및 해리 속도 상수는 인간화된 1D2-5C8var1 변이체의 CD123에 대한 결합 친화도를 계산하는데 사용되었다. 측정은 두 번 수행되었으며, CD123에 대한 다양한 인간화 1D2-5C8var1 변이체의 친화도 범위는 모체 1D2와 비교하여 유사한 2.6nM로부터 표 12에서 보는 바와 같은 결합되지 않은 변이체에 이르기까지 다양했다. 참고로, 비인간화 (모체) 1D2가 이들 실험에 포함되었다.

[0307] 표 12| 재조합 CD123에 대한 1D2 인간화 변이체의 친화도

서열 번호	KD (nM)	SD
1	3.1	0.7
26	7.2	0.4
27	24.5*	
28	14.9	4.3
29	20.0	7.5
30	7.7	1.5
31	29.1*	
32	n.b.	
33	44.1*	
34	2.6	0.5
35	10.4	7.5

[0308]

[0309] * 낮은 결합(>20nM), 측정은 한 번만, n.b.: 결합이 관찰되지 않음

[0310] **실시예 26 / 이중특이성 항체를 안정적으로 발현하는 세포 풀의 개발.**

[0311] 모든 단백질 사슬(1D2-Fc(서열 번호 21), 5C8var1-Y105F-Fc(서열 번호 37) 및 5C8var1-Y105F-R109A-Fc(서열 번호 22))을 인코딩하는 cDNA를 역번역으로 설계한 후 계약 연구 기관(CRO)에서 중국 햄스터 난소(CHO)-CD390 세포에서 발현되도록 코돈 최적화하였다. cDNA는 합성 유전자 합성을 통해 생성되었으며 항생제 내성(선별) 유전자(푸로마이신 또는 메토틱세이트 내성을 부여함)를 보유한 독점적인 발현 벡터에 클로닝되었다. 두 개의 다른 사슬을 인코딩하는 두 개의 다른 플라스미드(1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-Fc와 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc의 조합)를 상이한 플라스미드 비율로 CHO-CD390 세포에 공동 형질감염시켰다. 48시간 후, 푸로마이신과 메토틱세이트에 대한 선별을 시작하였고, 13일 동안 배양한 후, 두 항생제 모두에 내성을 가진 클론 풀을 얻어 동결보관했다.

[0312] **실시예 27 / 조건화된 세포 배양 상층액으로부터 이중특이성 항체의 정제**

[0313] 선별된 세포 풀에 의한 가용성 항체의 생산은 Infors HT 멀티트론 세포 인큐베이션 셰이커(12ml 스케일의 생물 반응기 튜브, 14일 배양)에서 일반적인 유가식 프로토콜을 사용하여 시작되었다. 생산 후, 항체는 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 사용하여 조건화된 세포 상층액으로부터 정제되었다. 간단히 말해, 단백질은 200mM 인산나트륨(pH7.0) 중의 단백질 A HP SpinTrap(단백질 A 세파로스) 컬럼(GE Healthcare)에 포획되었다. 결합 및 세척 후, 상기 항체는 pH 쇼크(100mM 구연산나트륨 pH3.6)를 사용하여 용리되었고, 이 용액은 1M Tris-HCl(pH9.0)을 첨가하여 즉시 중화되었다. 정제된 항체의 양은 단백질 A 센서와 인간 IgG를 표준으로 장착한 Octet Red96 시스템(Sartorius)을 사용하여 생물층 간섭법(BLI)으로 정량화했다.

[0314] **실시예 28 / CE-SDS(모세관 전기영동)에 의한 정제된 단백질의 분석**

[0315] 모세관 전기영동은 단백질을 분자량 별로 분리하고 UV 분광광도법을 통해 모든 단백질 성분들을 정량화할 수 있다. 샘플 준비에는 변성제인 도데실황산나트륨(SDS)의 존재 하에 단백질을 열 변성시키는 과정이 포함된다. 변성 후, 샘플 성분들은 대체가능한 SDS 폴리머 매트릭스를 함유하는 모세관에서 전기 이동도(electro-mobility) 차이를 기준으로 분리되었다. 도 28에서는 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-Fc(도 28A) 및 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc(도 28B)의 비환원 분석의 전기영동도를 나타낸다. 분석은 220nm 파장에서 단백질을 검출하기 위한 PDA 검출기가 장착된 PA800 Plus 시스템(SCIEX)을 사용하여 수행되었다. 비환원 조건에서 단백질이 변성되기 때문에, 두 샘플의 주요 성분은 체류 시간이 24-25분인 이중이량체이다. 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-Fc의 경우, '피크 2'로 표시된 5C8var1-Y105F-Fc의 절단된 버전이 감지되는 반면, 5C8var1-Y105F-R109A-Fc의 전기영동도에는 해당 피크가 없는데, 이는 5C8var1-Y105F-R109A-Fc가 5C8var1-Y105F-Fc에서 관찰되는 것처럼 단편화되기 쉽지 않음을 입증하는 것이다. 표 13은 다양한 종의 정량화를 요약한 것이다. 25분에서의 주요 피크는 손상되지 않은 이중이량체에 해당하고; '피크 1'은 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-Fc를 제조할 때 존재하는 소량의 반향체(half-body)를 나타낸다. '피크 2'는 5C8var1-Y105F-Fc의 위치 108에서 관찰된 절단이다. '피크 3'은 탈 글리코실화된 단백질의 변이체에 해당한다.

[0316] 표 13 | 도 28에 도시된 전기영동도에서 발견된 다양한 종의 정량화.

		피크 1	피크 2	피크 3	주요 피크
폴 ID	분자	반향체	절단	Glyc 변이체	이량체
DGC8-T1	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-Fc	5.6	1.4	2.1	90.9
DGC8-T2	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-Fc	1.4	1.4	2.3	94.9
DGC8-T3	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-Fc	0.7	1.0	1.6	96.7
DGC8-T4	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-Fc	0.0	0.9	1.5	97.7
DGC8-T5	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc	4.4	0.0	1.5	94.1
DGC8-T6	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc	1.1	0.0	1.5	97.4
DGC8-T7	1D2-FC x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc	1.1	0.0	1.6	97.3

[0317]

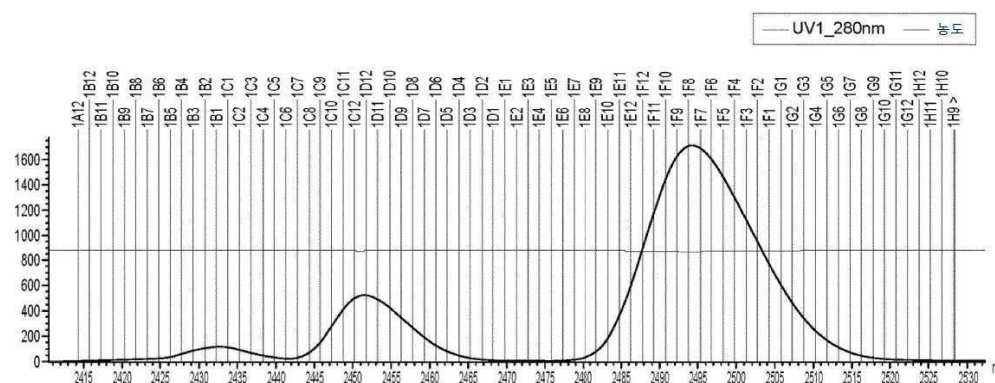
[0318] 실시예 29 | 질량 분석법(MS)에 의한 정제된 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc 단백질의 분석

[0319]

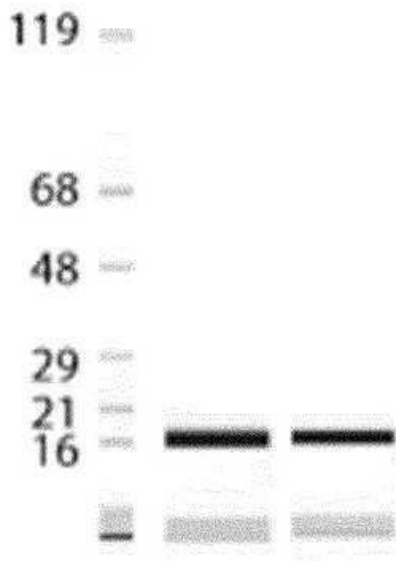
1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc의 단백질 A 정제 단백질을 MS 분석을 위해 CRO로 보냈다. 단백질들을 37℃에서 하룻밤 동안 최적화된 효소:단백질 비율로 N-글리코시다제 F(Roche)를 사용하여 N-탈글리코실화시켰다. 샘플을 0.1% 포름산(FA)에 희석하고 역상 컬럼(MabPac RP 4μm 2.1 x 50mm, Thermo Scientific)을 사용하여 UPLC 시스템(Waters Acquity Premier H-class)에서 분리되었다. 용출액은 물 중의 0.1% FA 및 아세트니트릴 중의 0.1% FA였다. 질량 분석은 Compact QTOF 질량 분석기(Bruker Daltonik)를 사용하여 수행되었다. 기록된 LC-ESI-MS 스펙트럼들을 DataAnalysis(Bruker Daltonik) 소프트웨어를 사용하여 합산, 분해 및 평활화시켰다. 주석을 위해, 완전히 산화/환원된 시스템을 가정했다(샘플 제제에 따라 다름). 1D2-Fc x 5C8var1-Y105F-R109A-Fc의 4가지 다른 배치를 분석하였다. C-말단 리신 클리핑과 관련된 어느 정도의 이질성 및 어느 정도의 글리코실화 이질성에도 불구하고 5C8var1-Y105F-R109A-Fc의 절단 생성물은 식별되지 않았는데, 이는 R109A 돌연변이가 절단 형성을 금지하였다는 것을 다시 한 번 증명하는 것이다(데이터 미제시).

도면

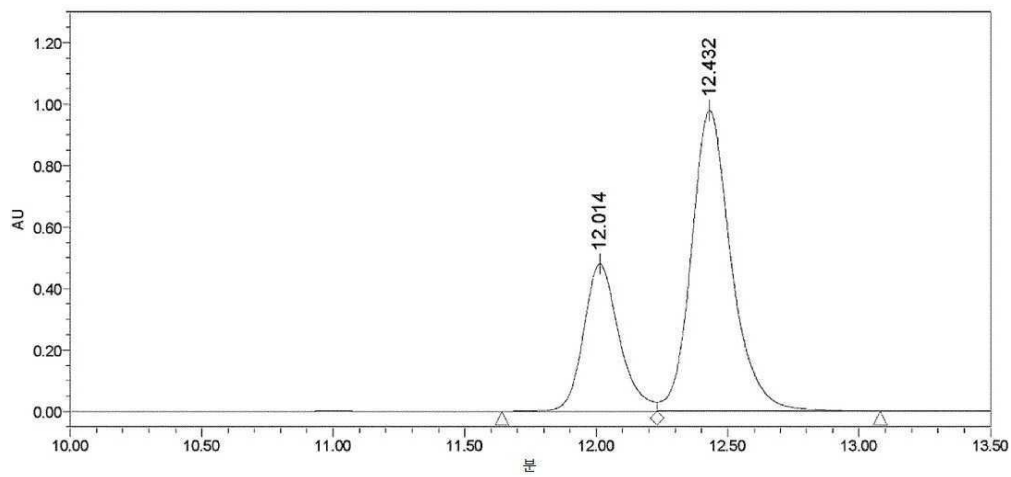
도면1



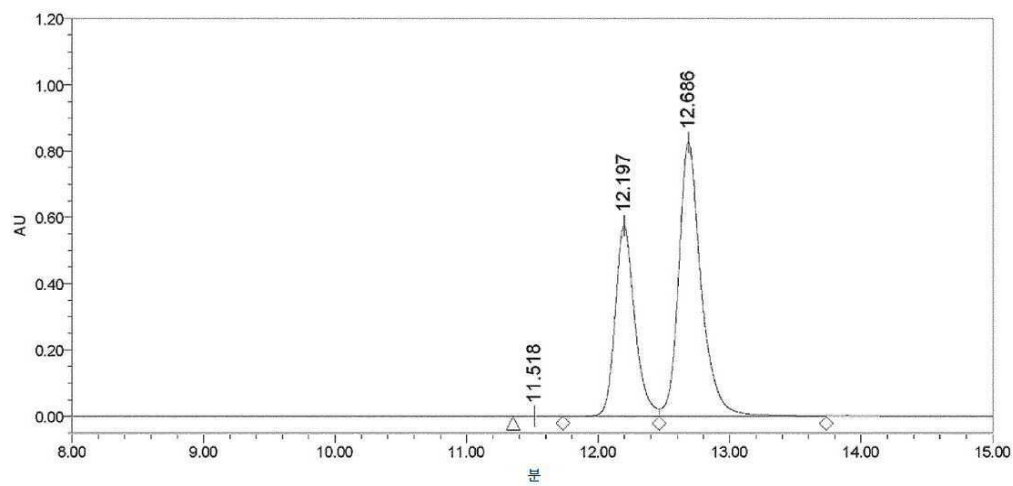
도면2



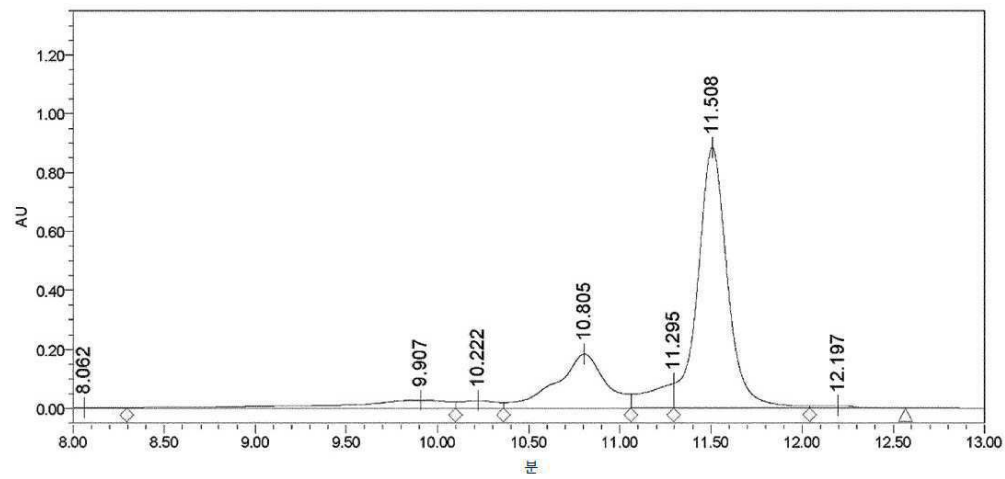
도면3a



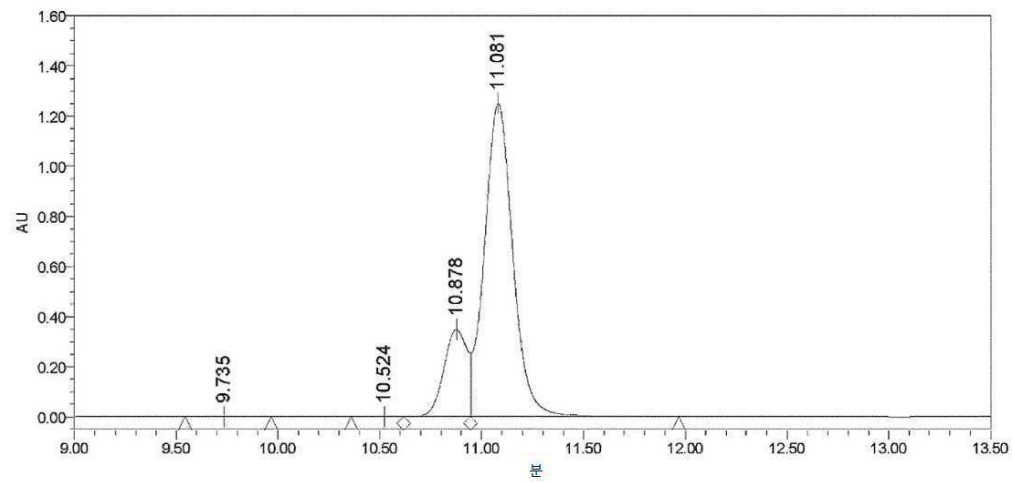
도면3b



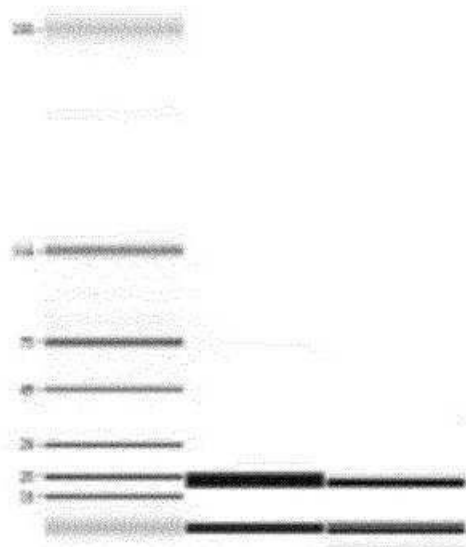
도면4a



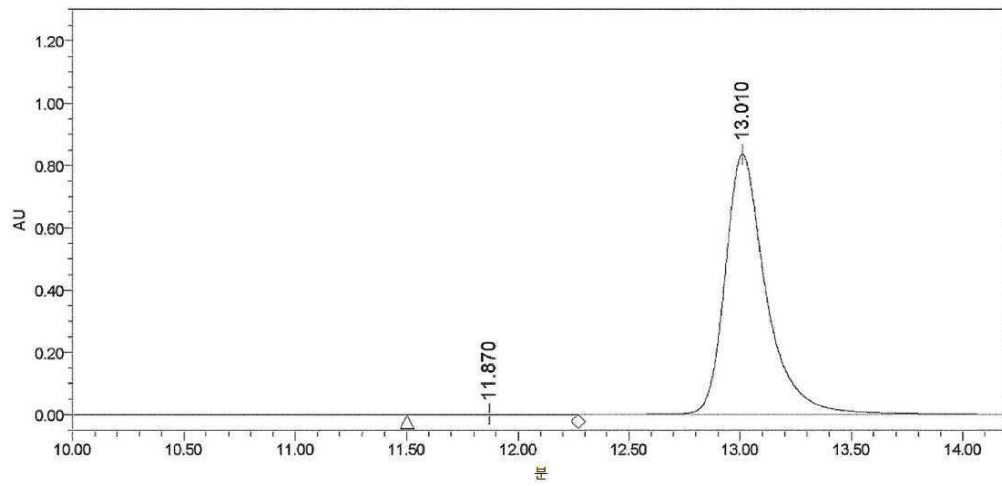
도면4b



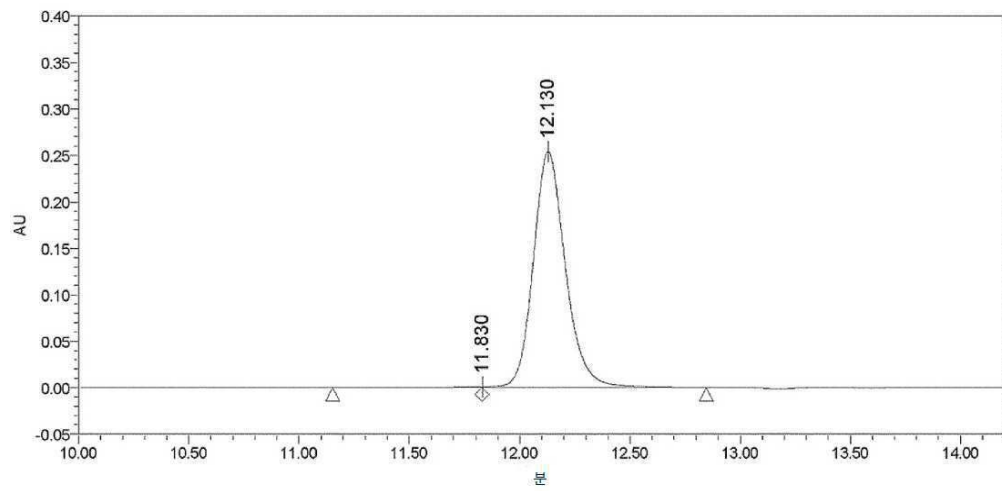
도면5



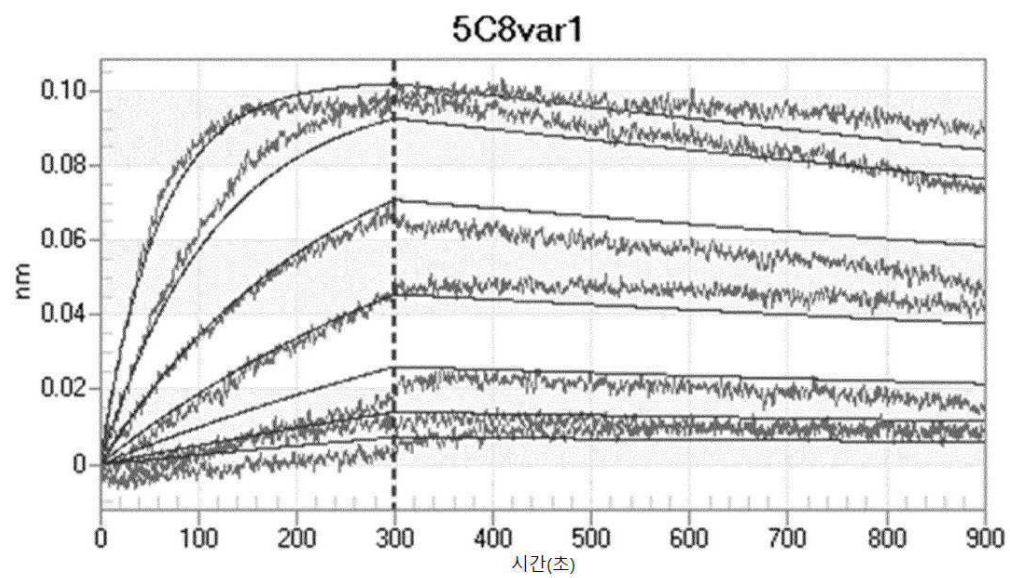
도면6a



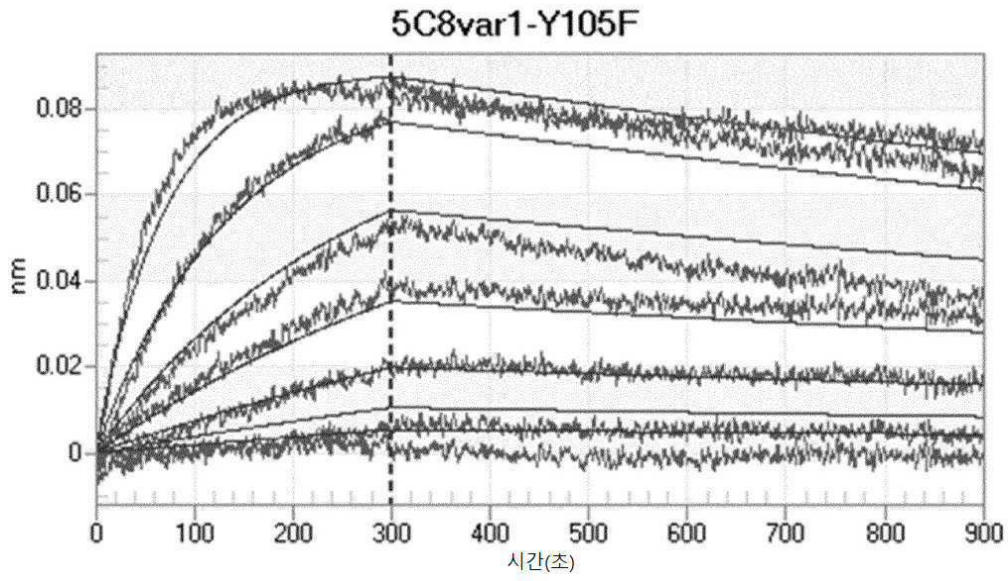
도면6b



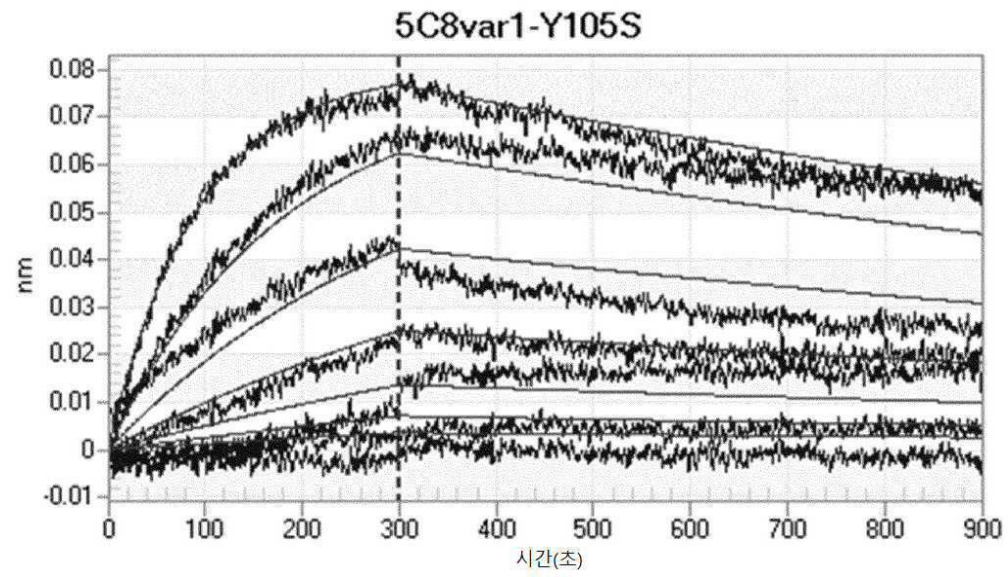
도면7a



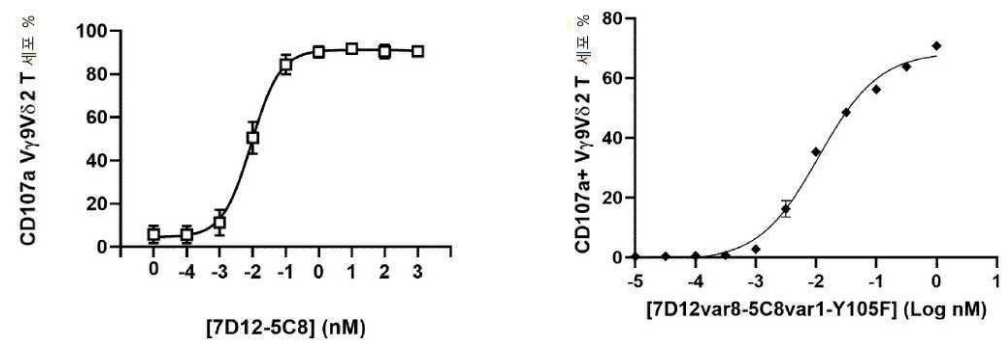
도면7b



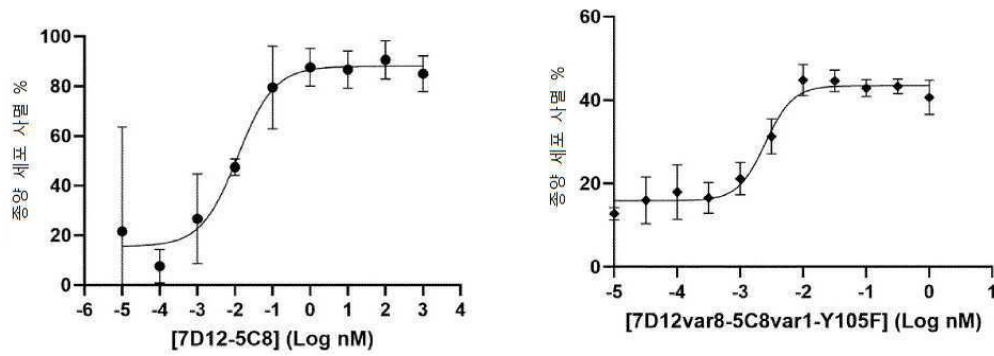
도면7c



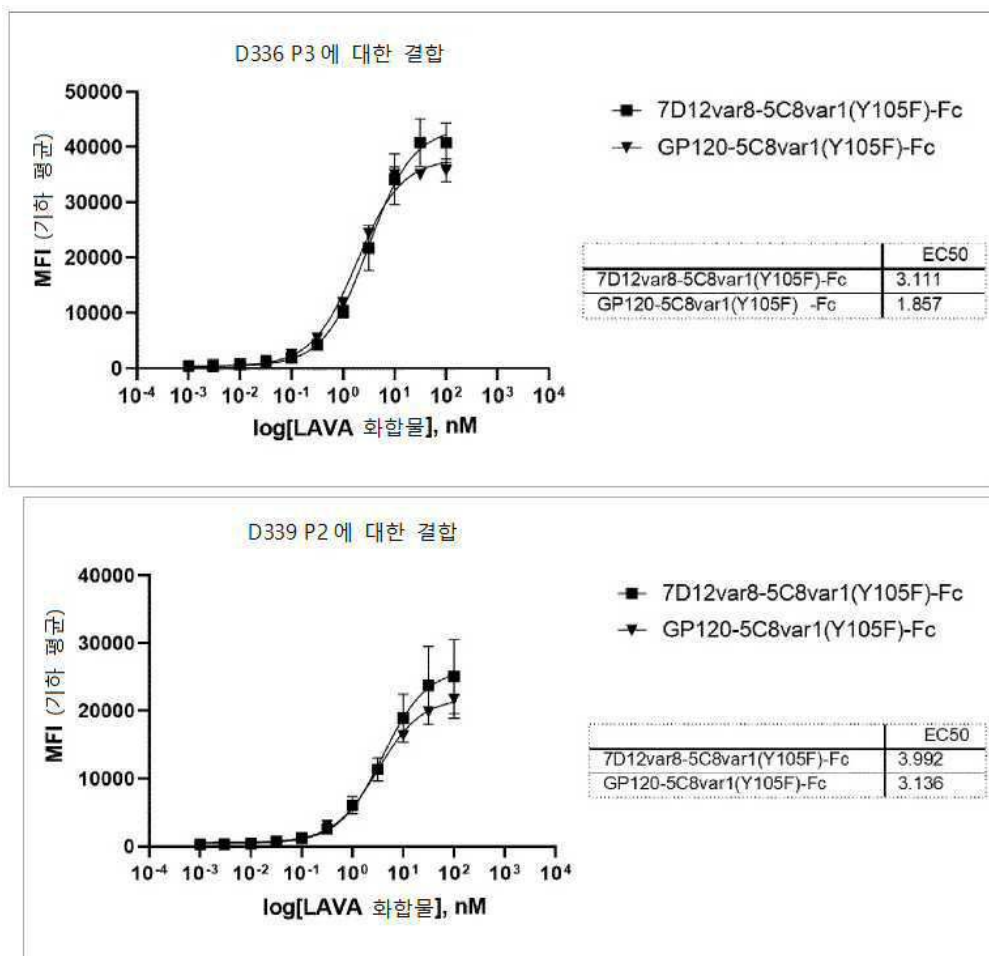
도면8a



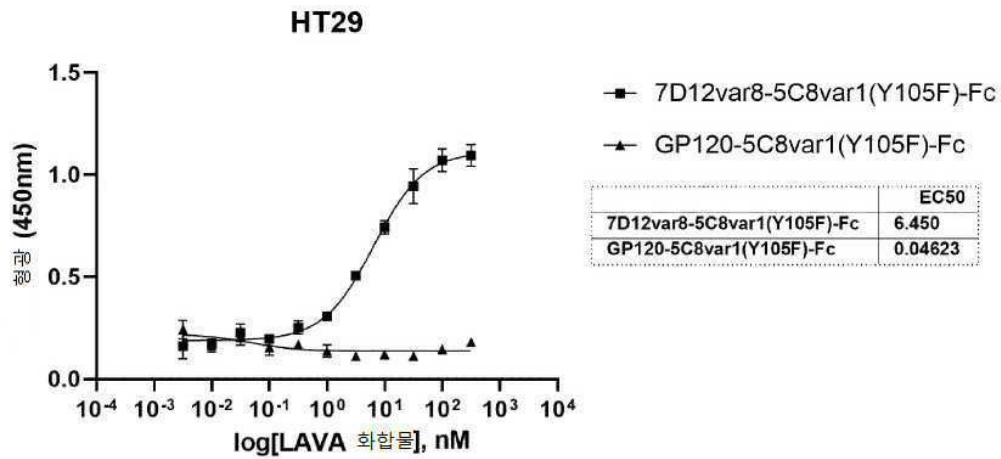
도면8b



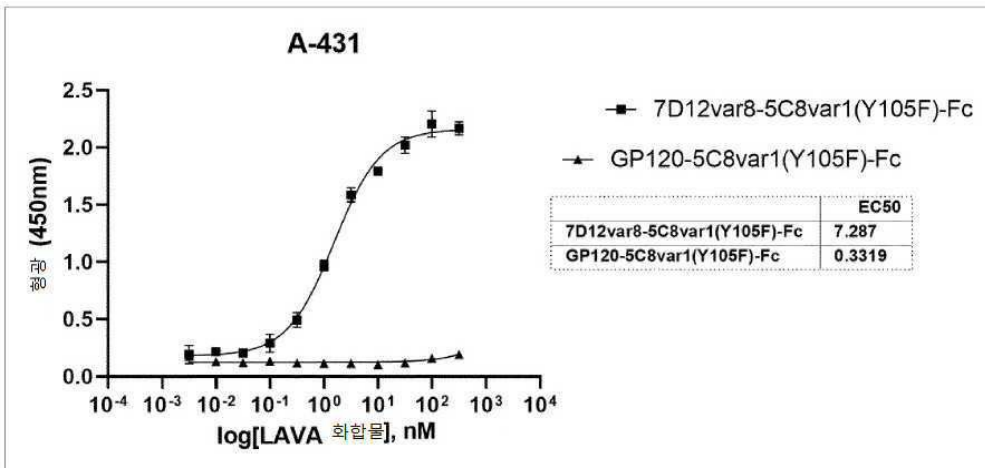
도면9



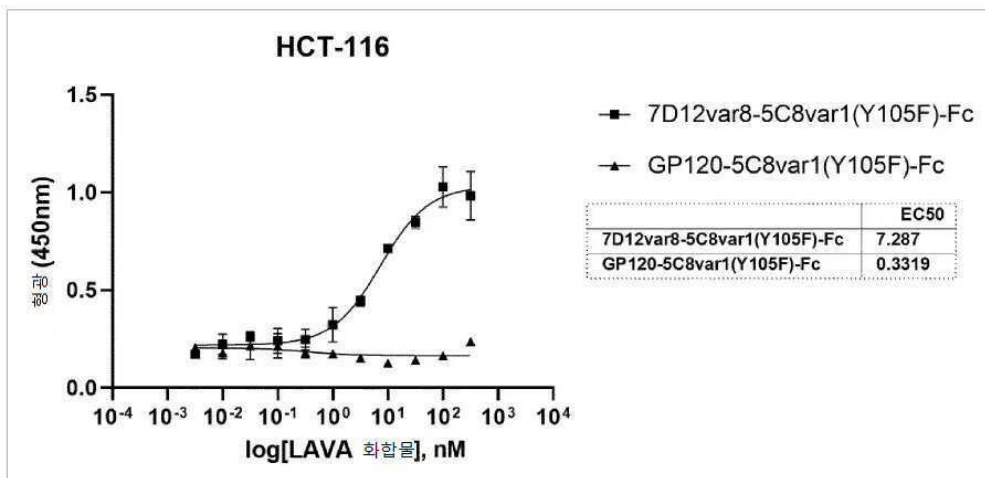
도면10a



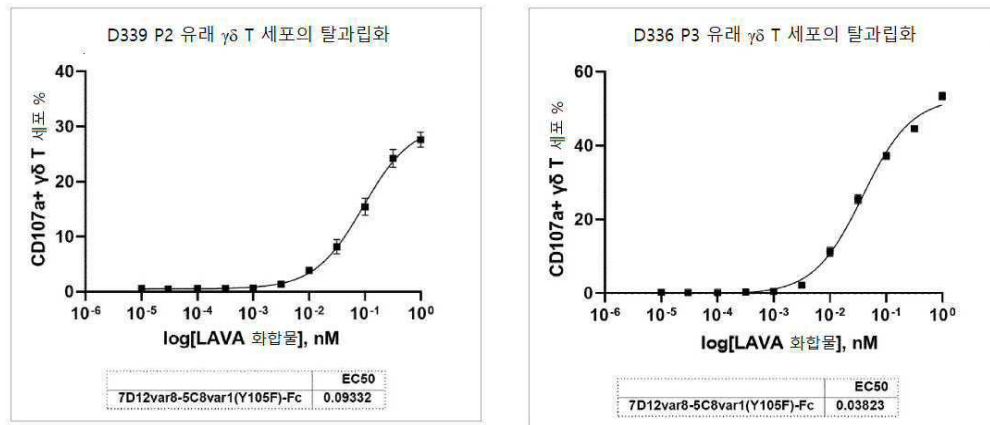
도면10b



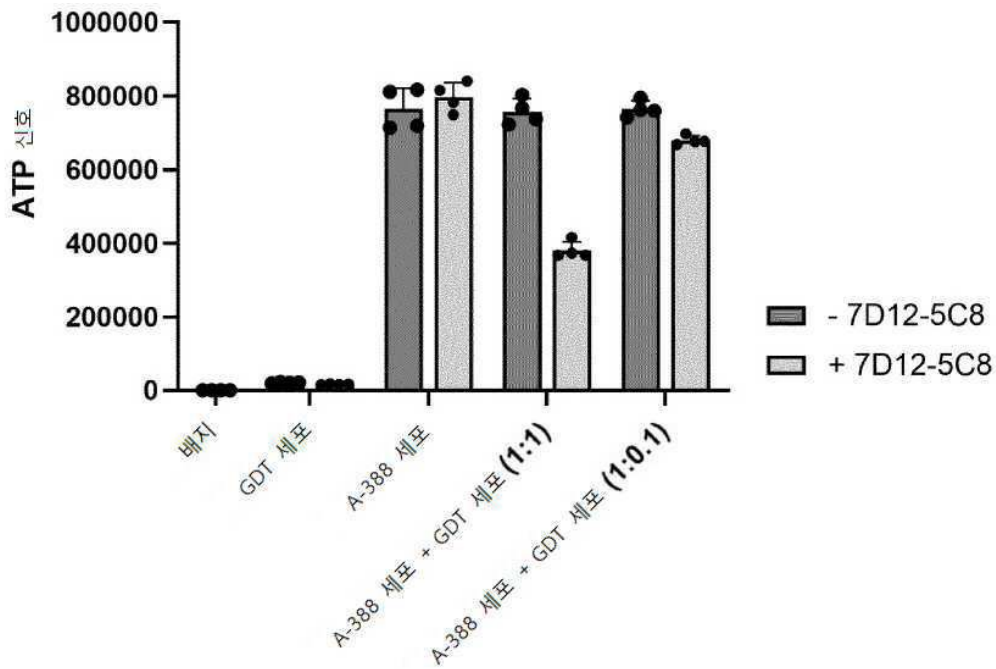
도면10c



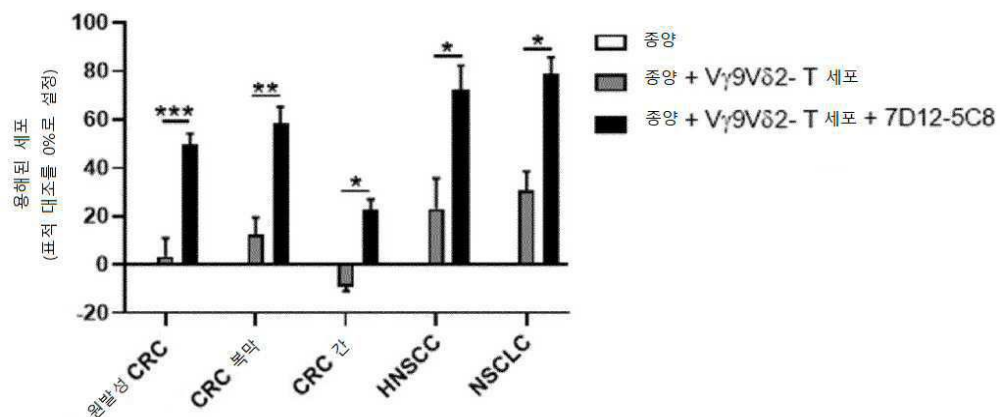
도면11



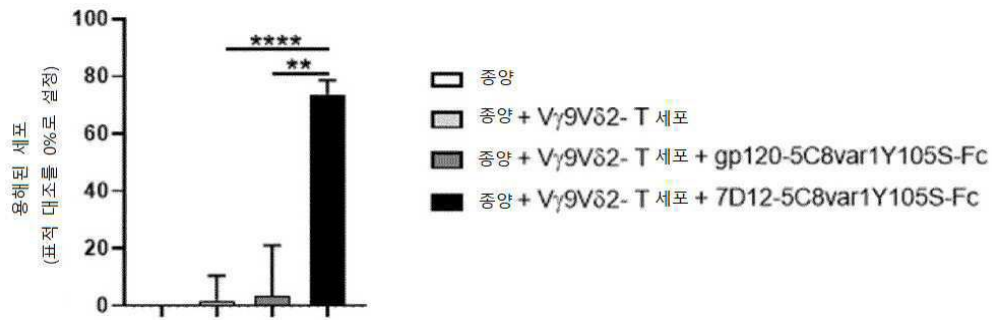
도면12



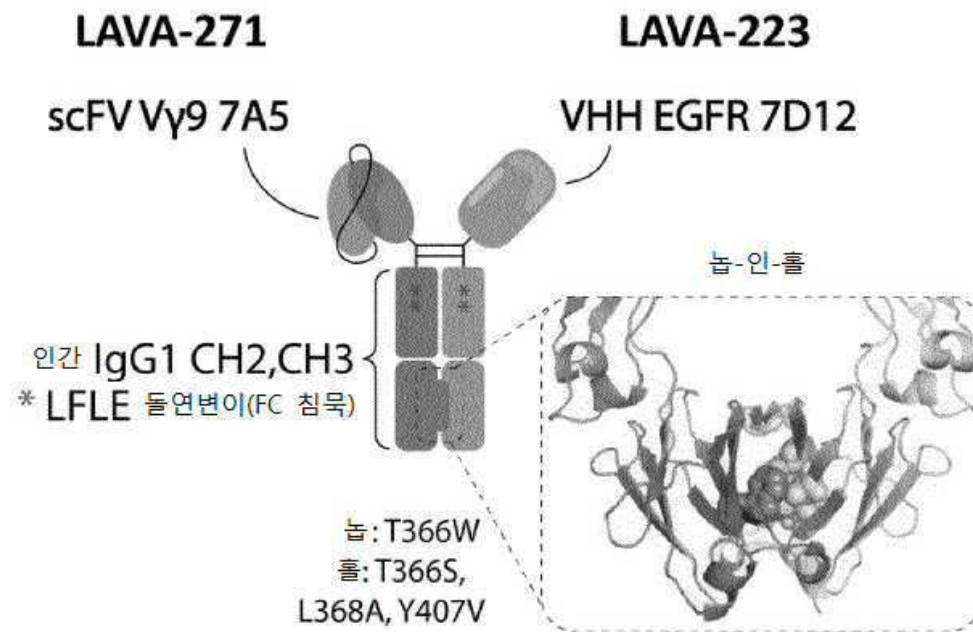
도면13



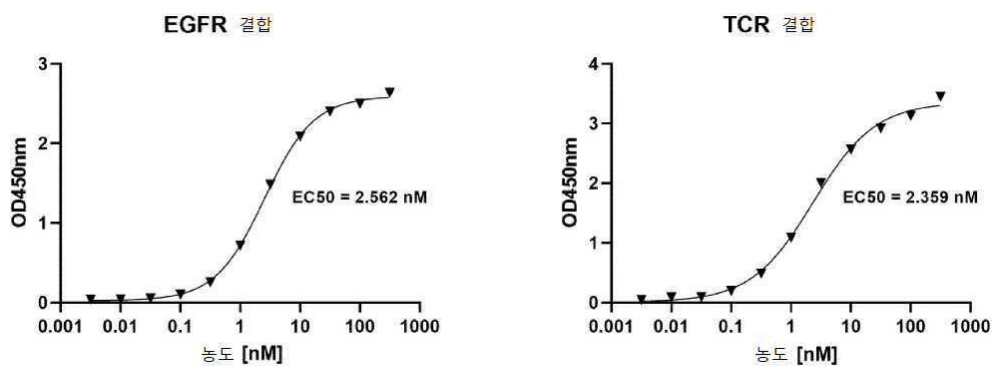
도면14



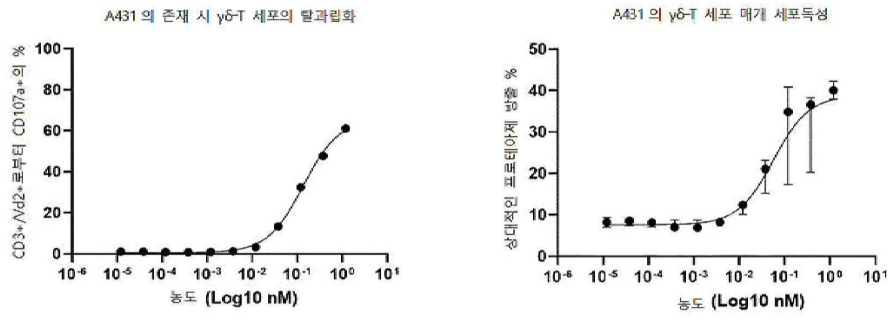
도면15



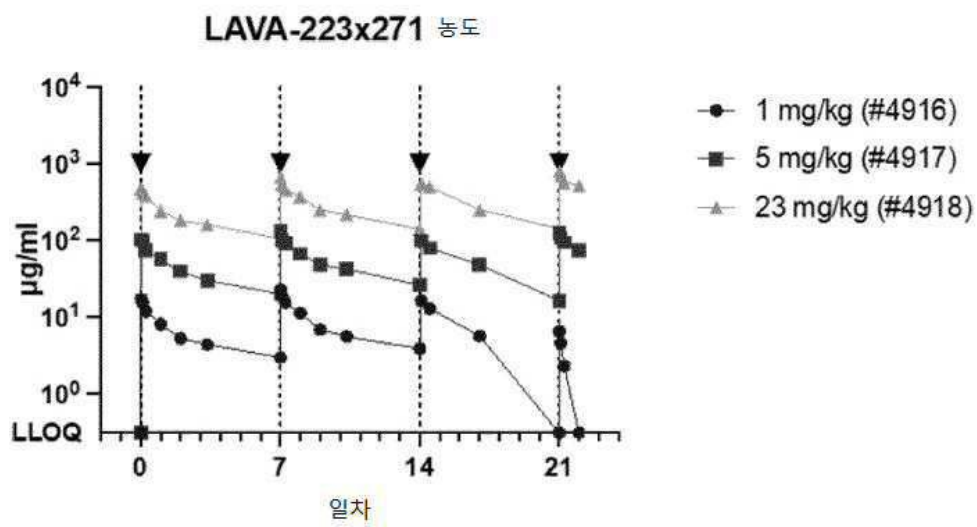
도면16



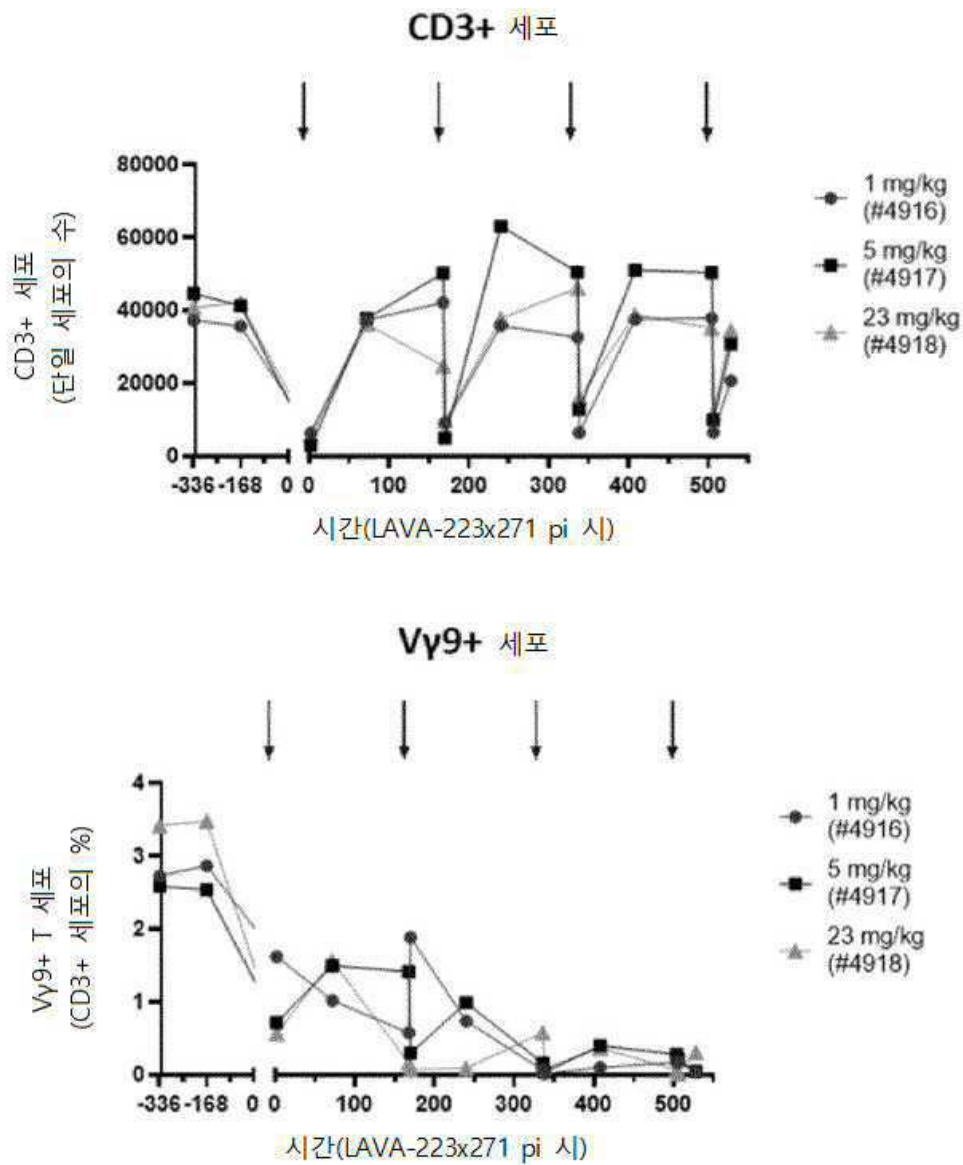
도면17



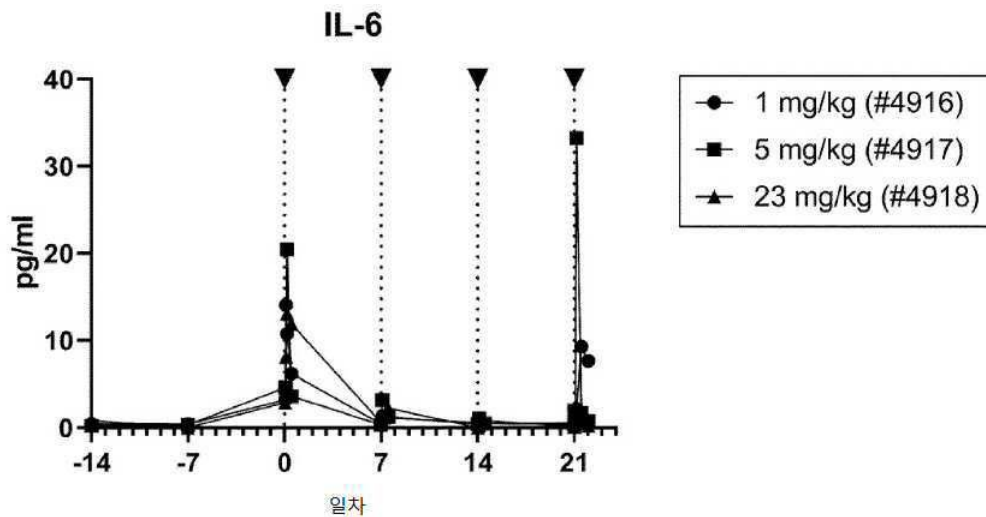
도면18



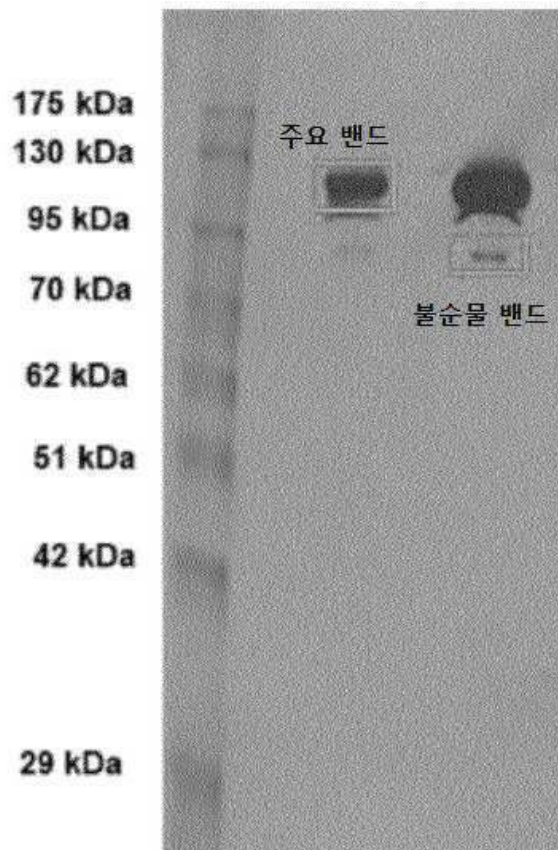
도면19



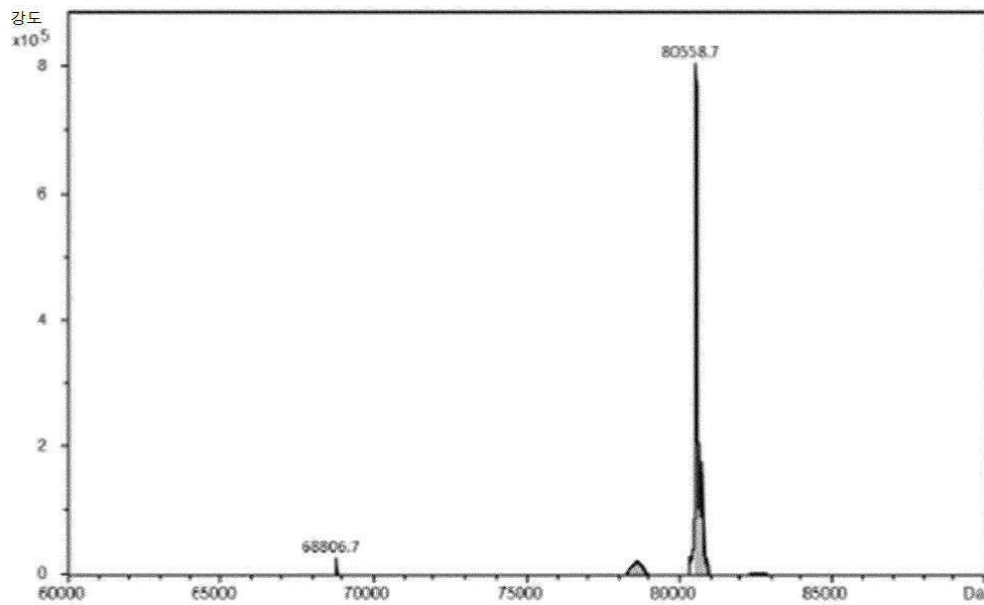
도면20



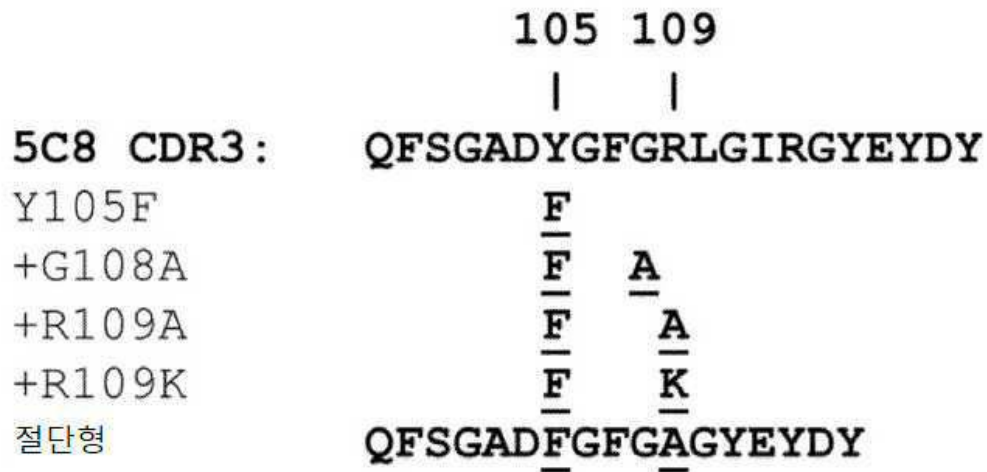
도면21



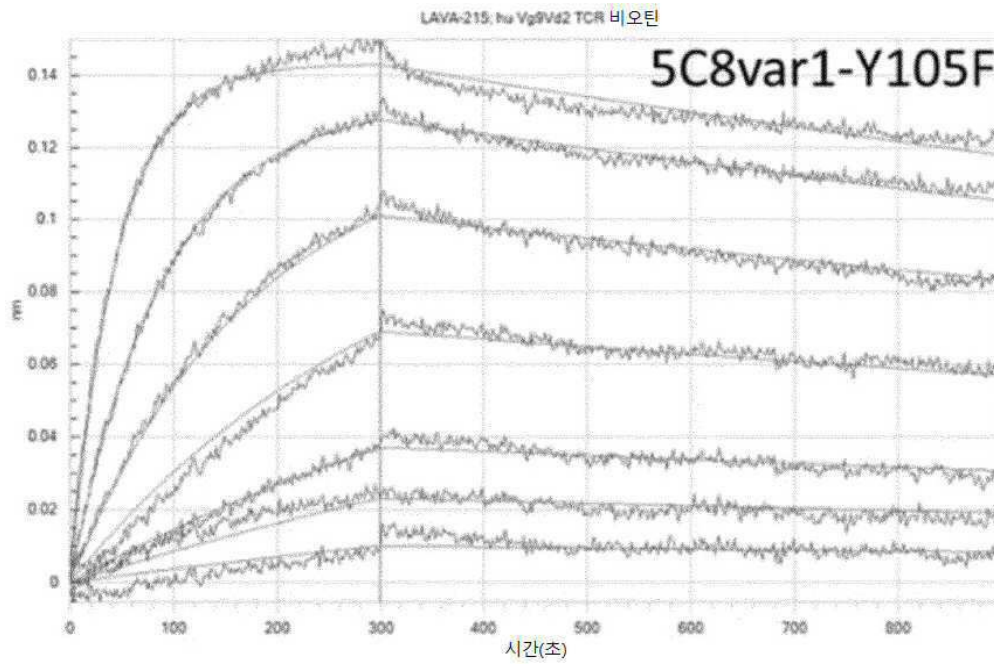
도면22



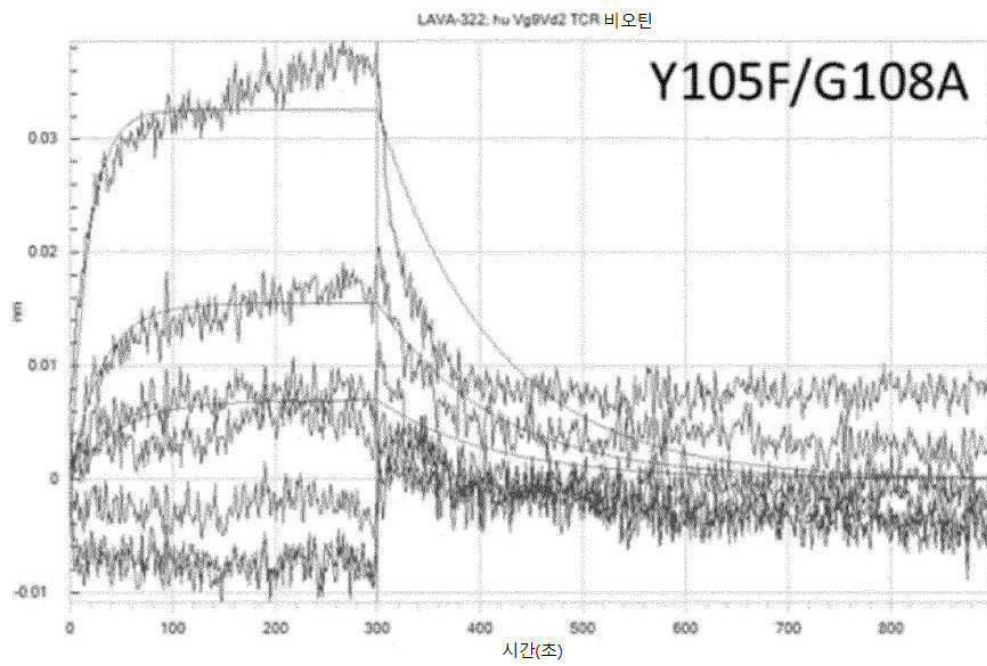
도면23



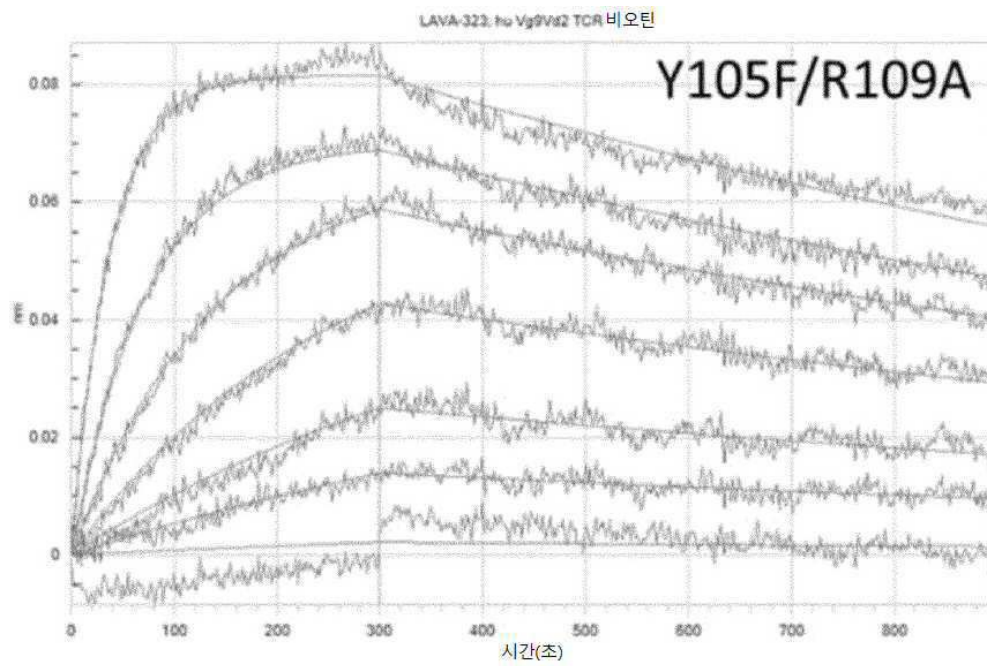
도면24a



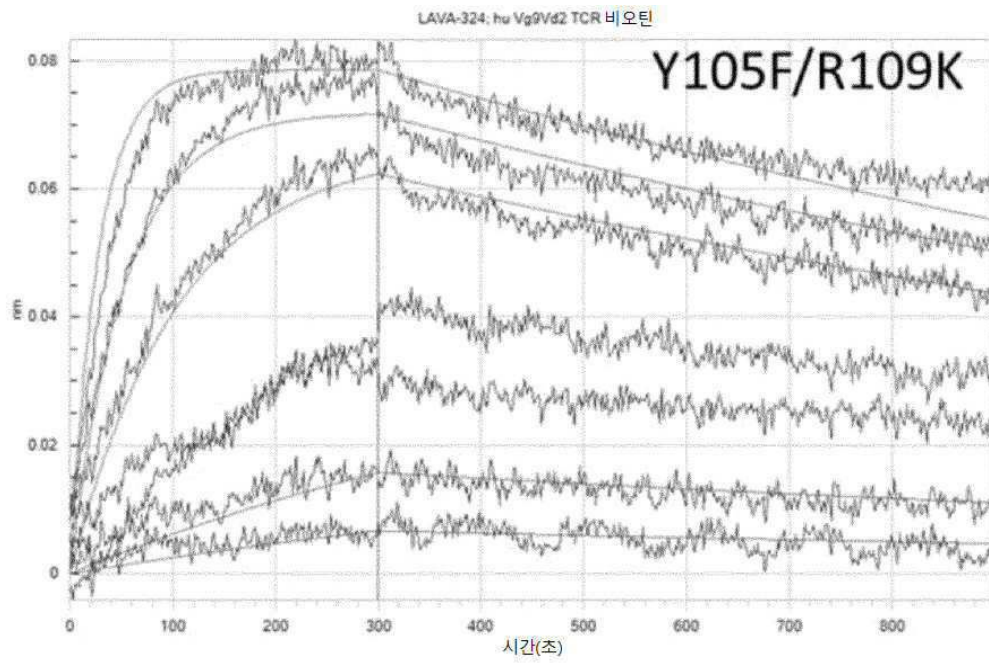
도면24b



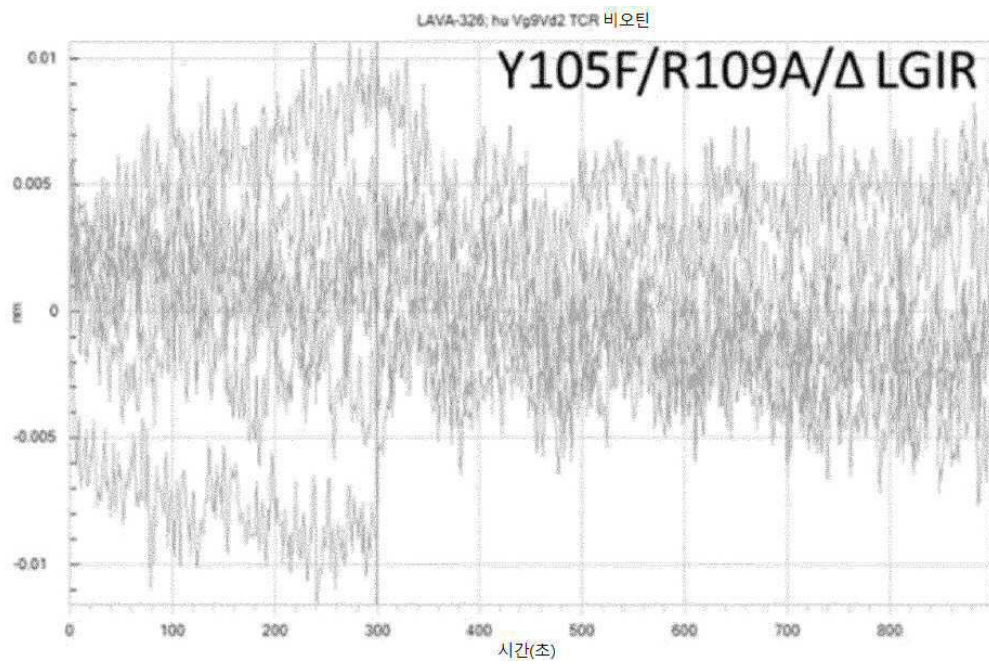
도면24c



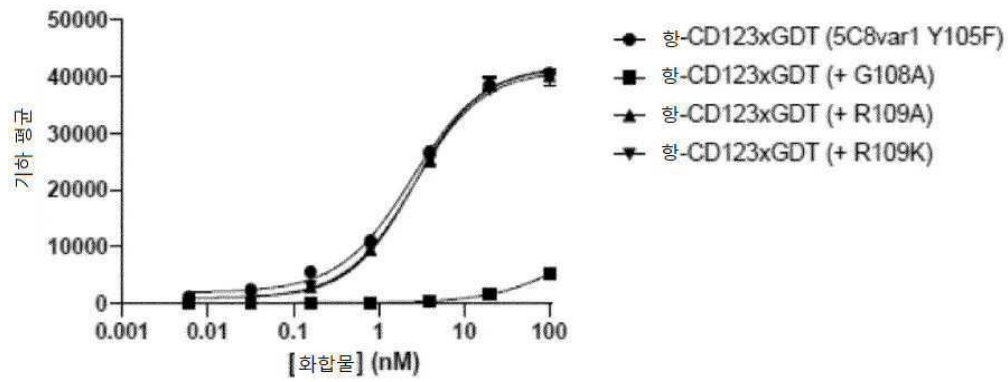
도면24d



도면24e

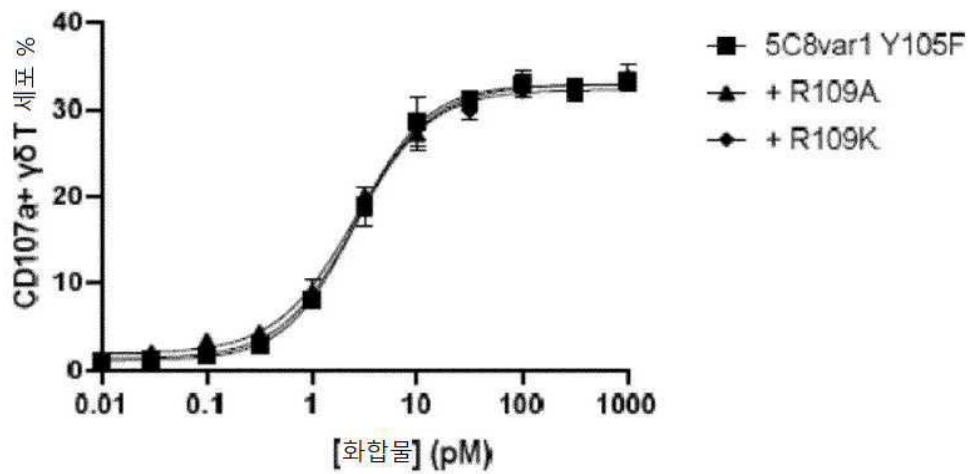


도면25



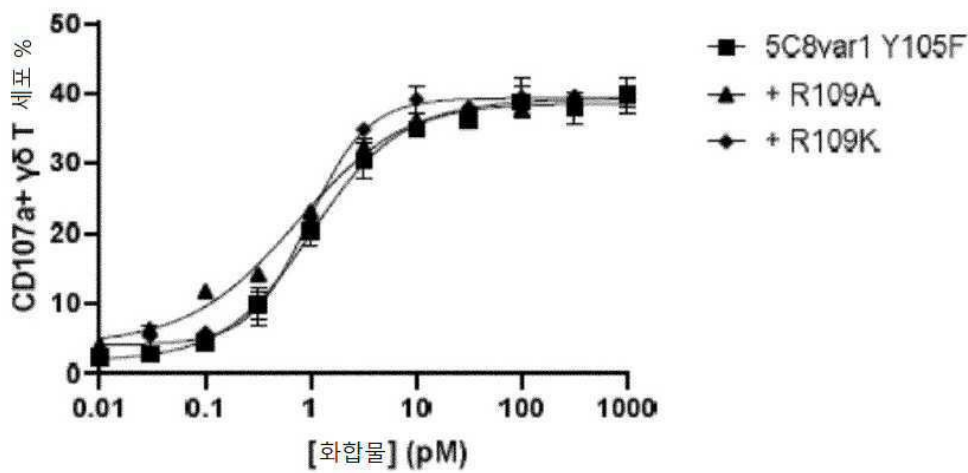
도면26a

MOLM-13

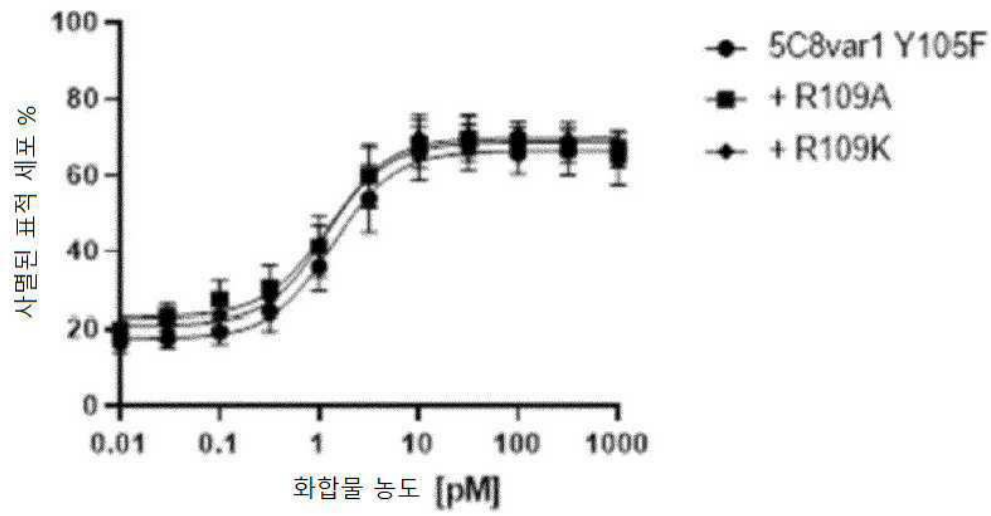


도면26b

THP-1

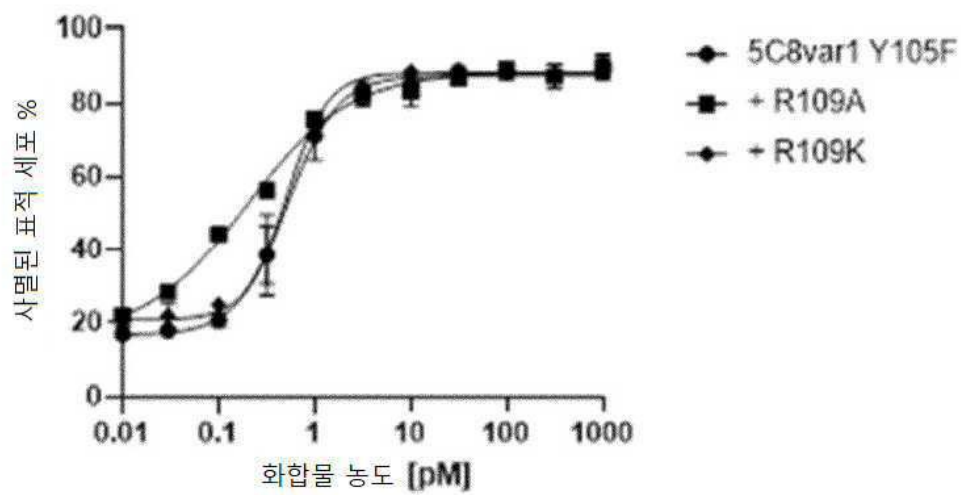


도면27a

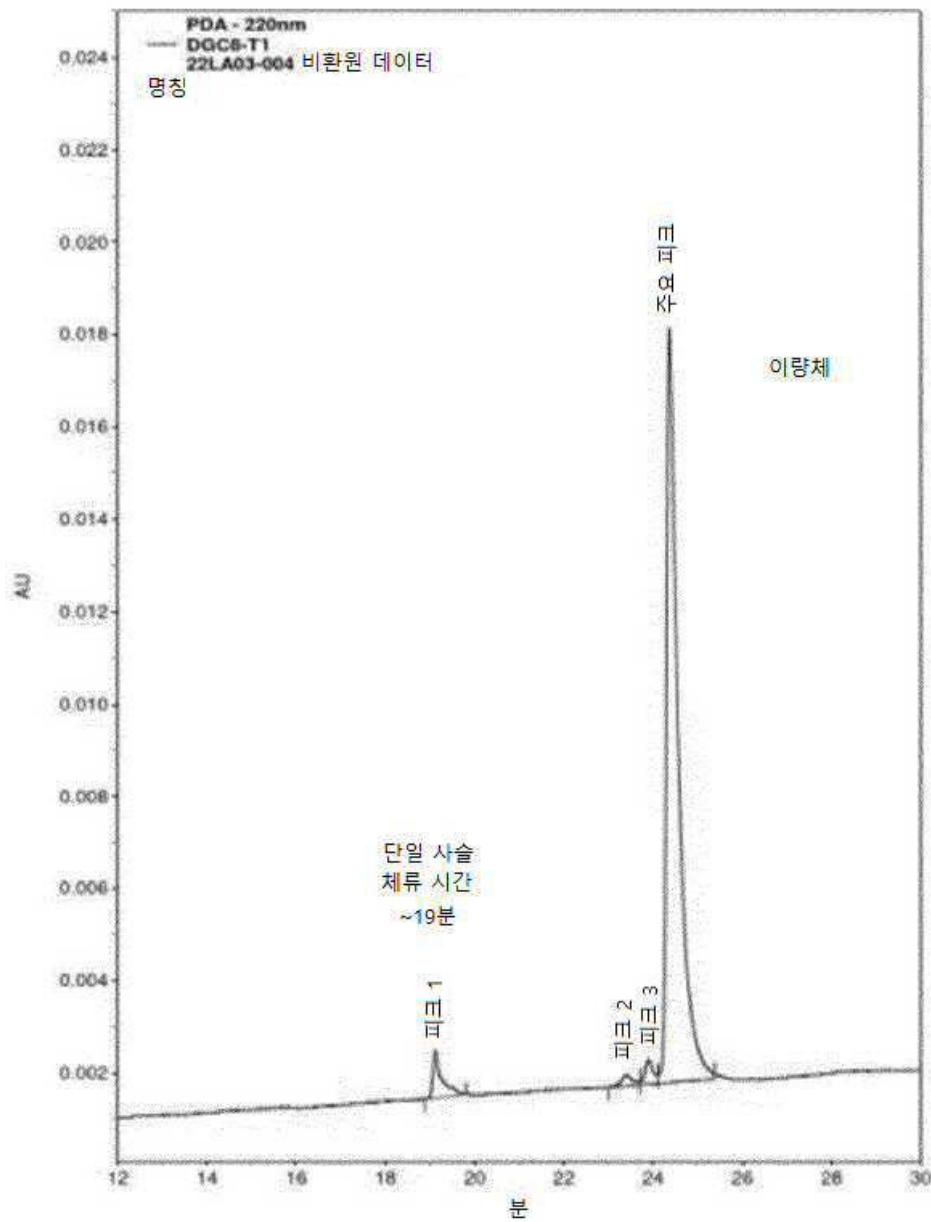


도면27b

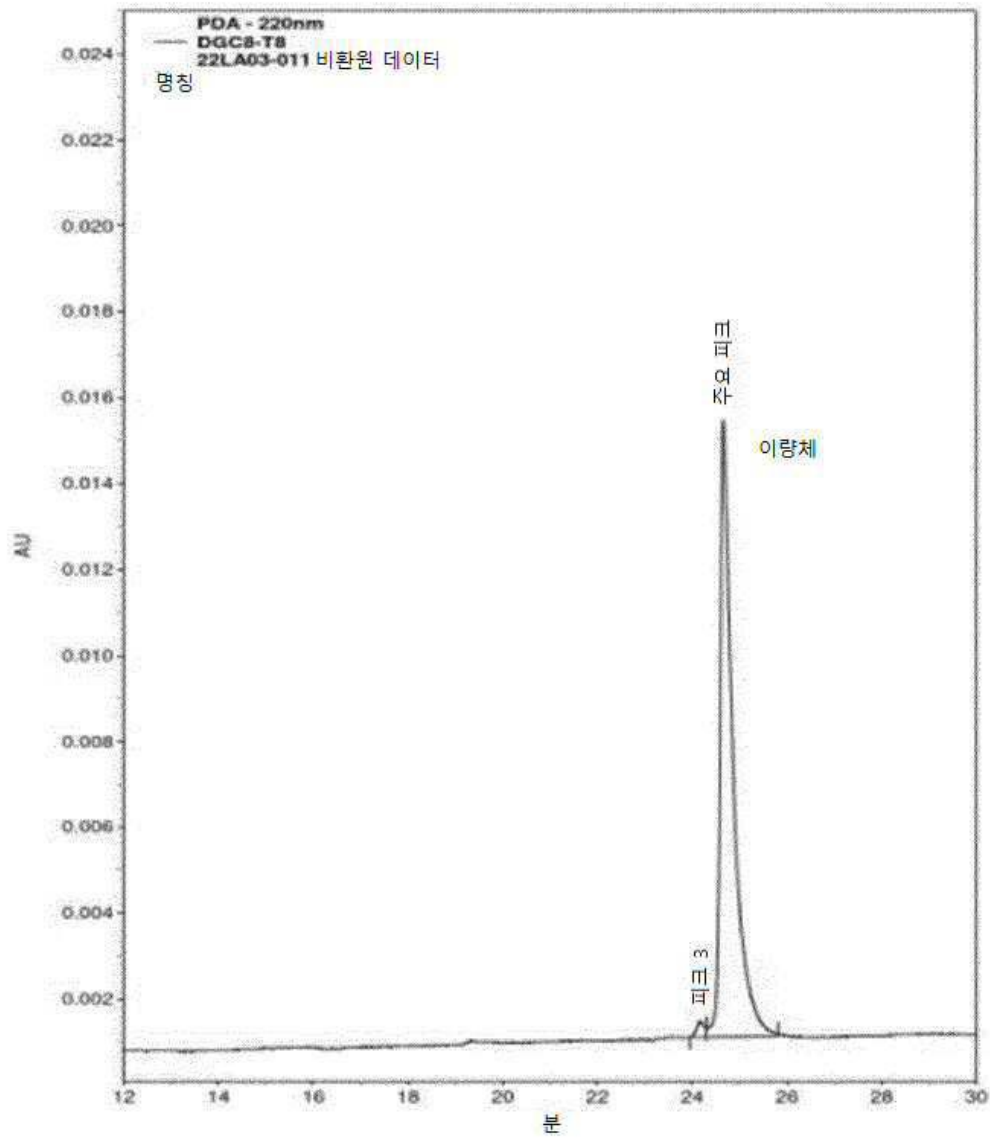
THP-1



도면28a



도면28b



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.