



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월04일
(11) 등록번호 10-2346336
(24) 등록일자 2021년12월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 45/06 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7028969
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월03일
심사청구일자 2019년10월02일
- (85) 번역문제출일자 2019년10월02일
- (65) 공개번호 10-2019-0126356
- (43) 공개일자 2019년11월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/058382
- (87) 국제공개번호 WO 2018/185043
국제공개일자 2018년10월11일
- (30) 우선권주장
17165125.0 2017년04월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
Translating Science into Survival, Vol. 4,
No. 11, Supplement, pp. B088 (2016. 11.)
Translating Science into Survival, Vol. 5,
No. 3, Supplement, pp. PR06 (2017. 3.)

- (73) 특허권자
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌차체스트라세 124
- (72) 발명자
코다리-데아크 라우라
스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게
피셔 옌스
독일 82377 쾨츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노
스틱스 게엠베하
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 45 항

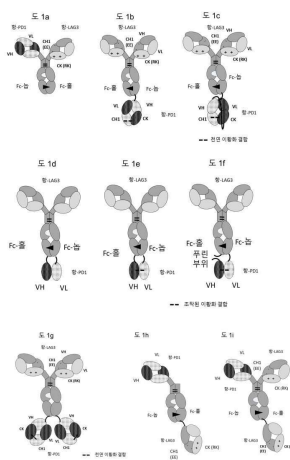
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 PD1 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체

(57) 요약

본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 분자들을 제조하는 방법 및 이들의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/3007 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)

(72) 발명자

임호프-융 자비네

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노
스틱스 게엠베하

클라인 크리스티안

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

제버 스테판

독일 82377 펜츠베르크 논넨발트 2 로슈 디아그노
스틱스 게엠베하

베버 파트릭 알렉산더 아론

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

페로 마리오

스위스 8952 솔리렌 바기스트라세 10 로슈 글리카
트 아게

명세서

청구범위

청구항 1

프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자-3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체로서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

- (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및
- (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인
- 을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인인 Fc 도메인을 포함하고, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

- (a) (i) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및
- (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- (b) (i) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및

- (i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- (c) (i) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및
- (i) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- (d) (i) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및
- (i) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- (e) (i) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 - (ii) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
 - (iii) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3
- 을 포함하는 VH 도메인, 및
- (i) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 - (ii) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 - (iii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 VL 도메인
- 을 포함하는 이종특이적 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

- (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(c) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(d) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(e) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이종특이적 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이종특이적 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

(a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(b) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(d) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(e) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이종특이적 항체.

청구항 7

제1항에 있어서,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

(a) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(b) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(c) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

(d) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이종특이적 항체.

청구항 8

제1항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인

및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 9

제1항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 10

제1항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 갖는 인간 IgG1 하위계열의 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 결합을 촉진하는 변형을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 Fc 도메인의 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 제2 아단위는 Y349C, T366S 및 Y407V(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 Fab 단편들 중 하나에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되어 상기 VH 도메인이 경쇄의 일부이고 상기 VL 도메인이 중쇄의 일부가 되는 이중특이적 항체.

청구항 16

제15항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제1 Fab 단편에서, 상기 가변 도메인 VL 및 VH가

서로 치환되는 이중특이적 항체.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 Fab 단편을 포함하고, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링) 이중특이적 항체.

청구항 18

제14항에 있어서,

LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제2 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링) 이중특이적 항체.

청구항 19

제1항에 있어서,

- (a) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- (b) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- (c) 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 104의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- (d) 서열번호 106의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 20

제1항에 있어서,

서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 21

제2항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 제2 Fab 단편을 포함하고, 상기 제2 Fab 단편은 상기 Fc 도메인의 C-말단에 융합된 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 22

제21항에 있어서,

서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 23

제2항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 제3 Fab 단편을 포함하고, 상기 제3 Fab 단편은 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 24

제14항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 상기 Fc 도메인의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.

청구항 25

제24항에 있어서,

(a) 서열번호 118의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 119의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는

(b) 서열번호 120의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는

(c) 서열번호 122의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 26

제14항에 있어서,

LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 Fab 단편들 중 하나는 펩티드 링커를 통해 상기 Fc 도메인의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.

청구항 27

제26항에 있어서,

서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 28

제23항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 제4 Fab 단편을 포함하고, 상기 제4 Fab 단편은 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 29

제28항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 상기 2개의 Fab 단편이 동일한 이중특이적 항체.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 2개의 Fab 단편을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함

하는 상기 2개의 Fab 단편 각각은 펩티드 링커를 통해 상기 Fc 도메인의 C-말단에 각각 융합되는 이중특이적 항체.

청구항 31

제30항에 있어서,

(a) 서열번호 114의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는

(b) 서열번호 116의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는

(c) 서열번호 117의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 32

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 단일쇄 Fab(scFab)를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 33

제32항에 있어서,

PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 scFab는 펩티드 링커를 통해 상기 Fc 도메인의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.

청구항 34

제33항에 있어서,

(a) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 119의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는

(b) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는

(c) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 35

제1항에 있어서,

상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 VH 및 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 36

삭제

청구항 37

제35항에 있어서,

서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 127의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및

서열번호 109의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 38

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 39

제38항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 단리된 진핵 또는 원핵 숙주 세포.

청구항 40

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 이중특이적 항체의 발현에 적합한 조건하에서 상기 이중특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 단리된 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 41

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 종양 세포의 성장의 억제에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 42

삭제

청구항 43

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 감염성 질환의 치료, 암의 치료, 암 진행의 지연, 또는 암 환자의 생존 연장에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 44

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 45

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 만성 바이러스성 감염의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 46

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하되, 상기 이중특이적 항체는 (i) 항암화학요법제, (ii) 방사선, 및 (iii) 암 면역치료에 사용하는 기타 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상과 병용 투여되는, 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제35항 및 제37항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하되, 상기 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여되는, 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로서, 구체적으로, Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 더 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 분자들을 제조하는 방법 및 이들의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암에 대항하여 방어하는 면역시스템의 중요성은 비정상 세포들을 추적하여 파괴하는 그의 능력에 기초한다. 그러나, 일부 종양 세포들은 면역억제 상태를 발생시킴으로써 면역시스템을 벗어날 수 있다(Zitvogel et al., Nature Reviews Immunology 6 (2006), 715-727). T 세포는 항바이러스 및 항종양 면역반응에서 중요한 역할을 한다. 항체-특이적 T 세포의 적절한 활성화는 결국 이들 세포의 클론 확장과 그의 효과기 기능의 획득으로 이어지며, 세포독성 T 림프구(CTL)의 경우에는 활성화로 인해 T 림프구가 표적세포를 특이적으로 용해할 수 있게 된다. 모든 세포 분획의 단백질에서 유래된 펩티드들의 선택적 인식을 가능하게 하는 T 세포의 능력; 항원-발현 세포를 직접적으로 인식하고 사멸시키는 T 세포의 능력(세포독성 T 림프구(CTL)로도 알려진 CD8⁺ 효과기 T 세포에 의함)과 다양한 면역반응들을 조절하여(CD4⁺ 헬퍼 T 세포에 의함), 순응적이고 본질적인 효과기 메커니즘을 통합하는 T 세포의 능력들 덕분에, T 세포는 내인성 항종양 면역성을 치료적인 면에서 조절하는 노력들 중에서 주요한 초점이 되어왔다. T 세포의 기능부전은 장기간의 항원 노출의 결과로서 나타난다: T 세포는 항체의 존재 시 증식 능력을 잃게 되고 점진적으로 사이토카인을 생산하지 못해 표적세포 1을 용해할 수 없게 된다. 기능장애 T 세포는 탈진 T 세포로 명명되었고 증식하지 못한 채 항원 자극에 반응하여 세포독성 및 사이토카인 분비와 같은 효과기 기능들을 발휘하지 못한다. 또 다른 연구는 탈진 T 세포가 억제 분자 PD-1(프로그램된 세포 사멸 단백질 1)의 지속적인 발현을 특징으로 한다는 것과 PD-1 및 PD-L1(PD-1 리간드) 상호작용의 차단은 T 세포 탈진을 반전시킬 수 있고 LCMV-감염 마우스에서 항원-특이적 T 세포 반응을 회복할 수 있음을 보여주었다(Barber et al., Nature 439 (2006), 682-687). 그러나, PD-1-PD-L1 경로만을 표적화하면 다른 분자들이 T 세포 탈진에 포함될 가능성이 있음을 나타내는 T 세포 탈진의 반전(Gehring et al., Gastroenterology 137 (2009), 682-690)이 항상 일어나지는 않는다(Sakuishi, J. Experimental Med. 207 (2010), 2187-2194).

[0003] 림프구 활성화 유전자-3(LAG3 또는 CD223)은 IL-2-의존성 NK 세포주에서 발현된 분자들을 선택적으로 분리하도록 설계된 실험에서 초기에 발견되었다(Triebel F et al., Cancer Lett. 235 (2006), 147-153). LAG3은 4개의 세포의 면역글로불린 상과(superfamily)-유사 도메인(D1-D4)을 갖는 CD4와 구조적인 상동성을 가진 독특한 막관통 단백질이다. 막-원위 IgG 도메인은 짧은 아미노산 서열, 소위 잉여 루프를 포함하고, 이 잉여 루프는 다른 IgG 상과 단백질에서 발견되지 않는다. 세포간 도메인은 LAG3이 T 세포 기능에 부정적인 효과를 발휘하는 데 필요한 특유의 아미노산 서열(KIEELE, 서열번호 75)을 포함한다. LAG3은 연결 펩티드(CP)에서 금속단백질분해효소에 의해 쪼개져서 혈청에서 검출가능한 가용 형태를 생성할 수 있다. CD4와 같이, LAG3 단백질은 MHC 클래스 II 분자들과 결합하지만, 더 높은 친화도를 갖고서 CD4와 구별되는 부위에서 결합한다(Huard et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 5744-5749). LAG3은 T 세포, B 세포, NK 세포 및 형질세포양 수지상 세포(pDCs)에 의해 발현되고 T 세포 활성화 후에 상향조절된다. LAG3은 T 세포 항상성뿐만 아니라 T 세포 기능을 조절한다. 비활동성이거나 제 기능을 못하는 통상적인 T 세포의 아집단은 LAG3을 발현한다. LAG3⁺ T 세포는 종양 부위에서 그리고 만성 바이러스성 감염 기간에 많아진다(Sierro et al. Expert Opin. Ther. Targets 15 (2011), 91-101). LAG3은 CD8 T 세포 탈진에 역할을 하는 것으로 나타났다(Blackburn et al. Nature Immunol. 10 (2009), 29-37). 따라서, LAG3의 활성을 중화시키며 종양에 대한 면역 반응을 발생시키고 회복하기 위해 사용될 수 있는 항체들이 필요하다.

[0004] LAG3에 대한 단클론 항체들은, 예를 들어 CD223에 특이적으로 결합하는 항체들과 항암 백신을 포함하는 조성물

이 청구되어 있는 WO 2004/078928호에 기술되어 있다. WO 2010/019570호는 LAG3에 결합하는 인간 항체, 예컨대 항체 25F7 및 26H10을 개시한다. US 2011/070238호는 장기 이식 거부 및 자가면역 질환의 치료 또는 예방에 유용한 세포독성의 항-LAG3 항체에 관한 것이다. WO 2014/008218호는 항체 25F7에 비해 최적화된 기능성(즉, 감소된 탈아미드화 부위)을 갖는 LAG3 항체들을 기술한다. 또한, LAG3 항체들은 WO 2015/138920호(예컨대 BAP050), WO 2014/140180호, WO 2015/116539호, WO 2016/028672호, WO 2016/126858호, WO 2016/200782호 및 WO 2017/015560호에 개시되어 있다.

[0005] 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1 또는 CD279)은 CD28 과(family)의 수용체들의 억제 구성원으로서, 또한 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 포함한다. PD-1은 세포 표면 수용체이고 활성화된 B 세포, T 세포, 및 골수 세포 상에서 발현된다(Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). PD-1의 구조는 단량체 1형 막관통 단백질로서, 하나의 면역글로불린 가변부위 유사 세포외 도메인 및 세포질 도메인으로 구성되고, 상기 세포질 도메인은 면역수용체 티로신계 억제 모티프(ITIM) 및 면역수용체 티로신계 스위치 모티프(ITSM)를 포함한다. 활성화된 T 세포는 PD1을 일시적으로 발현하지만, PD1 및 그의 리간드 PDL1의 지연된 발현은 면역 탈진을 촉진시켜서, 바이러스성 감염의 지속, 종양 회피, 감염 및 사망의 증가로 이어진다. PD1 발현은 T-세포 수용체를 통한 항원 인식에 의해 유도되고, 그의 발현은 연속적인 T-세포 수용체 신호전달을 통해 우선적으로 유지된다. 장기간의 항원 노출 후, PD1 유전자좌는 제메틸화되지 못하는데, 이는 지속적인 과발현을 촉진한다. PD1 경로를 차단하면, 암 및 만성 바이러스성 감염에서 탈진된 T-세포 기능성을 회복할 수 있다(Sheridan, Nature Biotechnology 30 (2012), 729-730). PD-1에 대한 단클론 항체들은, 예를 들어 WO 2003/042402호, WO 2004/004771호, WO 2004/056875호, WO 2004/072286호, WO 2004/087196호, WO 2006/121168호, WO 2006/133396호, WO 2007/005874호, WO 2008/083174호, WO 2008/156712호, WO 2009/024531호, WO 2009/014708호, WO 2009/101611호, WO 2009/114335호, WO 2009/154335호, WO 2010/027828호, WO 2010/027423호, WO 2010/029434호, WO 2010/029435호, WO 2010/036959호, WO 2010/063011호, WO 2010/089411호, WO 2011/066342호, WO 2011/110604호, WO 2011/110621호, WO 2012/145493호, WO 2013/014668호, WO 2014/179664호, 및 WO 2015/112900호에 기술되어 있다.

[0006] 암 또는 박테리아, 곰팡이 또는 바이러스와 같은 병원체 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 이중특이적 Fc 이중항체(diabody)는 WO 2015/200119에 기술되어 있다. 그러나, PD1 및 LAG3에 동시에 결합하여 PD1 및 LAG3 모두를 발현하는 세포를 선택적으로 표적화할 뿐만 아니라, LAG3의 넓은 발현 패턴을 제공받은 다른 세포들에 대한 LAG3의 차단도 회피하는 신규한 이중특이적 항체를 제공할 필요가 있다. 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1 및 LAG3 모두를 과발현하는 T 세포들 위에 PD1 및 LAG3을 단지 효과적으로 차단만 하지 않고, 이들 세포들에 대해 매우 선택적이고, 그에 의해 매우 활성이 높은 LAG3 항체를 투여함으로써 발생하는 부작용은 피할 수 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자-3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 상기 이중특이적 항체는 항-PD1 및 항-LAG3 병용 전략보다 더 좋은 선택성을 제공하고, 잠재적으로는, 더 좋은 효험을 제공하기 때문에 이로운 점이 많다. 상기 이중특이적 항체는 감소된 침전 효과를 보이고(T 세포에 의해 감소된 내재화에서 보여지는 것처럼), 조절 T 세포(Tregs)에 관해서는 통상적인 T 세포에 우선적으로 결합하여 조절 T 세포 억제로부터 T 세포 효과기 기능을 구제할 수 있으며, 종양-특이적 T 세포 효과기 기능의 증가와 생체내에서 종양 제거의 증가를 보이는 것을 또 다른 특징으로 한다.

[0008] 일 양태에서, 본 발명은, 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자-3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고,

[0009] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

[0010] (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0011] (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

[0012] (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및

[0013] (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0014] (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

- [0015] (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0016] 특히, 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자-3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중 특이적 항체는 IgG인 Fc 도메인, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0017] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0018] (a) (i) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0019] (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0020] (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0021] (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0022] (ii) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0023] (iii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0024] (b) (i) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0025] (ii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0026] (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0027] (i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0028] (ii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0029] (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0030] (c) (i) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0031] (ii) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0032] (iii) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0033] (i) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0034] (ii) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0035] (iii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0036] (d) (i) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0037] (ii) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0038] (iii) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0039] (i) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0040] (ii) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0041] (iii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0042] (e) (i) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0043] (ii) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0044] (iii) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0045] (i) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0046] (ii) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0047] (iii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

- [0048] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은
- [0049] (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0050] (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0051] (c) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0052] (d) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0053] (e) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0054] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0056] (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0057] (b) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0058] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0059] (d) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0060] (e) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0061] 추가적인 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0062] (a) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0063] (b) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0064] (c) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0065] (d) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0066] 또한, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고,
- [0067] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및

서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

- [0068] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0069] 또 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고,
- [0070] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,
- [0071] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0072] 또 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고,
- [0073] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,
- [0074] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0075] 또 다른 양태에서, 본원에서 전술한 것처럼, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 인간화 항체 또는 키메라 항체이다. 특히, 상기 이중특이적 항체는 인간화 항체이다.
- [0076] 특정 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 갖는 인간 IgG1 하위계열의 Fc 도메인을 포함한다.
- [0077] 또한, 본원에서 전술한 것처럼, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 결합을 촉진하는 변형을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 일 양태에서, 늑 인투 홀(knobs into holes) 방법에 따라서 Fc 도메인의 제1 아단위는 늑들을 포함하고 Fc 도메인의 제2 아단위는 홀들을 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다. 특히, 상기 Fc 도메인의 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.
- [0078] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편을 포함한다.
- [0079] 일 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, Fab 단편 중 하나에서 가변 도메인 VL과 VH가 서로 치환되어 VH 도메인이 경쇄의 일부이고 VL 도메인이 중쇄의 일부가 되는 이중특이적 항체가 제공된다. 특히, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편에서 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되는 이중특이적 항체가 제공된다.
- [0080] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fab 단편을 포함하고, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 특히, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제2 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스

티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링) 이중특이적 항체가 제공된다.

- [0081] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,
- [0082] (a) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0083] 서열번호 97의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0084] (b) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0085] 서열번호 100의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0086] (c) 서열번호 102의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 104의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0087] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0088] (d) 서열번호 106의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 107의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0089] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다.
- [0090] 보다 구체적으로, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 100의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.
- [0091] 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 C-말단에 융합된 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 단편을 포함한다.
- [0092] 특히, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 144의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.
- [0093] 또 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제3 Fab 단편을 포함한다. 일 양태에서 이중특이적 항체가 제공되는데, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하고 있는 2개의 Fab 단편들은 동일하다.
- [0094] 다른 양태에서, 본원에서 전술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다.

- [0095] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,
- [0096] (a) 서열번호 118의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0097] 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0098] (b) 서열번호 120의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0099] 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0100] (c) 서열번호 122의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0101] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다.
- [0102] 다른 양태에서, 본원에서 진술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 단편들 중 하나는 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다.
- [0103] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 145의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0104] 또 다른 양태에서, 본원에서 진술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제4 Fab 단편을 포함한다. 일 양태에서 이중특이적 항체가 제공되는데, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하고 있는 2개의 Fab 단편들은 동일하다.
- [0105] 다른 양태에서, 본원에서 진술한 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 각각은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 각각 융합된다.
- [0106] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,
- [0107] (a) 서열번호 114의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0108] (b) 서열번호 116의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0109] (c) 서열번호 117의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함하는 이

중특이적 항체가 제공된다.

- [0110] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 단일쇄 Fab(scFab)을 포함한다. 특히, 상기 scFab는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하고 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다.
- [0111] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고,
- [0112] (a) 서열번호 123의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0113] (b) 서열번호 124의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0114] (c) 서열번호 125의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다.
- [0115] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되는데, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 VH와 VL 도메인을 포함한다. 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VH 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합되고, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VL 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 다른 하나의 C-말단에 융합된다. 특정 양태에서, 서열번호 126의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄와, 서열번호 127의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 109의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다.
- [0116] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본원에 진술한 것처럼 상기 이중특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본 발명은 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터 및 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포, 특히 포유류 세포이다.
- [0117] 다른 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 생산하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 a) 상기 이중특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 숙주를 변형시키는 단계, b) 상기 이중특이적 항체의 발현에 적합한 조건하에서 상응하는 상기 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 c) 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생산된 이중특이적 항체도 포함한다.
- [0118] 본 발명은 추가적으로, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 제공한다.
- [0119] 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 약제로서 사용하기 위해 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물 또한 본 발명에 포함된다.
- [0120] 다른 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이, 본 발명은 하기 용도로서 사용하기 위한, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체,

또는 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0121]

i) T 세포 활성의 회복과 같은 면역 반응의 조절,

[0122]

ii) 면역 반응 또는 기능의 자극,

[0123]

iii) 감염의 치료,

[0124]

iv) 암의 치료,

[0125]

v) 암 진행의 지연,

[0126]

vi) 암 환자의 생존 연장.

[0127]

일 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 치료를 필요로 하는 개체에서 질병의 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 추가적인 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 면역반응의 조절에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 만성 바이러스성 감염의 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0128]

본 발명은 또한 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 이중특이적 항체는 항암화학요법제, 방사선 및/또는 암 면역치료에 사용하는 기타 제제와 병용 투여된다. 특정 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여된다.

[0129]

또한, 치료를 필요로 하는 개체에서 질병의 치료를 위한 약제의 제조, 특히, 암의 치료를 위한 약제의 제조를 위해, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체의 용도 및 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 치료 유효량의 조성물을 약제학적으로 허용되는 형태로 상기 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 특정 양태에서, 상기 질병은 암이다. 다른 특정 양태에서, 상기 질병은 만성 바이러스성 감염이다. 다른 양태에서, 개체에서 면역반응의 조절 방법이 제공되고, 이 방법은, 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 치료 유효량의 조성물을 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 양태들 중 하나에서, 상기 개체는 바람직하게는 포유류, 특히 인간이다.

[0130]

본 발명은 또한, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 이중특이적 항체는 항암화학요법제, 방사선 및/또는 암 면역치료에 사용하는 기타 제제와 병용 투여된다.

[0131]

추가적으로, 개체에서 종양세포의 성장을 저해하기 위한 방법이 제공되는데, 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 치료 유효량의 이중특이적 항체를 상기 개체에 투여하는 것을 포함한다. 상기 개체는 바람직하게는 포유류, 특히 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0132]

도 1: 본원에 기술된 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 다른 포맷의 모식도. **도 1a**는 이중특이적 1+1 포맷을 보여주며, PD1 결합 도메인은 (VH/VL 도메인 교환이 있는) 교차Fab를 포함하고 LAG3 결합 도메인은 정확한 페어

링("하전된 변이체")을 지원하기 위해 아미노산 돌연변이가 있는 CH1 및 CK 도메인을 포함한다. Fc 부분은 흡인투 홀 돌연변이(검은 화살표로 도시됨)와 인간 IgG1 Fc 도메인(흰색 영역으로 도시됨)에 결합하는 Fc γ 를 거의 완벽하게 무효화하는 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함한다. **도 1b**는 CH1/CK에서의 돌연변이를 포함하는 2개의 항-LAG3 결합 Fab 도메인과 하나의 중쇄의 C-말단에서 융합된 PD1 결합 Fab 도메인이 있는 2+1 포맷을 보여준다. **도 1c**는 CH1/CK에서의 돌연변이를 포함하는 2개의 항-LAG3 결합 Fab 도메인과, 반면에 하나의 중쇄의 C-말단에서 융합된 PD1 결합 단일쇄 scFab 도메인이 있는 유사한 2+1 포맷을 보여준다. **도 1d**에는 2개의 항-LAG3 결합 Fab 도메인 및 상기 중쇄들의 C-말단 중 한 곳에 각각 융합된 PD1 결합 VH 및 VL이 있는 2+1 포맷이 도시되어 있다. **도 1e**는 도 1d의 내용과 유사한 작제물을 보여주지만, VH와 VL 사이에 조작된 이황화 결합이 있고 도 1f에서는 퓨린 부위가 있는 변이체가 도시되어 있다. **도 1g**는 CH1/CK에서의 돌연변이를 포함하는 2개의 항-LAG3 결합 Fab 도메인과 중쇄 각각의 C-말단에서 융합된 2개의 PD1 결합 Fab 도메인이 있는 2+2 포맷을 보여준다. **도 1h**에서 PD1 결합 도메인은 (VH/VL 도메인 교환이 있는) 교차Fab를 포함하고 LAG3 결합 도메인은 Fc 홀 사슬의 C-말단에서 상기 도메인의 VH 도메인과 융합되는 이중특이적 1+1 포맷이 도시되어 있다. LAG3 결합 도메인은 정확한 페어링("하전된 변이체")을 지원하기 위해 아미노산 돌연변이가 있는 CH1 및 CK 도메인을 포함한다. **도 1i**는 PD1 결합 도메인이 (VH/VL 도메인 교환이 있는) 교차Fab를 포함하고, 정확한 페어링("하전된 변이체")을 지원하기 위해 아미노산 돌연변이가 있는 CH1 및 CK 도메인을 포함하는 하나의 LAG3 결합 도메인과 제2 LAG3 결합 도메인이 Fc 홀 사슬의 C-말단에서 그 VH 도메인과 융합되는 2+1 트랜스 포맷을 보여준다.

도 2: 동종이계 성숙 수지상세포와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출과 IL-2 분비에 대한 aLAG-3 항체의 효과. **도 2a**에서는, 본원에서 기술한 것처럼, 그랜자임 B 분비에 대한 aLAG-3 항체의 효과가 도시되어 있고, **도 2b**에서는 IL-2 분비에 대한 aLAG-3 항체의 효과가 도시되어 있다.

도 3: B 세포-림프아세포양 세포주(ARH77)와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출에 대한 aPD1 항체(0376)와의 병용시 aLAG-3 항체의 효과. aPD1 항체(0376)와 병용할 때와 aPD1 항체(0376) 단독 사용시의 상이한 aLAG-3 항체의 비교를 보여준다.

도 4: 방사능 처리된 동종이계의 PBMC와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B와 IFN- γ 방출의 Treg 억제에 대한 aPD1 항체(0376)와의 병용시 aLAG-3 항체의 효과. **도 4a**는 aPD1 항체(0376) 단독일 때와 비교로서 그랜자임 B 방출을 보여주고 **도 4b**는 aPD1 항체(0376) 단독일 때와 비교로서 IFN- γ 방출을 보여준다.

도 5: 재조합 PD1⁺Lag3⁺ 세포에 대한 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 결합에 의해 발생한 동시 결합과 수용체 이량체화. 항체 농도에 대한 화학발광(RU로 측정됨)이 플롯되었다. **도 5a**와 **도 5b**는 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체와 단일특이적 항-LAG3의 비교를 보여준다. 상기 이중특이적 포맷만이 화학발광을 유도할 수 있었다. **도 5c**에는 경쟁 실험이 도시되어 있다. 동일한 이중특이적 항체가 aLAG3 항체(0156, MDX25F7) 또는 항-PD1 항체(0376) 중 한 가지가 있을 때 제공된 경우, 신호는 거의 저해되었거나(PD1 경쟁) 또는 적어도 유의하게 감소되었다(Lag3). 또 다른 경쟁 실험이 **도 5d**에 도시되어 있다. 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체와 동일한 항-PD1 항체(0376)와의 경쟁, 및 재조합 LAG3:Fc 단백질(0160)과의 경쟁은 신호를 거의 없앴고, 반면 동일한 aLAG3 바인더(0156)의 존재만이 유일하게 부분적 억제를 일으켰으며, 또 다른 2개의 항-LAG3 항체 0414 및 0416은 신호를 유의하게 조절하지 않았다.

도 6: 상이한 포맷(1+1 대 2+1)으로 그리고 상이한 aLAG3 바인더가 있는 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 동시 결합의 비교. **도 6a**는 작제물 0799에 대한 결합 곡선(1+1 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))을 보여준다. **도 6b**에서는 작제물 8311에 대한 결합 곡선(1+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))이 도시되어 있다. **도 6c**는 작제물 0927에 대한 결합 곡선(1+1 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))을 보여준다. **도 6d**는 작제물 8310에 대한 결합 곡선(1+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))을 보여준다.

도 7: 상이한 포맷(2+1 대 2+1)으로 그리고 상이한 aLAG3 바인더가 있는 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 동시 결합의 비교. **도 7a**는 작제물 8310에 대한 결합 곡선(1+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0414))을 보여준다. **도 7b**는 작제물 8970에 대한 결합 곡선(2+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))을 보여준다. **도 7c**는 작제물 8311에 대한 결합 곡선(1+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))을 보여준다. **도 7d**에는 작제물 8984에 대한 결합 곡선(2+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))이 도시되어 있다. **도 7e**에는 작제물 0927(트랜스 1+1 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))의 결합 곡선과 비교하여 작제물 0725(트랜스 1+1 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0416))와 작제물 0750(트랜스 1+2 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0414))에 대한 결합 곡선이 도시되어 있다. 상기 세가지 작제물은 또한 상업적으로 이용가능한 PD1/LAG3 콤보 리포터 실험에서 비교되었

고, 그 실험에 상응하는 결합 곡선이 도 7f에 도시되어 있다.

도 8: 상이한 포맷으로 있는 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체와 모 항-LAG3 항체를 활성화된 T 세포에 투여한 추가로부터 3시간 후에 유동 세포측정법으로 측정된 내재화. **도 8a**는 상기 실험의 대표적 히스토그램을 보여주 고, 상이한 포맷에 대한 내재화 백분율이 **도 8b**에 도시되어 있다.

도 9: 보다 더 높은 정도의 내재화를 보이는 다른 포맷들과 비교할 때, 시간 경과에 따른 분석은 이중특이적 항 -PD1/항-LAG3 항체(0927)의 1+1 포맷이 더 높은 막 국지화 현상을 가짐을 보여준다. **도 9a**는 15분, 1시간 및 3 시간 후 공초점 현미경으로 측정된 형광 이미지를 보여준다. 활성화 CD4 세포는 검은색 공으로 도시되어 있다. TIM-3 항체의 형광 이미지가 강한 내재화의 실례로 도시되어 있다. 이미지의 정량적 분석이 **도 9b**에 도시되어 있다.

도 10: 통상적인 T 세포 대 Treg에 대한 결합. **도 10a** 내지 **도 10c**는 통상적인 T 세포(검은색 곡선)와 Treg(회 색 영역)에 대한 결합을 보여주는 하나의 대표 공여자로부터의 데이터를 보여준다. 항-LAG3 항체 0414(hu IgG1 PGLALA)의 결합이 **도 10a**, **도 10b**에 도시되어 있고 **도 10c**는 항-PD1 항체 0376 및 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체(0927)의 결합을 각각 보여준다. **도 10d**에서는 동일한 샘플 내에서 통상적인 T 세포에 결합된 주어진 분자의 델타 기하학적 형광 평균 강도 및 Tregs에 결합된 주어진 분자의 델타 기하학적 형광 평균 강도가 도시되어 있다. 결과(중간값)는 3명의 상이한 공여자가 있는 3개의 독립적 실험에서 나온다.

도 11: PD1과 Treg의 공동-차단은 Treg 억제로부터 Tconv 효과기 기능을 구해낸다. 공배양 5일 후에 Tconv에 의 해 분비되는 그랜자임 B의 Treg에 의한 억제 백분율이 도시되어 있다. 결과(중간값)는 10명의 상이한 공여자가 있는 10개의 독립적 실험에서 나온다. P는 양방향 ANOVA를 사용하여 산출되었다.

도 12: 면역원성 흑색종-항원 펩티드 풀로 기억된 후에 흑색종 환자 PBMC의 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B와 IFN- γ 의 분비에 대한 PD1과 LAG-3 차단의 효과. **도 12**는 항-PD1(0376) 단독, aLAG3(0414)와 항-PD1(0376)의 병용 및 이중특이적 항체 0927(1+1 포맷에서 항-PD1(0376)/항-LAG3(0414))에 의해 발생한 그랜자임 B와 IFN- γ 의 방출에 대한 효과의 비교를 보여준다. 12명의 흑색종 환자 PBMC로부터의 펩티드-풀 자극된 CD4 T 세포에 대 하여 그랜자임 B와 IFN- γ 의 생성 배수 증가가 도시되어 있다.

도 13: B 세포-림프아세포양 세포주(ARH77)와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출에 대 한 aPD1/aLAG3 이중특이적 항체의 효과. 본원에서 기술된 것처럼, 상이한 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체는 치 료 또는 임상적 실험의 표준에서 사용되는 항체들과 비교된다.

도 14: 체장선암종, BxPC3에 걸리게 한 인간화 마우스에서의 효험 연구. CEACAM CD3 TCB와 병용시, 통상적인 PD1 항체와 비교하여 aPD1/aLAG3 이중특이적 항체만이 통계학적으로 유의미한 종양 예방을 제공하였다. BxPC3 세포의 피하 투여로 종양에 걸리고 CEACAM5-TCB와 병용하여 상기에서 나타낸 분자로 치료한 인간화 마우스에서 의 종양 성장 곡선들이 도시되어 있다.

도 15: 종양 부피의 측정치($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)가, 47일이라는 기간에 걸쳐, 항-종양 반응 그룹의 동종성을 보이는 각 개별 동물에 대해 도시되어 있다. **도 15a**의 비히를 그룹, **도 15b**의 CEACAM5 CD3 TCB 단독 투여(2.5 mg/kg), **도 15c**의 CEACAM5 Cd3 TCB의 니볼루맙(Nivolumab)과의 병용 투여(1.5 mg/kg), **도 15d**의 CEACAM5 CD3 TCB의 펌브롤 리주맙(Pembrolizumab)과의 병용 투여(1.5 mg/kg), **도 15e**(1.5 mg/kg) 및 **도 15f**(3 mg/kg 이중특이적 항체)의 CEACAM5 CD3 TCB의 PD1/LAG3 0927과의 병용 투여 에 대한 종양 성장 곡선이 도시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

- [0133] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 용어들과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서를 해석하는 목적을 위해, 다음 정의들이 적용될 것이고 적절한 경우, 단수로 사용된 용어들은 복수의 용어들을 포함할 것이고, 그 반대도 마찬가지이다.
- [0134] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "**항원 결합 분자**"는 가장 넓은 의미로 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 분 자를 지칭한다. 항원 결합 분자들의 예는 항체, 항체 단편 및 스캐폴드 항원 결합 단백질이다.
- [0135] 본원에서 용어 "**항체**"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 이들에 한정되지는 않지만, 단클론 항체, 다클론 항체, 단 일특이적 항체, 및 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 경

우의 항체 단편을 비롯하여, 다양한 항체 작제물을 포함한다.

[0137] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "**단클론 항체**"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득되는 항체를 말한다. 즉, 집단을 구성하는 개개의 항체는 동일하고/하거나, 예를 들어, 천연 발생 돌연변이를 포함하거나 단클론 항체 제제의 제조 중에 생기는 가능한 변이체 항체를 제외하면, 동일한 에피토프에 결합하고, 이러한 변이체는 일반적으로 소량 존재한다. 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 단클론 항체 제제와 대조적으로, 단클론 항체 제제의 각각의 단클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해 유도된다.

[0138] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "**단일특이적**"은 동일 항원의 동일 에피토프에 각각 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 갖는 항체를 의미한다. 용어 "**이중특이적**"은 항체가 적어도 2개의 별개의 항원 결정기, 예를 들어 상이한 항원 또는 동일 항원상의 상이한 에피토프에 결합하는 한 쌍의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(VL)에 의해 각각 형성되는 2개의 결합 부위에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 이러한 이중특이적 항체는 1+1 포맷이다. 다른 이중특이적 항체 포맷은 2+1 포맷(제1 항원 또는 에피토프에 대한 2개의 결합 부위 및 제2 항원 또는 에피토프에 대한 1개의 결합 부위를 포함) 또는 2+2 포맷(제1 항원 또는 에피토프에 대한 2개의 결합 부위 및 제2 항원 또는 에피토프에 대한 2개의 결합 부위를 포함)이다. 전형적으로, 이중특이적 항체는 상이한 항원 결정기에 각각 특이적인 2개의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "**결합가(valent)**"는 항원 결합 분자에서 특정 수의 결합 도메인의 존재를 의미한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 항원 결합 분자에서 각각 2개의 결합 도메인, 4개의 결합 도메인 및 6개의 결합 도메인의 존재를 의미한다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 적어도 "2가"이고 "3가" 또는 "다가"(예를 들어, "4가" 또는 "6가")일 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 항체는 2개 이상의 결합 부위를 가질 수 있고 이중특이적이다. 즉, 항체는 2개를 초과하는 결합 부위가 있는 경우(즉, 항체가 2가 또는 다가임)에서조차 이중특이적일 수 있다.

[0140] 용어 "전장 항체(full length antibody)", "온전한 항체(intact antibody)" 및 "전항체(whole antibody)"는 본원에서 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. "**천연 항체**"는 다양한 구조를 갖는 천연 발생 면역글로불린 분자를 의미한다. 예를 들어, 천연 IgG-클래스 항체는 이황화 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어진 약 150,000달톤의 이종사량체성 당단백질이다. N-말단으로부터 C-말단까지, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH)에 이어, 중쇄 불변 영역이라고도 불리는 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단까지, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL)에 이어, 경쇄 불변 영역이라고도 불리는 불변 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 항체의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), 또는 μ (IgM)로 불리는 5개의 유형 중 1개에 배정될 수 있고, 이들의 일부는 아형들, 예컨대 γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) 및 α2 (IgA2)로 더 나누어질 수 있다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 유형 중 1개에 배정될 수 있다.

[0141] "**항체 단편**"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 의미한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 이중항체; 삼중항체, 사중항체, 교차-Fab 단편; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체 및 단일 도메인 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 특정한 항체 단편의 검토를 위해서는, 문헌[Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해서는, 예를 들어, 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 WO 93/16185호; 및 미국특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호를 참조한다. 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 생체내 반감기가 증가한 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 검토를 위해, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다. 이중항체는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 도메인을 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 삼중항체 및 사중항체가 또한 문헌[Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정한 구현예들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(도만티스사(Domantis, Inc.) (매사추세츠주 윌섬); 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516 B1호 참조). 또한, 항체 단편은, VL 도메인과 함께 기

능성 항원 결합 부위로 조립될 수 있는 VH 도메인의 특징을 갖거나, VH 도메인과 함께 기능성 항원 결합 부위로 조립될 수 있는 VL 도메인의 특징을 가짐으로써 전장 항체의 항원 결합 성질을 제공하는 단일쇄 폴리펩티드를 포함한다. 항체 단편은, 본원에 기재된 바와 같이, 온전한 항체의 단백질분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들어 대장균 또는 파지)에 의한 생산을 제한 없이 포함하는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0142] 온전한 항체의 파파인(papain) 절단은, 각각 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 및 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 "Fab" 단편으로 불리는, 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 따라서, 용어 "**Fab 단편**"은 경쇄의 VL 도메인 및 불변 도메인(CL)을 포함하는 경쇄 단편, 및 중쇄의 VH 도메인 및 제1 불변 도메인(CH1)을 포함하는 항체 단편을 말한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 수개의 잔기들의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 갖는 Fab' 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위(2개의 Fab 단편) 및 Fc 영역의 일부분을 갖는 F(ab')₂ 단편을 제공한다.

[0143] 용어 "**교차-Fab 단편**" 또는 "xFab 단편" 또는 "교차형 Fab 단편"은, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 또는 불변 영역이 교환되는 Fab 단편을 말한다. 교차형 Fab 분자의 2개의 상이한쇄 조성이 가능하며 본 발명의 이중특이적 항체에 포함된다: 한편으로, Fab 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 교환된다. 즉, 교차형 Fab 분자는 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 불변 영역(CH1)으로 이루어진 펩티드쇄, 및 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 이루어진 펩티드쇄를 포함한다. 이러한 교차형 Fab 분자는 또한 교차Fab_(VLVH)로도 지칭된다. 다른 한편으로, Fab 중쇄 및 경쇄의 불변 영역들이 교환되는 경우, 교차형 Fab 분자는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 이루어진 펩티드쇄, 및 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 불변 영역(CH1)으로 이루어진 펩티드쇄를 포함한다. 이러한 교차형 Fab 분자는 또한 교차Fab_(CLCH1)로도 지칭된다.

[0144] "단일쇄 Fab 단편" 또는 "**scFab**"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 링커로 이루어진 폴리펩티드이고, 이때 상기 항체 도메인들 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 (a) VH-CH1-링커-VL-CL, b) VL-CL-링커-VH-CH1, c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 d) VL-CH1-링커-VH-CL의 순서 중 하나를 가지고; 상기 링커는 30개 이상의 아미노산, 바람직하게는 32 내지 50개 아미노산의 폴리펩티드이다. 상기 단일쇄 Fab 단편은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 천연 이황화 결합을 통해 안정화된다. 또한, 이들 단일쇄 Fab 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예를 들어, 카뮈트 넘버링 체계에 따른 가변 중쇄 중 위치 44 및 가변 경쇄 중 위치 100)에 의한 쇠간 이황화 결합의 생성에 의해 더 안정화될 수 있다.

[0145] "교차형 단일쇄 Fab 단편" 또는 "**x-scFab**"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 도메인 1(CH1), 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 항체 경쇄 불변 도메인(CL) 및 링커로 이루어진 폴리펩티드이고, 이때 상기 항체 도메인들 및 상기 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 a) VH-CL-링커-VL-CH1 및 b) VL-CH1-링커-VH-CL의 순서 중 하나를 가지고; 상기 VH 및 VL은 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 함께 형성하고, 상기 링커는 30개 이상의 아미노산의 폴리펩티드이다. 또한, 이들 x-scFab 분자는 시스테인 잔기의 삽입(예를 들어, 카뮈트 넘버링 체계에 따른 가변 중쇄 중 위치 44 및 가변 경쇄 중 위치 100)에 의한 쇠간 이황화 결합의 생성에 의해 더 안정화될 수 있다.

[0146] "**단일쇄 가변 단편(scFv)**"은 10 내지 약 25개 아미노산의 짧은 링커 펩티드에 의해 연결되는, 항체의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역들의 융합 단백질이다. 상기 링커는 통상적으로 유연성을 위해 글리신이 풍부할 뿐만 아니라 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하며, V_H의 N-말단을 V_L의 C-말단과 연결시킬 수 있거나 그 반대도 가능하다. 상기 단백질은 불변 영역들의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고 원래 항체의 특이성을 유지한다. scFv 항체는, 예를 들어, 문헌[Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96]에 기술되어 있다. 또한, 항체 단편은, VL 도메인과 함께 기능성 항원 결합 부위로 조립될 수 있는 VH 도메인의 특징을 갖거나, VH 도메인과 함께 기능성 항원 결합 부위로 조립될 수 있는 VL 도메인의 특징을 가짐으로써 전장 항체의 항원 결합 성질을 제공하는 단일쇄 폴리펩티드를 포함한다.

[0147] "**스캐폴드 항원 결합 단백질**"은 당해 분야에 공지되어 있다, 예를 들어, 피브로넥틴 및 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)이 항원-결합 도메인에 대한 대체 스캐폴드로서 사용되었다(예를 들어, 문헌[Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009)] 및 문헌[Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008)] 참조). 본 발명의 일 양태에서, 스캐폴드 항원 결합 단백질은 CTLA-4(에비바디(Evibody)), 리포칼린(Lipocalin)(안티칼린(Anticalin)), 단백질 A-유래 분자, 예를 들어, 단백질 A의 Z-도메

인(어피바디(Affibody)), A-도메인(아비머(Avimer)/맥시바디(Maxibody)), 혈청 트랜스페린(트랜스-바디); 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin), 항체 경쇄 또는 중쇄의 가변 도메인(단일-도메인 항체, sdAb), 항체 중쇄의 가변 도메인(나노바디, aVH), V_{NAR} 단편, 피브로넥틴(어드넥틴(AdNectin)), C-형 렉틴 도메인(테트라넥틴(Tetranectin)); 새로운 항원 수용체 베타-락타마제의 가변 도메인(V_{NAR} 단편), 인간 감마-크리스탈린 또는 유비퀸틴(어필린(Affilin) 분자); 인간 프로테아제 억제제의 쿠니츠(kunitz) 유형 도메인, 크노틴(knottin) 계열로부터의 단백질과 같은 미소체(microbody), 펩티드 앵타머 및 피브로넥틴(어드넥틴)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. CTLA-4(세포독성 T 림프구-결합 항원 4)는 주로 CD4+ T-세포상에서 발현되는 CD28-계열 수용체이다. 이의 세포의 도메인은 가변 도메인-유사 Ig 접힘(fold)을 갖는다. 항체의 CDR에 상응하는 루프는 상이한 결합 성질을 부여하는 이중 서열로 치환될 수 있다. 상이한 결합 특이성을 갖도록 조작된 CTLA-4 분자는 또한 에비바디로도 알려져 있다(예를 들어, US7166697B1). 에비바디는 항체(예를 들어, 도메인 항체)의 단리된 가변 영역과 대략 동일한 크기이다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)]을 참조한다. 리포칼린(Lipocalin)은 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질과 같은 소형 소수성 분자를 운반하는 세포의 단백질의 한 계열이다. 이들은 상이한 표적 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 원추형 구조의 개방 말단에서 다수의 루프를 갖는 견고한 베타-시트 2차 구조를 갖는다. 안티칼린(Anticalin)은 160 내지 180 개 아미노산의 크기이며, 리포칼린으로부터 유도된다. 추가의 세부사항에 대해서는, 문헌[Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)], US7,250,297 B1호 및 US20070224633호를 참조한다. 어피바디(affibody)는 항원에 결합하도록 조작될 수 있는, 스태필로코커스 오레우스(Staphylococcus aureus)의 단백질 A로부터 유도된 스캐폴드이다. 상기 도메인은 약 58개 아미노산의 3-나선형 다발로 이루어진다. 라이브러리는 표면 잔기들의 무작위선정에 의해 생성되었다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)] 및 EP1641818 A1호를 참조한다. 아비머(Avimer)는 A-도메인 스캐폴드 계열로부터 유도된 다중도메인 단백질이다. 약 35개 아미노산의 천연 도메인은 한정된 이항화 결합 구조를 취한다. A-도메인의 계열에 의해 나타난 자연적 돌연변이의 서플링에 의해 다양성이 발생된다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005) 및 Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)]을 참조한다. 트랜스페린은 단량체성 혈청 운반 단백질이다. 트랜스페린은 허용적인 표면 루프 내에 펩티드 서열의 삽입에 의해 상이한 표적 항원에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 트랜스페린 스캐폴드의 예로는 트랜스-바디(Trans-body)가 포함된다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)]을 참조한다. 설계된 안키린 반복 단백질(Designed Ankyrin Repeat Proteins, DARPin)은 세포골격에 대한 내재성 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질의 한 계열인 안키린으로부터 유도된다. 단일 안키린 반복서열은 2개의 알파-나선 및 베타-회전으로 이루어지는 33개 잔기 모티프이다. 이들은 각 반복서열의 첫번째 알파-나선 및 베타-회전에서 잔기들을 무작위 선정함으로써 상이한 표적 항원들에 결합하도록 조작될 수 있다. 이의 결합 계면은 모듈의 수를 증가시킴으로서 증가될 수 있다(친화도 증진 방법). 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)] 및 문헌[J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)] 및 US2004/0132028 A1호를 참조한다.

[0148] 단일-도메인 항체는 단일 단량체성 가변 항체 도메인으로 이루어진 항체 단편이다. 제1 단일 도메인은 카멜리드(camelid)로부터의 항체 중쇄의 가변 도메인으로부터 유도되었다(나노바디 또는 V_{H} 단편). 또한, 용어 단일-도메인 항체는 상어로부터 유도된 자율적 인간 중쇄 가변 도메인(aVH) 또는 V_{NAR} 단편을 포함한다. 피브로넥틴은 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 스캐폴드이다. 어드넥틴(Adnectin)은 제3형 인간 피브로넥틴(FN3)의 15개 반복 단위들의 10번째 도메인의 천연 아미노산 서열의 주쇄로 이루어진다. 베타-샌드위치의 한 말단에서 3개의 루프가, 어드넥틴이 목적하는 치료 표적을 특이적으로 인식할 수 있도록 조작될 수 있다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)], US2008/0139791호, W02005/056764호 및 US6,818,418 B1호를 참조한다. 펩티드 앵타머(peptide aptamer)는 불변 스캐폴드 단백질, 전형적으로는 활성 부위에 삽입된 제한적 가변 펩티드 루프를 함유하는 티오레독신(TrxA)으로 이루어지는 조합적 인식 분자이다. 추가의 세부사항에 대해서는 문헌[Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)]을 참조한다. 미소체(microbody)는 3 내지 4개의 시스테인 가교를 함유하는, 25 내지 50개 아미노산 길이를 갖는 천연 발생 미소단백질(microprotein)로부터 유도되며, 미소단백질의 예로는 칼라타BI(KalataBI) 및 코노톡신 및 크노틴이 포함된다. 미소단백질은 미소단백질의 전체 접힘에 영향을 미치지 않고 25개 이하의 아미노산을 포함하도록 조작될 수 있는 루프를 갖는다. 조작된 크노틴 도메인에 대한 추가의 세부사항에 대해서는 W02008/098796호를 참조한다.

[0149] 기준 분자로서 "동일 에피토프에 결합하는 항원 결합 분자"는 경쟁 분석법에서 그 항원에 대한 기준 분자의 결합을 50% 이상 차단하는 항원 결합 분자를 말하며, 반대로, 기준 분자는 경쟁 분석법에서 그 항원에 대한 항원

결합 분자의 결합을 50% 이상 차단한다.

- [0150] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "**항원 결합 도메인**" 또는 "**항원 결합 부위**"는 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자의 부분을 말한다. 보다 구체적으로, 용어 "항원 결합 도메인"은 항원의 일부 또는 전체에 특이적으로 결합하고 그와 상보적인 영역을 포함하는 항체의 부분을 말한다. 항원이 큰 경우, 항원 결합 분자는 단지 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있으며, 상기 부분은 에피토프로 지칭된다. 항원 결합 도메인은, 예를 들어, 하나 이상의 가변 도메인(가변 영역으로도 불림)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일 양태에서, 항원 결합 도메인은 이의 항원에 결합하여 이의 기능을 차단하거나 부분적으로 차단할 수 있다. PD1 또는 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인은 본원에서 추가로 정의되는 항체 및 이의 단편을 포함한다. 또한, 항원 결합 도메인은 스캐폴드 항원 결합 단백질, 예를 들어 설계된 반복서열 단백질 또는 설계된 반복서열 도메인에 기초하는 결합 도메인을 포함할 수 있다(예를 들어, WO 2002/020565호 참조).
- [0151] 본원에서 사용된 용어 "**항원 결정기**"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이며, 항원 결합 모이어티가 결합되어 항원 결합 모이어티-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 부위(예를 들어, 아미노산의 연속 신장부 또는 비-연속 아미노산의 상이한 영역들로 구성된 입체형태 구조)를 말한다. 유용한 항원 결정기는, 예를 들어, 종양 세포의 표면 상에서, 바이러스-감염된 세포의 표면 상에서, 다른 질병에 걸린 세포의 표면 상에서, 면역 세포의 표면 상에서, 혈청내에서 유리하는 상태로, 및/또는, 세포외 기질(ECM) 중에서 발견될 수 있다. 본원에서 항원으로 유용한 단백질은, 달리 나타내지 않는 한, 영양류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 형태의 단백질일 수 있다. 특별한 구현예에서, 항원은 인간 단백질이다. 본원에서 특정 단백질을 언급할 때, 상기 용어는 "전장"의 비가공된 단백질뿐 아니라 세포에서의 가공으로부터 비롯되는 임의 형태의 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한 단백질의 천연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다.
- [0152] "**특이적 결합**"은 결합이 항원에 대해 선택적이며 원치않거나 비-특이적인 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 특정 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력은 효소-결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 또는 당업자에게 익숙한 다른 기술, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(비아코어(BIAcore) 기기 상에서 분석됨)(Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), 및 통상적인 결합 분석법(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))을 통해 측정될 수 있다. 일 구현예에서, 비관련 단백질에 대한 항원 결합 분자의 결합 정도는, 예를 들어, SPR로 측정시 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 구현예에서, 항원에 결합하는 분자는 1 μ M 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하 또는 0.001 nM 이하(예를 들어, 10^{-7} M 이하, 예를 들어, 10^{-7} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(Kd)를 갖는다.
- [0153] "**친화도**" 또는 "**결합 친화도**"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어, 항체)와 이의 결합 상대(예를 들어, 항원)사이의 비-공유적 상호작용의 총합의 강도를 말한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 말한다. 분자 X의 그 상대 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 및 결합 속도 상수(각각 koff 및 kon)의 비인 해리 상수(Kd)로 나타낼 수 있다. 따라서, 등가의 친화도들은 속도 상수들의 비가 동일하게 유지되는 한, 상이한 속도 상수들을 포함할 수 있다. 친화도는 본원에 기술된 것을 포함하여 당해 분야에 공지된 통상적인 방법들에 의해 측정할 수 있다. 친화도를 측정하기 위한 특정 방법은 표면 플라즈몬 공명(SPR)이다.
- [0154] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 항체의 "**고 친화도**"는 표적 항체에 대해 10^{-9} M 이하 그리고 보다 구체적으로는 10^{-10} M 이하의 Kd를 갖는 항체를 말한다. 용어 항체의 "**저 친화도**"는 10^{-8} M 이상의 Kd를 갖는 항체를 말한다.
- [0155] 항원에 대한 항체의 친화도를 개선하게 되는 변경을 갖지 않는 모 항체에 비하여, "**친화도 성숙**" 항체는 하나 이상의 초가변 영역(HVR)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 말한다.
- [0156] 용어 "**PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체**", "PD1 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체", "PD1 및 LAG3에 특이적인 이중특이적 항체 결합 분자" 또는 "항-PD1/항-LAG3 항체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 항체가 PD1 및 LAG3을 표적화 함에 있어서 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도를 갖고서 PD1 및 LAG3에 결

합할 수 있는 이중특이적 항체를 말한다.

[0157] 프로그램된 세포 사멸 단백질 1로도 알려져 있는 용어 "PD1"은 288개의 아미노산의 유형 I 막 단백질이고, 이는 문헌[Ishida et al., EMBO J., 11 (1992), 3887-3895]에 1992년에 최초로 기재되었다. PD-1은 확장된 CD28/CTLA-4 계열의 T 세포 조절기들의 구성원이고 2개의 리간드, PD-L1(B7-H1, CD274) 및 PD-L2(B7-DC, Cd273)를 가진다. 단백질의 구조는 세포외 IgV 도메인, 및 뒤이어 막관통 영역과 세포내 꼬리를 포함한다. 세포 내 꼬리는 면역수용체 티로신계 억제 모티프 및 면역수용체 티로신계 스위치 모티프에 위치하는 2개의 인산화 부위를 포함하고, PD1이 TCR 신호를 음으로 조절함을 시사한다. 이는 리간드 결합시 PD1의 세포질 꼬리에 대한 SHP-1 및 SHP-2 포스파타제의 결합과 일치한다. PD1이 미접촉(naive) T 세포 상에서 발현되지 않지만, T 세포 수용체(TCR)-매개 활성화에 따라서 상향조절되고, 활성화된 및 탈진된 T 세포 둘 다에서 관찰된다(Agata et al., Int. Immunology 8 (1996), 765-772). 이러한 탈진 T 세포는 기능장애 표현형을 갖고, 적절히 반응할 수 없다. PD1이 상대적으로 넓은 발현 패턴을 갖더라도, 이의 가장 중요한 역할은 아마 T 세포에 대한 공동억제 수용체로서의 역할일 것이다(Chinai et al, Trends in Pharmacological Sciences 36 (2015), 587-595). 따라서, 현재의 치료 접근법은 PD1과 그 리간드의 상호작용을 차단하여 T 세포 반응을 강화시키는 것에 초점을 맞춘다. 용어 "프로그램화된 사멸 1", "프로그램화된 세포 사멸 1", "단백질 PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" 및 "hPD-I"는 상호교환적으로 사용될 수 있고, 인간 PD1의 변이체, 이소폼, 중 동족체, 및 PD1과 하나 이상의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 인간 PD1의 아미노산 서열은 유니프롯(Uniprot)(www.Uniprot.org) 수탁번호 Q15116(서열번호 128)에 제시된다.

[0158] 용어 "항-PD1 항체" 및 "PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체"는 PD1을 표적화함에 있어서 항체가 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도를 갖고서 세포 표면 상에서 PD1, 특히 PD1 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 말한다. 일 양태에서, 관련되지 않은 비-PD1 단백질에 대한 항-PD1 항체의 결합 정도는, 예를 들어 방사면역검정(RIA) 또는 유세포 분석(FACS)에 의해 측정되거나 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 이용하는 표면 플라즈몬 분석에 의해 측정된, PD1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 양태에서, 인간 PD1에 결합하는 항원 결합 단백질은 1 μM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하 또는 0.001 nM 이하(예를 들어, 10⁻⁸ M 이하, 예를 들어, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹³ M, 예를 들어, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ M)의, 인간 PD1에 결합하기 위한 결합 친화도의 K_D 값을 갖는다. 일 바람직한 구현 예에서, 결합 친화도의 각각의 K_D 값은 PD1 결합 친화도에 대한 인간 PD1의 세포외 도메인(ECD)(PD1-ECD)을 이용하는 표면 플라즈몬 공명 분석에서 측정된다. 용어 "항-PD1 항체"는 PD1 및 제2 항원에 결합할 수 있는 이중 특이적 항체들도 포함한다.

[0159] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "LAG3" 또는 "Lag-3" 또는 "림프구 활성화 유전자-3" 또는 "CD223"은, 달리 나타내지 않는 한, 영장류(예를 들어, 인간) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 LAG3일 수 있다. 상기 용어는 "전장", 미가공된 LAG3뿐 아니라 세포 내에서의 가공으로 생기는 임의 형태의 LAG3을 포함한다. 상기 용어는 또한 LAG3의 천연 발생 변이체, 예를 들어, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 일 바람직한 구현 예에서, 용어 "LAG3"는 인간 LAG3을 말한다. 예시적인 가공된(신호 서열 없이) LAG3의 아미노산 서열이 서열번호 73에 제시되어 있다. 예시적인 세포외 도메인(ECD) LAG3의 아미노산 서열이 서열번호 74에 제시되어 있다.

[0160] 용어 "항-LAG3 항체" 및 "LAG3에 결합하는 항체"는 LAG3을 표적화 함에 있어서 항체가 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도를 갖고서 LAG3에 결합할 수 있는 항체를 말한다. 일 양태에서, 관련되지 않은 비-LAG3 단백질에 대한 항-LAG3의 결합의 정도는, 예컨대, 방사면역분석(RIA)에 의해 측정된 LAG3에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 구현 예에서, LAG3에 결합하는 항체는 1 μM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하 또는 0.001 nM 이하(예를 들어, 10⁻⁸ M 이하, 예를 들어, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹³ M, 예를 들어, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ M)의 해리 상수(K_d)를 갖는다. 특정 양태에서, 항-LAG3 항체는 상이한 종으로부터 LAG3 중 보존된 LAG3의 에피토프에 결합한다. 일 바람직한 구현 예에서, "항-LAG3 항체", "인간 LAG3에 특이적으로 결합하는 항체", 및 "인간 LAG3에 결합하는 항체"는 1.0 x 10⁻⁸ mol/l 이하의 K_D-값의 결합 친화도, 일 구현 예에서 1.0 x 10⁻⁹ mol/l 이하의 K_D-값의 결합 친화도, 일 구현 예에서 1.0 x 10⁻⁹ mol/l 내지 1.0 x 10⁻¹³ mol/l의 K_D-값의 결합 친화도를 갖고서 인간 LAG3 항원 또는 이의 세포외 도메인(ECD)에 특이적으로 결합

하는 항체를 말한다. 이 문맥에서, 결합 친화도는, 예컨대 LAG3 세포의 도메인을 이용하는 플라즈몬 공명 기술(BIAcore®, GE-Healthcare, 스웨덴 읍살라)과 같은 표준 결합 분석을 이용하여 결정된다. 용어 "항-LAG3 항체"는 LAG3 및 제2 항원에 결합할 수 있는 이중특이적 항체들도 포함한다.

[0161] "블로킹" 항체 또는 "길항제" 항체는 자신이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 일부 구현예에서, 블로킹 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 예를 들어, 본 발명의 이중특이적 항체는 기능장애 상태에서부터 항원 자극까지 T 세포(예컨대, 증식, 사이토킨 생성, 표적 세포 사멸)에 의해 기능 반응을 회복하기 위하여 PD-1 및 LAG3를 통하여 신호전달을 차단한다.

[0162] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원 결합 분자를 항원에 결합시키는데 수반되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 말한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 이때 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(framework region, FR) 및 3개의 초가변 영역(hypervariable region, HVR)을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다. 단일 VH 또는 VL 도메인이면 항원 결합 특이성을 제공하기에 충분할 수 있다.

[0163] 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 서열에 있어서 초가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역들 각각을 말한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR(VH에 3개(H1, H2, H3) 및 VL에 3개(L1, L2, L3))을 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 상기 상보성 결정 영역은 최고 서열 가변성을 가지고/가지거나 항원 인식에 수반된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)에 존재한다(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). 예시적인 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65, 및 H3의 95-102에 존재한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 초가변 영역(HVR)은 또한 상보성 결정 영역(CDR)으로도 지칭되며, 이들 용어들은 본원에서 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역 부분과 관련하여 상호교환적으로 사용된다. 상기 특정 영역은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)] 및 문헌[Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)]에 기술되었으며, 여기서 정의들은 서로에 대해 비교될 때 아미노산 잔기의 중복 또는 아집단을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 언급하기 위한 정의의 적용은 본원에서 정의되고 사용되는 바와 같은 용어의 범위 내에 속해야 한다. 상기 인용된 참조문헌 각각에 정의된 바와 같이 CDR을 포함하는 적절한 아미노산 잔기를 비교로서 하기 표 A에 나타낸다. 특정 CDR을 포함하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 당업자라면 통상적으로 항체의 가변 영역 아미노산 서열을 고려하여 어느 잔기가 특정 CDR을 포함하는지를 결정할 수 있다.

표 A. CDR 정의¹

CDR	카밧	코티아	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 표 A에서 모든 CDR 정의의 번호는 카밧 등에 의해 나타낸 넘버링 체계 관례에 따른다(하기 참조).

² 표 A에서 사용된 바와 같이 소문자 "b"를 갖는 "AbM"은 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 "AbM" 항체 모델링 소프트웨어에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 말한다.

[0164]

[0165] 카밧 등은 또한 임의의 항체에 적용할 수 있는 가변 영역 서열에 대한 넘버링 체계를 정의하였다. 당업자라면

서열 자체 이상의 임의의 실험 데이터를 의지하지 않고, 임의의 가변 영역 서열에 "카뱃 넘버링"의 상기 체계를 분명하게 지정할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "카뱃 넘버링"은 문헌[Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 나타난 넘버링 체계를 말한다. 달리 명시되지 않는 한, 항체 가변 영역에 특정 아미노산 잔기 위치의 번호에 대한 언급은 카뱃 넘버링 체계를 따른다.

- [0166] VH에서의 CDR1은 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원과 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR 또는 a-CDR로 불리는 CDR의 영역들 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDRH3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에 존재한다(문헌[Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조). 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인내 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 카뱃 등에 따라 번호가 부여된다.
- [0167] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기가 아닌 가변 도메인 잔기를 말한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 다음의 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0168] "수용체(acceptor) 인간 프레임워크"는, 하기에 정의되는 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유도된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공통 프레임워크"로부터 유도된" 수용체 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 구현예에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 서열에 있어 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열과 동일하다.
- [0169] 용어 "키메라" 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 말한다.
- [0170] 항체의 "클래스"는 그 중쇄가 갖는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 말한다. 항체의 5개 주요 클래스 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하며, 이들 중 여러 개가 하위계열(이소타입), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 더 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , β , ϵ , γ , 및 μ 로 불린다
- [0171] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 말한다. 특정 구현예에서, 인간화 항체는 1개 이상, 및 전형적으로는 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전체를 포함할 것이며, 여기서 HVR(예를 들어, CDR)의 전체 또는 실질적으로 전체가 비-인간 항체에 상응하고, FR의 전체 또는 실질적으로 전체가 인간 항체에 상응한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유도된 항체 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어, 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화가 일어난 항체를 말한다. 본 발명에 포함되는 "인간화 항체"의 다른 형태는, 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합에 관해 본 발명에 따른 성질을 제공하기 위해 불변 영역이 원래 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변형되거나 변화된 항체이다.
- [0172] "인간" 항체는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리(repertory) 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하는 비-인간 공급원으로부터 유도된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 명확하게 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.
- [0173] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득되는 항체를 말한다. 즉, 집단을 구성하는 개개의 항체는 동일하고/하거나, 예를 들어, 천연 발생 돌연변이를 포함하거나 단클론 항체 체제의 제조 중에 생기는 가능한 변이체 항체를 제외하면, 동일한 에피토프에 결합하고, 이러한 변이체는 일반적으로 소량 존재한다. 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 다클론 항체 체제와 대조적으로, 단클론 항체 체제의 각각의 단클론 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해 유도된다. 따라서, 수식어구인 "단클론"은 실질적으로 동질적인 항체 집단으로부터 수득되는 항체의 성격을 가리키는 것이지 어떠한 특정 방법에 의해 항체를 제조해야 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론 항체는 제한없이 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한 형질전환 동물을 이용한 방법을 비롯한, 다양한 기술들로 제조될 수

있고, 단클론 항체를 제조하기 위한 그러한 방법 및 다른 예시적인 방법이 본원에서 기술된다.

- [0174] 용어 "Fc 도메인" 또는 "**Fc 영역**"은 본원에서 불변 영역의 적어도 일부분을 포함하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특히, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226으로부터 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복시-말단까지 이른다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 중쇄의 아미노산 서열은 항상 C-말단 리신을 갖고서 제공되지만, C-말단 리신이 없는 변이체가 본 발명에 포함된다.
- [0175] IgG Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 통상적으로 대략 위치 231의 아미노산 잔기로부터 대략 위치 340의 아미노산 잔기까지 이른다. 일 구현예에서, 탄수화물 쇄가 CH2 도메인에 결합된다. 본원에서 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변이체 CH2 도메인일 수 있다. "CH3 도메인"은 Fc 영역에서 CH2 도메인까지 C-말단 잔기들의 신장부(즉, IgG의 대략적 위치 341의 아미노산 잔기로부터 대략적 위치 447의 아미노산 잔기까지)를 포함한다. 본원에서 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변이체 CH3 도메인(예를 들어, 이의 한 쇄에 도입된 "돌출부"("놈") 및 이의 다른 쇄에 상응하여 도입된 "공동(cavity)"("홀")을 갖는 CH3 도메인; 특별히 본원에 참고로 인용된 미국 특허 5,821,333호 참조)일 수 있다. 이러한 변이체 CH3 도메인은 본원에 기술된 바와 같은 2개의 비-동일 항체 중쇄의 이종이량체화를 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 번호는 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기술된 바와 같은, EU 인덱스(EU index)로도 불리는 EU 넘버링 체계에 따른다.
- [0176] "**놈-인투-홀**" 기술은, 예를 들어, US 5,731,168호; US 7,695,936호; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기술되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 이종이량체 생성을 촉진하고 동종이량체 생성을 저해하기 위해 돌출부가 공동에 위치할 수 있도록, 제1 폴리펩티드의 계면에 돌출부(놈) 및 제2 폴리펩티드의 계면에 상응하는 공동(홀)을 도입하는 것을 포함한다. 돌출부는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 치환시킴으로써 구성된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환시킴으로써, 돌출부와 동일하거나 유사한 크기의 상보적 공동이 제2 폴리펩티드의 계면에 생성된다. 돌출부 및 공동은 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을, 예를 들어, 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 펩티드 합성에 의해 변경시킴으로써 제조될 수 있다. 특정 구현예에서, 놈 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나에 아미노산 치환 T366W를 포함하고, 홀 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 다른 하나에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 놈 변형을 포함하는 Fc 도메인의 아단위는 추가로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 홀 변형을 포함하는 Fc 도메인의 아단위는 추가로 아미노산 치환 Y349C를 포함한다. 이들 2개 시스테인 잔기의 도입은 Fc 영역의 2개 아단위들 사이에 이황화 가교의 형성을 야기하여 이량체를 더 안정화시킨다(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).
- [0177] "면역글로불린의 Fc 영역과 등가의 영역"은 면역글로불린의 Fc 영역의 천연 발생 대립유전자 변이체뿐 아니라, 치환, 부가 또는 결실을 야기하지만 효과기 기능(예를 들어, 항체-의존성 세포성 세포독성)을 매개하는 면역글로불린의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 변형을 갖는 변이체를 포함하는 것이다. 예를 들어, 1개 이상의 아미노산이 생물학적 기능의 실질적인 손실없이 면역글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다. 이러한 변이체들은 활성에 최소의 영향을 미치지 위해 당해 분야에 공지된 일반적인 규칙에 따라 선택될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-1310 (1990)] 참조).
- [0178] 용어 "**효과기 기능**"은 항체 이소타입에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물 활성을 말한다. 항체 효과기 기능의 예로는 다음이 포함된다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체-매개 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절, 및 B 세포 활성화.
- [0179] "**활성화 Fc 수용체**"는 항체의 Fc 영역에 의한 후속 결합이 효과기 기능을 수행하도록 수용체-함유 세포를 자극하는 신호전달 사건을 유도하는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체로는 Fc γ RIIIa(CD16a), Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32) 및 Fc α RI(CD89)가 포함된다. 특정한 활성화 Fc 수용체는 인간 Fc γ RIIIa(유니프록트 수탁번호 P08637(버전 141) 참조)이다.
- [0180] 용어 "**펩티드 링커**"는 1개 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개의 아미노산을 포함하는 펩티드를 말한다. 펩티드 링커는 당해 분야에 공지되어 있거나, 본원에 기술되어 있다. 적합한 비-면역원성 링커 펩티드는,

예를 들어, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 링커(여기서, "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 1 내지 4의 수, 특히 2이다), 즉, GGGGS(서열번호 129) GGGSGGGGS(서열번호 130), SGGGSGGGG(서열번호 131) 및 GGGSGGGGSGGGG(서열번호 132)로 구성되는 군으로부터 선택되지만, 서열 GSPGSSSSGS(서열번호 133), $(G_4S)_3$ (서열번호 134), $(G_4S)_4$ (서열번호 135), GSGSGSGS(서열번호 136), GSGSGNGS(서열번호 137), GSGSGSG(서열번호 138), GSGSG(서열번호 139), GGS(서열번호 140), GSGNGSG(서열번호 141), GNGSGSG(서열번호 142) 및 GNGSG(서열번호 143)도 포함한다. 특정 관심 펩티드 링커는 (G_4S) (서열번호 129), $(G_4S)_2$ 또는 GGGSGGGGS(서열번호 130), $(G_4S)_3$ (서열번호 134) 및 $(G_4S)_4$ (서열번호 135), 더욱 구체적으로는 $(G_4S)_2$ 또는 GGGSGGGGS(서열번호 130)이다

[0181] "융합된" 또는 "연결되는"은 구성성분들(예를 들어, 항원 결합 도메인 및 FC 도메인)이 펩티드 결합에 의해 직접적으로, 또는 1개 이상의 펩티드 링커에 의해 결합된 것을 의미한다.

[0182] 용어 "**아미노산**"은 본원에 사용되는 바와 같이 알라닌(3문자 코드: ala, 1문자 코드: A), 아르기닌(arg, R), 아스파라긴(asn, N), 아스파르트산(asp, D), 시스테인(cys, C), 글루타민(gln, Q), 글루탐산(glu, E), 글리신(gly, G), 히스티딘(his, H), 이소류신(ile, I), 류신(leu, L), 리신(lys, K), 메티오닌(met, M), 페닐알라닌(phe, F), 프롤린(pro, P), 세린(ser, S), 트레오닌(thr, T), 트립토판(trp, W), 티로신(tyr, Y) 및 발린(val, V)을 포함하는 천연 발생 카복시 α-아미노산의 군을 의미한다.

[0183] 기준 폴리펩티드(단백질) 서열과 관련하여 "**퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성**"은, 필요한 경우, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않고, 기준 폴리펩티드 서열중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열내 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN.SAWI 또는 메갈린(Megalign)(디엔에이스타(DNASTAR)) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여, 당해 분야의 기술에 속하는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 당업자라면 전장 길이 서열의 최대의 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 산출한다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 제작되었으며, 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C., 20559의 미국 저작권청에 사용자 문서와 함께 제출되었으며, 여기에 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코의 제넨테크 인코포레이티드로부터 공개적으로 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 유닉스 V4.0D를 비롯하여, 유닉스 작업 시스템 상에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며 변하지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 상기 서열 B와 비교해 또는 상기 서열 B에 대비해, 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(양자택일적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 상기 서열 B와 비교해 또는 상기 서열 B에 대비해 특정 % 아미노산 서열 동일성을 가지거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될수 있다)은 다음과 같이 산출된다:

[0184] $100 \times \frac{X}{Y}$

[0185] 이때, X는 A와 B의 상기 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 기록된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B 중의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 같지 않을 것이 인지될 것이다. 특별히 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 단락에서 기술된 바와 같이 수득된다.

[0186] 특정 양태에서, 본원에 제공된 발명의 이중특이적 항체의 **아미노산 서열 변이체**가 고려된다. 예를 들어, 이중특이적 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 성질을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 이중특이적 항체의 아미노산 서열 변이체는, 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 내에 적절한 변형을 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실, 및/또는 상기 서열내로의 잔기의 삽입 및/또는 상기 서열내에서의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 작제물이 목적하는 특성, 예를 들어, 항원-결합 특성을 가지면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 수행하여 최종 작제물을 수득할 수 있다. 치환적 돌연변이유발을 위한 목적 부위는 HVR 및 프레임워크(FR)를 포함한다. 보존적 치환을 "바람직한 치환"이란 제목 하에 표 B에 나타내었으며, 아미노산 측쇄 클래스 (1) 내지 (6)과 관련하여 하기에서 더 기

술된다. 아미노산 치환은 해당 분자 내에 도입될 수 있으며, 생성물들은 원하는 활성, 예를 들어, 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 선별될 수 있다.

표 B

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0187]

[0188]

아미노산은 공통적인 측쇄 성질에 따라 분류될 수 있다:

[0189]

(1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0190]

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0191]

(3) 산성: Asp, Glu;

[0192]

(4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0193]

(5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0194]

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0195]

비-보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 포함한다.

[0196]

용어 "아미노산 서열 변이체"는 모 항원 결합 분자(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 추가 변 영역 잔기들에 아미노산 치환이 존재하는 실질적인 변이체를 포함한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 수득된 변이체(들)는 모 항원 결합 분자에 비해 특정 생물학적 성질(예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에 변화(예를 들어, 개선)를 가지고/가지거나, 모 항원 결합 분자의 실질적으로 유지된 특정 생물학적 성질을 가질 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체로서, 이것은, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기를 돌연변이시키고 변이체 항원 결합 분자를 파지상에 표시하고 특정 생물 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 특정 구현예에서, 치환, 삽입 또는 결실은, 상기 변경들이 항원에 결합하는 항원 결합 분자의

능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 돌연변이유발에 표적이 될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085]에 기술된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 상기 방법에서는, 항체와 항원과의 상호작용이 영향을 받는지를 측정하기 위해 표적 잔기들(예를 들어, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 하전된 잔기들)의 잔기 또는 기를 확인하고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환시킨다. 초기 치환에 대해 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에 추가적인 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위한 항원-항체 결합 분자 복합체의 결정 구조. 상기 접촉 잔기 및 인접 잔기들은 치환 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 원하는 성질을 보유하는지를 판단하기 위해 변이체들을 스크리닝할 수 있다.

[0197] 아미노산 서열 삽입은, 길이가 1개 잔기로부터 100개 이상 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 및 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 이중특이적 항체가 포함된다. 상기 분자의 다른 삽입변이체는 이중특이적 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 N- 또는 C-말단으로의 융합을 포함한다.

[0198] 특정 양태에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체는, 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 변경된다. 상기 분자의 글리코실화 변이체는, 1개 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록, 예를 들어 Fc 도메인에 결합된 탄수화물이 변경될 수 있도록, 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수득될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는, 일반적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 N-결합에 의해 결합된, 분지된 바이안테너리(biantennary) 올리고사카라이드를 전형적으로 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 상기 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스 및 시알산뿐 아니라, 바이안테너리 올리고사카라이드 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 결합된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 특정한 개선된 성질을 갖는 변이체를 생성하기 위해 본 발명의 이중특이적 항체 중 올리고사카라이드의 변형이 수행될 수 있다. 일 양태에서, Fc 영역에 결합된(직접 또는 간접적으로) 푸코스가 결합된 탄수화물 구조를 갖는 이중특이적 항체의 변이체가 제공된다. 상기 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다(예를 들어, US 2003/0157108호(프레스타(Presta, L.)) 또는 US 2004/0093621호(교와 하코 코교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)) 참조). 본 발명의 이중특이적 항체의 또 다른 변이체는, 예를 들어, Fc 영역에 결합된 바이안테너리 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된 이등분 올리고사카라이드를 갖는 변이체를 포함한다. 상기 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다(예를 들어, WO 2003/011878호(Jean-Mairet et al.); US 6,602,684호(Umana et al.); 및 US 2005/0123546호(Umana et al.) 참조). Fc 영역에 결합된 올리고사카라이드에 1개 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 변이체도 제공된다. 상기 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있으며, 예를 들어, WO 1997/30087호(Patel et al.); WO 1998/58964호(Raju, S.); 및 WO 1999/22764호(Raju, S.)에 기술되어 있다.

[0199] 특정 양태에서, 분자의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된, 본 발명의 이중특이적 항체의 **시스테인 조작된 변이체**, 예를 들어, "티오Mab"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 구현예에서, 치환된 잔기는 분자의 접근가능한 부위에 존재한다. 상기 잔기들을 시스테인으로 치환시킴으로써, 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 위치되고, 항체를 다른 모이어티, 예를 들어, 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 하기 잔기들 중 임의의 하나 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205(카밧 넘버링); 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링). 시스테인 조작된 항원 결합 분자는, 예를 들어, 미국 특허공보 제7,521,541 호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0200] 특정 양태에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체는, 당해 분야에 공지되어 있고 용이하게 이용 가능한 추가의 비-단백성 모이어티를 함유하도록 더 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나, 이로 한정되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 프롤리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜 및 이의 혼합물이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 이의 수중 안정성으로 인해 제조시 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있으며, 분지되거나 분지되지 않을 수

있다. 항체에 결합되는 중합체의 수는 달라질 수 있으며, 하나보다 많은 중합체가 결합되는 경우, 이들은 같거나 다른 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은, 개선될 항체의 특정한 성질 또는 기능, 이중특이적 항체 유도체가 정의된 조건하에 치료에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이로 한정되지는 않는 고려사항들에 근거하여 결정될 수 있다.

[0201] 다른 양태에서, 방사선에 노출됨으로써 선택적으로 가열될 수 있는 항체와 비-단백성 모이어티의 접합체가 제공된다. 일 구현예에서, 비-단백성 모이어티는 탄소 나노튜브이다(Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). 방사선은 임의의 파장을 가질 수 있으며, 정상 세포에 유해하지 않으나 항체-비-단백성 모이어티에 근접한 세포가 사멸되는 온도까지 비-단백성 모이어티를 가열시키는 파장을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

[0202] "면역접합체"는 세포독성 약제를 비롯하여(이로 한정되지는 않는다) 하나 이상의 이중 분자에 접합된 항체이다.

[0203] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단리된 핵산 분자 또는 작제물, 예를 들어, 메신저 RNA(mRNA), 바이러스-유래 RNA 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 말한다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포다이에스터 결합 또는 비-통상적인 결합(예를 들어, 펩티드 핵산(PNA)에서 발견되는 바와 같은 아미드 결합)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산 분자"는 폴리뉴클레오티드에 존재하는 임의의 1개 이상의 핵산 절편, 예를 들어, DNA 또는 RNA 단편을 말한다.

[0204] "단리된" 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 그 천연 환경으로부터 분리된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의미하는 것이다. 예를 들어, 박테리에 함유된 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 목적을 위하여 단리된 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오티드의 또 다른 예는 이중 숙주 세포들내에 유지된 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 정상적으로 폴리뉴클레오티드 분자를 함유하는 세포에 함유된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하지만, 상기 폴리뉴클레오티드 분자는 염색체외에 존재하거나 이의 천연 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체뿐 아니라 양성 및 음성 가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성에 의해 생성된 이러한 분자들을 더 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결인자와 같은 조절 요소일 수 있거나 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0205] 본 발명의 기준 뉴클레오티드 서열과 적어도, 예를 들어, 95% "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드란, 폴리뉴클레오티드 서열이 기준 뉴클레오티드 서열의 각각의 100개 뉴클레오티드 당 5개 이하의 점 돌연변이를 포함할 수 있는 것을 제외하고 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 기준 서열과 동일한 것을 의미하는 것이다. 즉, 기준 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해, 기준 서열 중 뉴클레오티드의 5% 이하가 결실되거나 또 다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 기준 서열 중 총 뉴클레오티드의 5% 이하의 일부의 뉴클레오티드가 기준 서열 중에 삽입될 수 있다. 기준 서열의 이러한 변경은, 기준 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서, 또는 기준 서열 중 또는 기준 서열내 하나 이상의 인접 기들 중의 잔기들 사이에 개별적으로 배치된, 상기 말단 위치들 사이 어디에서나 일어날 수 있다. 실제적인 문제로서, 임의의 특정 폴리뉴클레오티드 서열이 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한지 여부는 통상적으로, 폴리펩티드에 대해 상기 논의한 것(예를 들어, ALIGN-2)과 같은 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다.

[0206] 용어 "발현 카세트"는 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 특정된 핵산 요소를 사용하여 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된 폴리뉴클레오티드를 말한다. 재조합 발현 카세트는 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 플라스미드 DNA, 바이러스 또는 핵산 단편내에 혼입될 수 있다. 전형적으로, 발현 벡터의 재조합 발현 카세트 부분은, 다른 서열들 중에서, 전사될 핵산 서열 및 프로모터를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 발현 카세트는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0207] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 "발현 작제물"과 동의어이며, 표적 세포에서 작동가능하게 결합되는 특정 유전자를 도입하고, 상기 유전자의 발현을 유도하기 위해 사용되는 DNA 분자를 말한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 벡터뿐 아니라, 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈내에 혼입된 벡터를 포함한다. 본 발명의 발현 벡터는 발현 카세트를 포함한다. 발현 벡터는 대량의 안정한 mRNA의 전사를 가능하게 한다. 일단 발현 벡터가 표적 세포 내부에 있으면, 상기 유전자에 의해 암호화되는 리보핵산 분자 또는 단백질은 세포 전사 및/또는 번역 절차에 의해 생성된다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

- [0208] 용어 "**숙주 세포**", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되며, 그 세포의 자손을 비롯하여, 외인성 핵산이 도입된 세포를 말한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하며, 이들은 1차 형질전환된 세포, 및 계대 수에 관계없이 그로부터 유도된 자손을 포함한다. 핵산 함량에 있어서 자손은 모세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 포함할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 바와 동일한 기능 또는 생물 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자를 생성하기 위해 사용될 수 있는 임의 유형의 세포 시스템이다. 특히, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 숙주 세포이다. 숙주 세포는 배양 세포, 예를 들어, 배양된 포유동물 세포, 예를 들어, 몇 가지만 들자면, CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및 식물 세포뿐 아니라, 몇 개만 예를 들자면, 유전자전이 동물, 유전자전이 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포를 포함한다.
- [0209] 약제의 "**유효량**"은 약제가 투여되는 세포 또는 조직에서 생리적 변화를 야기하기 위해 필요한 양을 말한다.
- [0210] 약제, 예를 들어, 약학 조성물의 "**치료 유효량**"은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위한 투여량에서 필요한 시간 동안 유효한 양을 말한다. 약제의 치료 유효량은, 예를 들어, 질환의 부작용을 제거하거나, 감소시키거나, 지연시키거나, 최소화시키거나, 방지한다.
- [0211] "**개체**" 또는 "대상"은 포유동물이다. 포유동물로는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예를 들어, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 특히, 개체 또는 대상은 인간이다.
- [0212] 용어 "**약학 조성물**"은, 그중에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이 되게 하는 그런 형태이면서, 제형이 투여될 대상에게 허용될 수 없을 정도로 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 말한다.
- [0213] "**약학적으로 허용되는 부형제**"는 대상에게 무독성인, 활성 성분 이외의 다른, 약학 조성물내 성분을 말한다. 약학적으로 허용되는 부형제로는 완충제, 안정화제 또는 방부제가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다.
- [0214] 용어 "**패키지 삽입물**"은 치료 제품의 적응증, 사용법, 투여량, 투여법, 병용 치료, 금기 및/또는 사용에 관한 경고에 대한 정보를 포함하는, 치료 제품의 상업적 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 말하기 위해 사용된다.
- [0215] 본원에서 사용된 "**치료**"(및 이의 문법적 변형, 예를 들어, "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료받는 개체의 자연적 과정을 변화시키기 위한 시도에서의 임상적 개입을 말하며, 예방을 위해 또는 임상 병리 과정동안 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과로는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 분자는 질환의 발병을 지연시키거나 질환의 진행을 지체시키기 위해 사용된다.
- [0216] 본원에서 사용된 용어 "**암**"은, 예를 들어, 이의 난치성 형태를 비롯하여, 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비-소세포 폐(NSCL)암, 기관지폐포 세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문암, 복부암, 위암, 대장암, 유방암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨(Hodgkin)병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 요관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중피종, 간세포암, 담관암, 중추 신경계(CNS) 종양, 척추 종양, 뇌간교세포종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 신경초종, 상의세포종, 수모세포종, 수막종, 편평세포 암종, 뇌하수체 선종 및 유잉(Ewing) 육종, 또는 상기 암들 중 하나 이상의 조합과 같은 증식성 질환을 말한다.
- [0217] **본 발명의 이중특이적 항체**
- [0218] 본 발명은 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 신규한 이중특이적 항체를 제공하며, 상기 항체는 생산성, 안정성, 결합 친화도, 생물학적 활성, 특정 T 세포의 특이적 표적화, 표적화 효능 및 감소된 독성과 같은 특히 유리한 특징을 가지고 있다.
- [0219] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 T 세포 표면에 결합할 때 감소된 내재화를 보인다. 상기 내재화는 표적화된 수용체가 TCR-신호를 저해하기 위한 준비가 되어 있는 세포-표면 상에 급속히 재

-발현을 하는 동안 수시간 내에 봉해될 수 있는 분자에 대한 중요한 싱크(sink)를 나타낸다. 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 Treg보다 우선적으로 통상적인 T 세포에 결합한다. 이러한 이중 특이적 항체는 이로운데, 그 이유는 항체를 차단함으로써 Treg에 LAG-3을 표적화하는 것이 Treg의 억제 기능을 증가시킴으로써 해로울 수 있고 결국에는 다른 T 세포에 대한 양성 차단 효과를 은폐하기 때문이다. 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 Treg 억제로부터 T 세포 효과기 기능을 구할 수 있다. 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 본원에서 제공된 분석에 나타낸 것처럼 종양 세포주 ARH77와 공배양 될 때, CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B 분비를 유도할 수 있다. 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 증가된 종양-특이적 T 세포 효과기 기능을 보이고/보이거나 T 세포의 세포독성 효과를 증진시킨다. 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 항체는 생체내 종양 퇴치의 증가를 보여준다.

[0220] **A. PD1 및 LAG3에 결합하는 예시적 이중특이적 항체**

[0221] 일 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

[0222] (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0223] (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

[0224] (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및

[0225] (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0226] (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0227] (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0228] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 IgG인 Fc 도메인, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고, 상기 Fc 도메인은 효과기 기능을 감소시켰거나 심지어 제거하였다. 특히, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0229] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 IgG인 Fc 도메인, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0230] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, LAG3에 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

[0231] (a) (i) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0232] (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

[0233] (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및

[0234] (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0235] (ii) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0236] (iii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,

[0237] (b) (i) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0238] (ii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

- [0239] (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0240] (i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0241] (ii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0242] (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0243] (c) (i) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0244] (ii) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0245] (iii) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0246] (i) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0247] (ii) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0248] (iii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0249] (d) (i) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0250] (ii) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0251] (iii) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0252] (i) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0253] (ii) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0254] (iii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0255] (e) (i) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0256] (ii) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0257] (iii) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0258] (i) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0259] (ii) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0260] (iii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0261] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은
- [0262] (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0263] (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0264] (c) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0265] (d) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0266] (e) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0267] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은
- [0268] (a) (i) 서열번호 80의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0269] (ii) 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

- [0270] (iii) 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0271] (i) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0272] (ii) 서열번호 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0273] (iii) 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0274] (b) (i) 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0275] (ii) 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0276] (iii) 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0277] (i) 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0278] (ii) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0279] (iii) 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0280] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은
- [0281] (a) 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0282] (b) 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0283] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0284] (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0285] (b) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0286] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0287] (d) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0288] (e) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0289] 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0290] (i) 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0291] (ii) 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0292] (iii) 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0293] (i) 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0294] (ii) 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0295] (iii) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0296] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

- [0297] (a) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0298] (b) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0299] (c) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0300] (d) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0301] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고,
- [0302] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,
- [0303] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0304] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0305] 또 다른 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0306] 다른 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0307] 또 다른 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0308] 또 다른 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0309] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 인간, 인간화, 또는 키메라 항체이다. 특히, 상기 항체는 인간화 또는 키메라 항체이다.
- [0310] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 2가 항체이다. 이것은 상기 이중특이적 항체가 PD1에 특이적으로 결합하

는 하나의 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인을 포함하는 것을 의미한다(1+1 포맷).

- [0311] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편을 포함한다. 특정 양태에서 상기 Fab 단편들 중 하나에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되어 VH 도메인이 경쇄의 일부이고 VL 도메인이 중쇄의 일부가 된다. 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편에서 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환된다.
- [0312] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는
- [0313] (a) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0314] 서열번호 97의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0315] (b) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0316] 서열번호 100의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0317] (c) 서열번호 102의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 104의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0318] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0319] (d) 서열번호 106의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 107의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0320] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.
- [0321] 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는
- [0322] (a) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0323] 서열번호 97의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0324] (b) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0325] 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0326] (c) 서열번호 102의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 104의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0327] 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0328] (d) 서열번호 106의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0329] 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.

- [0330] 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 100의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.
- [0331] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편 및 Fc 도메인의 C-말단에 융합되는 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편을 포함한다. 특히, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 단편은 그 단편의 VH 도메인을 통해 Fc 도메인의 C-말단에 융합된다(트랜스 1+1 포맷).
- [0332] 특정 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 144의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 144의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함한다.
- [0333] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제3 Fab 단편을 포함한다. 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다.
- [0334] 이 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 LAG3에 2가 결합이 있고 PD1에 1가 결합이 있는 3가이다. 이것은 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 것을 의미한다(2+1 포맷).
- [0335] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는
- [0336] (a) 서열번호 118의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0337] 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0338] (b) 서열번호 120의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0339] 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0340] (c) 서열번호 122의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0341] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0342] 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는
- [0343] (a) 서열번호 118의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 119의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0344] (b) 서열번호 120의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경

쇄, 또는

- [0345] (c) 서열번호 122의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0346] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제3 Fab 단편을 포함하며, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 Fab 단편들 중 하나는 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다(트랜스 2+1 포맷).
- [0347] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 145의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄, 서열번호 145의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0348] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 단일쇄 Fab(scFab)을 포함한다. 특히, 상기 scFab는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인을 포함하고 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합된다.
- [0349] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는
- [0350] (a) 서열번호 123의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0351] (b) 서열번호 124의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0352] (c) 서열번호 125의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.
- [0353] 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는
- [0354] (a) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 119의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0355] (b) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0356] (c) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0357] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로

결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 VH와 VL 도메인을 포함한다. 특히, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VH 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합되고, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VL 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 다른 하나의 C-말단에 융합된다.

- [0358] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 126의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 127의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 109의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다. 보다 구체적으로, 서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 127의 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 109의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0359] 또 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제3 Fab 단편, 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제4 Fab 단편을 포함한다.
- [0360] 이 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 LAG3에 2가 결합이 있고 PD1에 2가 결합이 있는 4가이다. 이는 상기 이중특이적 항체가 PD1에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함하는 것을 의미한다(2+2 포맷).
- [0361] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는
- [0362] (a) LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 2개의 Fab 단편을 포함하는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄, 및
- [0363] (b) PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 2개의 추가적인 Fab 단편을 포함하고, 상기 추가적인 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 (a)의 중쇄들의 C-말단에 각각 연결된다.
- [0364] 특정 양태에서, 상기 펩티드 링커는 (G₄S)₄이다. 다른 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 2개의 추가적인 Fab 단편은 교차 Fab 단편이고, 상기 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고 VL-CH 쇠는 펩티드 링커를 통해 (a)의 중쇄들의 C-말단에 각각 연결된다.
- [0365] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 각각은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 각각 융합된다.
- [0366] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는
- [0367] (a) 서열번호 114의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0368] (b) 서열번호 116의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0369] (c) 서열번호 117의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0370] 보다 구체적으로, 상기 이중특이적 항체는
- [0371] (a) 서열번호 114의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 101의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는

- [0372] (b) 서열번호 116의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 99의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0373] (c) 서열번호 117의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 105의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0374] **Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형**
- [0375] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키고, 효과기 기능을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.
- [0376] 특정 양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공된 항체의 Fc 영역 내로 유도될 수 있고, 그렇게 함으로써 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. 상기 Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.
- [0377] 다음 부분은 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자의 바람직한 양태를 기술한다. 일 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특히, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링)가 있는 인간 IgG1 하위 계열에 속한다.
- [0378] 상기 Fc 도메인은 표적 조직에서의 충분한 축적과 양호한 조직-혈액 분포율에 기여하는 긴 혈장반감기를 포함하여 본 발명의 이중특이적 항체에 유리한 약제학적 특성들을 부여한다. 그러나, 동시에, 상기 Fc 도메인은 바람직한 항원-함유 세포보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 대한 본 발명의 이중특이적 항체의 원하지 않는 표적화를 가져올 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서 본 발명의 이중특이적 항체의 Fc 도메인은, 천연 IgG Fc도메인, 특히, IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인과 비교할 때, Fc 수용체에 대한 감소된 결합 친화도 및/또는 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0379] 이러한 일 양태에서, Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)은 천연 IgG1 Fc도메인(또는 천연 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)과 비교할 때, 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 보다 더 바람직하게는 10% 미만, 가장 바람직하게는 5% 미만인 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 나타내고/나타내거나, 천연 IgG1 Fc 도메인(또는 천연 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)과 비교할 때, 50% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 보다 더 바람직하게는 10% 미만, 가장 바람직하게는 5% 미만인 효과기 기능을 나타낸다. 일 양태에서, 상기 Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)은 Fc 수용체에 실질적으로 결합하지 않고/않거나 효과기 기능을 유도하지 않는다. 특정 양태에서 상기 Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 일 양태에서, 상기 Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일 양태에서, 상기 Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 특정 양태에서, 상기 Fc 수용체는 활성화 인간 Fc γ 수용체이고, 보다 구체적으로는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa이고, 가장 구체적으로는 인간 Fc γ RIIIa이다. 일 양태에서 상기 Fc 수용체는 억제 Fc 수용체이다. 특정 양태에서, 상기 Fc 수용체는 억제 Fc 수용체이고, 보다 구체적으로는 인간 Fc γ RIIB이다. 일 양태에서 상기 효과기 기능은 하나 이상의 CDC, ADCC, ADCP, 및 사이토카인 분비이다. 특정 양태에서, 상기 효과기 기능은 ADCC이다. 일 양태에서, 천연 IgG1 Fc 도메인과 비교할 때, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대해 실질적으로 유사한 결합 친화도를 나타낸다. FcRn에 대한 실질적으로 유사한 결합은 Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)이 천연 IgG1 Fc 도메인(또는 천연 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)의 70% 초과, 구체적으로는 80% 초과, 보다 더 구체적으로는 90% 초과인 FcRn에 대한 결합 친화도를 나타낼 때 이루어진다.
- [0380] 특정 양태에서, 상기 Fc 도메인은 조작되지 않은 Fc 도메인과 비교할 때, Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 감소시키고/감소시키거나 효과기 기능을 감소시키도록 조작된다. 특정 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로 상기와 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 Fc 도메인의 2개의 아단위 각각에 존재한다. 일 양태에서, 상기 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를

감소시킨다. 다른 양태에서, 상기 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도를 적어도 2배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배 감소시킨다. 일 양태에서, 조작된 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자는 조작되지 않은 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체와 비교할 때, 20% 미만, 구체적으로는 10% 미만, 보다 더 구체적으로는 5% 미만인 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 나타낸다. 특정 양태에서 상기 Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 다른 양태에서 상기 Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일 양태에서 상기 Fc 수용체는 억제 Fc 수용체이다. 특정 양태에서, 상기 Fc 수용체는 억제 Fc 수용체이고, 보다 구체적으로는 인간 Fc γ RIIB이다. 일부 양태에서, 상기 Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 특정 양태에서, 상기 Fc 수용체는 활성화 인간 Fc γ 수용체이고, 보다 구체적으로는 Fc γ RIIIa, Fc γ RI 또는 Fc γ RIIa이고, 가장 구체적으로는 Fc γ RIIIa이다. 바람직하게는, 이들 수용체들 각각에 대한 결합이 감소한다. 일부 양태에서, 보체 구성성분에 대한 결합 친화도, 구체적으로는 C1q에 대한 결합 친화도도 감소한다. 일 양태에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 친화도는 감소하지 않는다. FcRn에 대한 실질적으로 유사한 결합, 즉 상기 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합 친화도의 보존이 Fc 도메인(또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)이 조작되지 않은 형태의 Fc 도메인(또는 상기 조작되지 않은 형태의 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자)의 약 70%를 초과한 FcRn에 대한 결합 친화도를 나타낼 때 이루어진다. 상기 Fc 도메인, 또는 상기 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자는 약 80% 초과 및 약 90%를 훨씬 초과한 친화도를 나타낼 수 있다. 다른 실시예들에서 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인은 조작되지 않은 형태의 Fc 도메인과 비교할 때 효과기 기능을 감소시키도록 조작된다. 상기 감소한 효과기 기능은, 이에 제한되지는 않지만, 하나 이상의 다음 항목들을 포함한다: 보체 의존성 세포독성(CDC) 감소, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 감소, 항체-의존성 세포 식작용(ADCP) 감소, 사이토카인 분비 감소, 항원-제시 세포에 의한 면역 복합체-매개 항원 흡수 감소, NK 세포에 대한 결합 감소, 마크로파지에 대한 결합 감소, 단핵구에 대한 결합 감소, 다형핵성 세포에 대한 결합 감소, 세포사멸을 유도하는 직접 신호 감소, 수지상 세포 성숙 감소, 또는 T 세포 프라이밍 감소.

[0381] 효과기 기능이 감소한 항체는 하나 이상의 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329의 치환이 일어나는 항체들을 포함한다(미국 특허 6,737,056호). 상기 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 알려진 위치로의 치환이 일어나는 이른바 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, 둘 이상의 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327에서 치환이 일어나는 Fc 돌연변이체들을 포함한다(미국 특허 7,332,581호). FcR에 대한 결합이 증진되거나 줄어든 특정 항체 변이체가 기술되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 6,737,056호; WO 2004/056312호, 및 문헌 [Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604]).

[0382] 본 발명의 일 양태에서, 상기 Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 양태에서, 상기 Fc 도메인은 L234A 및 L235A ("LALA") 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 일 구현예에서, 상기 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 일 양태에서, 상기 Fc 도메인은 P329 위치에서 아미노산 치환을 포함한다. 더 특정한 양태에서, 상기 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다. 일 구현예에서, 상기 Fc 도메인은 P329 위치에서 아미노산 치환 및 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S로 구성되는 군으로부터 선택된 또 다른 아미노산 치환을 포함한다. 더 특정한 구현예에서, 상기 Fc 도메인은 L234A, L235A 및 P329G ("P329G LALA") 아미노산 돌연변이를 포함한다. 아미노산 치환들의 "P329G LALA" 조합은, PCT 특허출원 WO 2012/130831 A1호에 기술된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc γ 수용체 결합을 거의 완벽하게 제거한다. 상기 문헌은 또한 이러한 돌연변이 Fc 도메인을 제조하는 방법 및 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능과 같은 상기 도메인의 특성들을 결정짓는 방법을 기술하고 있고, 상기 항체는 L234A 및 L235A의 돌연변이, 또는 L234A, L235A 및 P329G의 돌연변이가 있는 IgG1이다(카밧 등의 EU 인덱스에 따른 넘버링, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

[0383] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는(모든 위치는 카밧 EU 인덱스에 따름) (i) 선택적으로 P329G, L234A 및 L235A의 돌연변이가 있는 인간 IgG1 하위계열의 동중이량체 Fc-영역, 또는 (ii) 선택적으로 P329G, S228P 및 L235E의 돌연변이가 있는 인간 IgG1 하위계열의 동중이량체 Fc-영역, 또는 (iii) 선택적으로 P329G, L234A, L235A, I253A, H310A, 및 H435A의 돌연변이 또는 선택적으로 P329G, L234A, L235A, H310A, H433A, 및 Y436A의 돌연변이가 있는 인간 IgG1 하위계열의 동중이량체 Fc-영역, 또는 (iv) 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W와 Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 S354C를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함하는 이중이량체 Fc-영역, 또는 (v) 양쪽의 Fc-영역

폴리펩티드 모두가 돌연변이 P329G, L234A and L235A 를 포함하고 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W 를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W and Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 S354C를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함하는 인간 IgG1 하위계열의 이중이량체 Fc-영역을 포함한다.

[0384] 일 양태에서, 상기 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이다. 더 특정한 구현예에서, 상기 Fc 도메인은 S228(카뱃 넘버 링) 위치에서 아미노산 치환, 특히 S228P의 아미노산 치환을 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 더 특정한 구현예에서, 상기 Fc 도메인은 아미노산 치환 L235E, S228P, 및 P329G를 포함하는 IgG4 Fc 도메인이다. 상기 아미노산 치환은 IgG4 항체의 생체내 Fab 팔 교환을 감소시킨다(문헌[Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)] 참조). 따라서, 일 양태에서, (모든 위치는 카뱃 EU 인덱스에 따름) 인간 IgG1 서브클래스의 이중이량체 Fc-영역을 포함하는 이중특이적 항체가 제공되고, 양쪽의 Fc-영역 폴리펩티드 모두가 돌연변이 P329G, S228P 및 L235E를 포함하고, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A 및 Y407V를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W와 Y349C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V, 및 S354C를 포함하거나, 하나의 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366W 및 S354C를 포함하고, 다른 Fc-영역 폴리펩티드가 돌연변이 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함한다.

[0385] 반감기가 증가하고 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 결합이 증진된 항체는 태아에 대한 모 IgG의 전달(Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, and Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)을 권장하고 있으며, US 2005/0014934에 기술되어 있다. 상기 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 증진시키는, 그 안에 하나 이상의 치환이 있는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체들은 하나 이상의 Fc 영역 잔기에 치환이 있는 변이체들을 포함한다: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환(미국 특허 7,371,826호) 문헌 [Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740]; US 5,648,260호; US 5,624,821호; 및 Fc 영역 변이체들의 다른 실시예들에 관한 WO 94/29351호를 또한 참조한다.

[0386] Fc 수용체에 대한 결합은 예를 들어 ELISA, 또는 비아코어 기기(GE 헬스케어)와 같은 표준 장치를 사용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 쉽게 측정될 수 있고, 그러한 Fc 수용체는 재조합 발현에 의해 얻어질 수 있다. 적합한 이러한 결합 분석법이 본원에 기술되어 있다. 대안적으로, Fc 도메인 또는 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인을 포함하는 세포 활성화 이중특이적 항원 결합 분자의 결합 친화도는, 예를 들어 Fc γ IIIa 수용체를 발현하는 인간 NK 세포와 같이, 특정 Fc 수용체를 발현하는 것으로 알려진 세포주를 사용하여 평가될 수 있다. Fc 도메인, 또는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체의 효과기 기능은 본 기술 분야에서 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다. ADCC를 측정하기 위한 적합한 분석법이 본원에 기술되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 생체내 분석법의 다른 예들이 U.S. 특허 5,500,362호; 문헌[Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) 및 Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)]; U.S. 특허 5,821,337호; 문헌[Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)]에 기술되어 있다. 대안적으로, 비방사선 분석법이 사용될 수 있다(예를 들어, 유동 세포 분석법을 위한 ACTI™ 비방사선 세포독성 분석법 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비방사선 세포독성 분석법(Promega, Madison, WI) 참조). 그러한 분석법을 위해 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK)세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 목적하는 분자의 ADCC 활성은, 예를 들어 문헌[Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서, 생체내에서 평가될 수 있다.

[0387] 다음 단락은 Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 Fc 도메인 변형을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체의 바람직한 양태를 기술한다. 일 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, 상기 Fc 도메인이 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, 상기 Fc 도메인은 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 양태에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및

P329G(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)가 있는 인간 IgG1 하위계열에 속한다.

[0388]

이종이량체화를 촉진하는 Fc 도메인 변형

[0389]

본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자는 상이한 항원 결합 도메인을 포함하고, Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나 또는 다른 하나에 융합되어, Fc 도메인의 2개의 아단위는 2개의 비동종의 폴리펩티드 쇠에 포함될 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 제조합 공동-발현과 순차적 이량체화는 2개의 폴리펩티드의 가능한 조합 여러 개를 이끌어낸다. 제조합 생산에서 본 발명의 이종특이적 항체의 수율 및 순도를 증진하기 위해서는, 원하는 폴리펩티드의 결합을 촉진하는 변형을 본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인 속으로 유도하는 것이 유리할 것이다.

[0390]

따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이종특이적 항체에 관한 것으로, 상기 Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 결합을 촉진하는 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 아단위 사이에서 가장 넓은 단백질-단백질 상호작용의 자리는 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다. 따라서, 일 양태에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인에 있다.

[0391]

특정 양태에서 상기 변형은 소위 "눙-인투-홀" 변형이고, 상기 Fc 도메인의 두 개의 아단위 중 하나에 "눙" 변형을 포함하고, Fc 도메인의 두 개의 아단위 중 다른 하나에 "홀" 변형을 포함한다. 따라서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이종특이적 항체에 관한 것으로, 상기 눙-인투-홀 방법에 따라 Fc 도메인의 제1 아단위는 눙을 포함하고 Fc 도메인의 제2 아단위는 홀을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 Fc 도메인의 상기 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 상기 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0392]

상기 눙-인투-홀 기술은, 예를 들어, US 5,731,168호; US 7,695,936호; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기술되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 이종이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 저해하기 위해 돌출부가 공동에 위치할 수 있도록, 제1 폴리펩티드의 계면에 돌출부(눙) 및 제2 폴리펩티드의 계면에 상응하는 공동(홀)을 도입하는 것을 포함한다. 돌기는 상기 제1 폴리펩티드의 계면에서 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄로 치환함으로써 구축된다(예를 들어, 티로신 또는 트립토판). 상기 돌기에 대한 동등한 크기 또는 유사한 크기의 보상성 공동은 상기 제2 폴리펩티드의 계면에서 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄로 치환함으로써 생성된다(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌).

[0393]

따라서, 일 양태에서, 본 발명의 이종특이적 항원 결합 분자의 Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 보다 큰 측쇄 부피를 가지는 아미노산 잔기로 치환되고, 그에 의해 제2 아단위의 CH3 도메인 속 공동에 위치할 수 있는 제1 아단위의 도메인 속에서 돌기를 생성하고, Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인 속에서 아미노산 잔기는 보다 더 작은 측쇄 부피를 가지는 아미노산 잔기로 치환되고, 그에 의해 제1 아단위의 CH3 도메인 속 돌기가 위치할 수 있는 제2 아단위의 CH3 도메인 속에서 공동을 생성한다. 상기 돌기와 공동은 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 변경시킴으로써, 예를 들어 위치-특이성 돌연변이생성, 또는 펩티드 합성에 의해 만들 수 있다. 특정 양태에서, Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서 위치 366의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기(T366W)로 치환되고, Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서 위치 407의 티로신 잔기는 발린 잔기로 치환된다(Y407V). 일 양태에서, Fc 도메인의 제2 아단위에서 추가적으로 위치 366의 트레오닌 잔기는 세린 잔기(T366S)로 치환되고, 위치 368의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 치환된다(L368A).

[0394]

또 다른 양태에서, Fc도메인의 제1 아단위에서 추가적으로 위치 354의 세린 잔기는 시스테인 잔기(S354C)로 치환되고, Fc도메인의 제2 아단위에서 추가적으로 위치 349의 티로신 잔기는 시스테인 잔기로 치환된다(Y349C). 이 두 개의 시스테인 잔기의 도입은 Fc도메인의 두 개의 아단위 사이에 이황화 가교를 형성하고, 더 나아가 이량체를 안정화시킨다(Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). 특정 양태에서, 상기 Fc 도메인의 상기 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 상기 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S 및 Y407V(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다.

[0395]

그러나, 또한 EP 1 870 459호에 기술된 바와 같이, 다른 눙-인-홀 기술들이 대안적으로 또는 선택적으로 사용될 수 있다. 일 구현예에서 다중특이적 항체는 "눙 쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 R409D 및 K370E 및 "홀-쇄"의 CH3 도메인의 돌연변이 D399K 및 E357K를 포함한다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0396]

일 양태에서, 상기 이종특이적 항체는 "눙 쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 T366W, 및 "홀-쇄"의 CH3 도메인의 돌

연변이 T366S, L368A 및 Y407V, 및 추가적으로 "놉 쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 R409D 및 K370E, 및 "홀-쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 D399K 및 E357K를 포함한다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링).

- [0397] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인 중 하나의 돌연변이 Y349C와 T366W 및 2개의 CH3 도메인 중 다른 하나의 돌연변이 S354C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하고, 또는 다중특이적 항체가 2개의 CH3 도메인 중 하나의 돌연변이 Y349C와 T366W 및 2개의 CH3 도메인 중 다른 하나의 돌연변이 S354C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함하고, 추가로 "놉 쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 R409D 및 K370E, 및 "홀-쇠"의 CH3 도메인의 돌연변이 D399K 및 E357K를 포함한다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0398] 대안적인 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 결합을 촉진하는 변형은, 예를 들어 PCT 공개공보 WO 2009/089004호에 기술된 것처럼, 정전기 스티어링 효과를 매개하는 변형을 포함한다. 일반적으로 이러한 방법은 하전된 아미노산 잔기에 의한 2개의 Fc 도메인 아단위의 계면에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고 이에 동중이량체 형성은 정전기적으로는 유리하지 않게 되지만 이중이량체화는 정전기적으로 유리하게 된다.
- [0399] "놉-인투-홀 기술"과 별개로, 다중특이적 항체의 중쇄의 CH3 도메인을 변형하여 이중이량체화를 강화시키기 위한 기술들이 본 기술 분야에 알려져있다. 이러한 기술, 특히 WO 96/27011호, WO 98/050431호, EP 1870459호, WO 2007/110205호, WO 2007/147901호, WO 2009/089004호, WO 2010/129304호, WO 2011/90754호, WO 2011/143545호, WO 2012/058768호, WO 2013/157954호 및 WO 2013/096291호에 설명된 기술들이 본원에서 이중특이적 항체와 조합 시 "놉-인투-홀 기술"에 대한 대안으로서 고려된다.
- [0400] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체에 있어서 EP 1870459에 기술된 접근법이 상기 다중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 이러한 접근법은 제1 중쇄와 제2 중쇄 둘 사이의 CH3/CH3-도메인-계면에 특이적 아미노산 위치에서 반대 전하로 하전된 아미노산의 유도에 기초한다.
- [0401] 따라서, 이러한 양태에서, 다중특이적 항체의 4가 구조에서, 제1 중쇄의 CH3 도메인과 제2 중쇄의 CH3 도메인이 각각의 항체 CH3 도메인들 사이에 위치한 계면을 형성하고, 상기 제1 중쇄의 CH3 도메인의 아미노산 서열과 상기 제2 중쇄의 CH3 도메인의 아미노산 서열은 각각 상기 항체의 4가 구조에서 상기 계면 내에 위치한 한 세트의 아미노산을 포함하고, 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제1 아미노산은 양전하로 하전된 아미노산에 의해 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 계면에 위치한 아미노산 세트로부터 제2 아미노산은 음전하로 하전된 아미노산에 의해 치환된다. 이러한 양태에 따른 이중특이적 항체는 본원에서 또한 "CH3(+/-)-조작 이중특이적 항체"(약어인 "+/-" 는 각각의 CH3 도메인에 도입된 서로 반대로 하전된 아미노산을 나타낸다)로 지칭된다.
- [0402] 일 양태에서, CH3(+/-)-조작 이중특이적 항체에서, 양전하로 하전된 아미노산은 K, R 및 H로부터 선택되고, 음전하로 하전된 아미노산은 E 또는 D로부터 선택된다.
- [0403] 일 양태에서, CH3(+/-)-조작 이중특이적 항체에서 양전하로 하전된 아미노산은 K 및 R로부터 선택되고, 음전하로 하전된 아미노산은 E 또는 D로부터 선택된다.
- [0404] 일 양태에서, CH3(+/-)-조작 이중특이적 항체에서 양전하로 하전된 아미노산은 K이고, 음전하로 하전된 아미노산은 E이다.
- [0405] 일 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 Ch3(+/-)-조작 이중특이적 항체에서 위치 409의 아미노산 R이 D로 치환되고 위치의 아미노산 K가 E로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 399의 아미노산 D가 K로 치환되고, 위치 357의 아미노산 E가 K로 치환된다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0406] 일 양태에서, WO 2013/157953에 기술된 접근법이 상기 다중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 일 구현예에서 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 K로 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L이 D로 치환된다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링). 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 K로 치환되고 위치 351의 아미노산 L이 K로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L이 D로 치환된다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0407] 다른 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 K로 치환되고 위치 351의 아미노산 L이 K로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L이 D로 치환된다(카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링). 추가적으로, 다음의 치환 중 적어도 하나는 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서: 위치 349의 아미

노산 Y가 E로 치환되고, 위치 349의 아미노산 Y가 D로 치환되며, 위치 368의 아미노산 L이 E로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 일 구현예에서 위치 368의 아미노산 L이 E로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).

- [0408] 일 양태에서, WO 2012/058768호에 기술된 접근법이 상기 다중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 일 양태에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L이 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y가 A로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 A로 치환되고, 위치 409의 아미노산 K가 F로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 다른 구현예에서, 전술한 치환들에 추가적으로, 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 411(원래 T), 399(원래 D), 400(원래 S), 405(원래 F), 390(원래 N) 및 392(원래 K)의 아미노산들 중 적어도 하나가 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 바람직한 치환은 다음과 같다:
- [0409] - 위치 411의 N, R, Q, K, D, E 및 W로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 T의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링),
- [0410] - 위치 399의 R, W, Y, 및 K로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 D의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링),
- [0411] - 위치 400의 E, D, R 및 K로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 S의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링),
- [0412] - 위치 405의 I, M, T, S, V 및 W로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 F의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링),
- [0413] - 위치 390의 R, K 및 D로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 N의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링), 및
- [0414] - 위치 392의 V, M, R, L, F 및 E로부터 선택된 아미노산에 의한 아미노산 K의 치환(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링),
- [0415] 다른 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 WO 2012/058768호에 의하여 조작되고, 즉 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 351의 아미노산 L이 Y로 치환되고 위치 407의 아미노산 Y가 A로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 V로 치환되고, 위치 409의 아미노산 K가 F로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 상기 다중특이적 항체의 또 다른 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y가 A로 치환되며, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 A로 치환되고, 위치 409의 아미노산 K가 F로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 가장 마지막에 언급한 구현예에서, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 392의 아미노산 K가 E로 치환되고, 위치 411의 아미노산 T가 E로 치환되고, 위치 399의 아미노산 D가 R로 치환되고, 위치 400의 아미노산 S가 R로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0416] 일 양태에서, WO 2011/143545호에 기술된 접근법이 상기 다중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 일 양태에서, 중쇄 둘 모두의 CH3 도메인에서 아미노산 변형은 위치 368 및/또는 409에 도입된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0417] 일 양태에서, WO 2011/090762에 기술된 접근법이 상기 이중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. WO 2011/090762호는 "놉-인투-홀"(KiH) 기술에 따른 아미노산 변형에 관한 것이다. 일 구현예에서 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 W로 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y가 A로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 다른 구현예에서 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 366의 아미노산 T가 Y로 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 407의 아미노산 Y가 T로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0418] 일 양태에서, WO 2009/089004호에 기술된 접근법이 상기 이중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 일 구현예에서 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 392의 아미노산 K 또는 N이 음전하로 하전된 아미노산으로(일 구현예에서 E 또는 D로, 바람직한 일 구현예에서 D로) 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 399의 아미노산 D, 및 위치 356의 아미노산 E 또는 위치 357의 아미노산 E가 양전하로 하전된 아미노산으로 치환된다(일 구현예에서 K 또는 R로, 바람직한 일 구현예에서 K로, 바람직한 일 구현예에서 위치 399 또는 356의 아미노산이 K로 치환된다)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 또 다른 일 구현예에서, 전술한 치환들에 추가적으로, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 409의 아미노산 K 또는 R이 음전

하로 하전된 아미노산으로(일 구현예에서 E 또는 D로, 바람직한 일 구현예에서 D로) 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 또 다른 일 양태에서, 전술한 치환들에 추가적으로 또는 대안적으로, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 439의 아미노산 K 및/또는 위치 370의 아미노산 K가 음전하로 하전된 아미노산으로(일 구현예에서 E 또는 D로, 바람직한 일 구현예에서 D로) 서로 독립적으로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0419] 일 양태에서, WO 2007/147901에 기술된 접근법이 상기 다중특이적 항체의 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이중이량체화를 지원하기 위해 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 253의 아미노산 K가 E로 치환되고, 위치 282의 아미노산 D가 K로 치환되며, 위치 322의 아미노산 K가 D로 치환되고, 다른 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 위치 239의 아미노산 D가 K로 치환되고, 위치 240의 아미노산 E가 K로 치환되며, 위치 292의 아미노산 K가 D로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0420] 본원에서 보고된 것처럼 상기 이중특이적 항체에서 중쇄의 C-말단은 아미노산 잔기 PGK가 있는 완벽한 C-말단 엔딩이 될 수 있다. 상기 중쇄의 C-말단은 1개 또는 2개의 C-말단 아미노산 잔기들이 제거된 짧아진 C-말단일 수 있다. 바람직한 일 양태에서, 상기 중쇄의 C-말단은 짧아진 C-말단 엔딩 PG이다.

[0421] 본원에서 보고된 모든 양태 중 일 양태에서, 본원에서 특정된 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체는 C-말단 글리신-리신 디펩티드를 포함한다(G446 및 K447, 카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링). 본원에서 보고된 모든 양태 중 일 양태에서, 본원에서 특정된 C-말단 CH3 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체는 C-말단 글리신 잔기를 포함한다(G446, 카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).

[0422] **Fab 도메인에서의 변형**

[0423] 일 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 단편과 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, 상기 Fab 단편 중 하나에서 가변 도메인 VH 및 VL 또는 불변 도메인 CH1 및 CL 중의 하나가 교환된다. 상기 이중특이적 항체는 Crossmab 기술에 의해서 준비된다.

[0424] 하나의 결합 팔에서 도메인 치환/교환이 있는(CrossMabVH-VL 또는 CrossMabCH-CL) 다중특이적 항체는 WO2009/080252호, WO2009/080253호 및 문헌[Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191]에 상세히 기술되어 있다. 상기 항체는 제2 항원에 대한 잘못된 중쇄가 있는 제1 항원에 대한 경쇄의 mismatch에 의해 생성된 부산물을 (이러한 도메인 교환이 없는 접근법에 비해) 분명히 감소시킨다.

[0425] 특정 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 단편과 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, Fab 단편 중 하나에서 가변 도메인 VL과 VH가 서로 치환되어 VH 도메인이 경쇄의 일부이고 VL 도메인이 중쇄의 일부가 된다. 특정 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편에서 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되는 항체이다.

[0426] 다른 양태에서, 정확한 페어링을 보다 더 증진하기 위해, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 단편과 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체는 다른 하전된 아미노산 치환(소위 "하전된 잔기")을 함유한다. 이러한 변형은 교차 또는 비교자 CH1 및 CL 도메인에 도입된다. 이러한 변형은, 예를 들어 WO2015/150447호, WO2016/020309호 및 PCT/EP2016/073408호에 기술되어 있다.

[0427] 특정 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 단편과 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, 불변 도메인 CL의 Fab 단편 중 하나에 있어서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되고, 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환된다. 특정 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 TIM3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제2 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되고, 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되는 항체이다.

[0428] 특정 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 Fab 단편과 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것으로, CL도메인 중 하나에서, 위치 123(EU 넘버링)의 아미노산이 아르기닌(R)으로 치환되었고, 위치 124(EU 넘버링)의 아미노산이 리신(K)으로 치환되었으며, CH1 도메인 중 하나에서, 위치 147(EU 넘버링)과 위치 213(EU 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E)으로 치환되었다. 특정 양태에서, 상기 이중특이적 항체는, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편에서, 위치

123(EU 넘버링)의 아미노산이 아르기닌(R)으로 치환되었고, 위치 124(EU 넘버링)의 아미노산이 리신(K)으로 치환되었으며, CH1 도메인 중 하나에서, 위치 147(EU 넘버링)과 위치 213(EU 넘버링)의 아미노산이 글루탐산(E)으로 치환되었다.

- [0429] 또 다른 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0430] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및
- [0431] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 2가 항체이고, 상기 제2 경쇄 및 상기 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환된다.
- [0432] a) 조건하의 상기 항체는 b) 조건하에서 보고된 변형을 포함하지 않고 a) 조건하의 상기 중쇄와 상기 경쇄는 단리된 쇄들이다.
- [0433] b) 조건하의 상기 항체에서 경쇄 내에서 상기 가변 경쇄 도메인 VL은 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH로 치환되고, 중쇄 내에서 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL로 치환된다.
- [0434] 일 양태에서, (i) a) 조건하의 상기 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124(카밧에 따른 넘버링)의 아미노산이 양전하로 하전된 아미노산으로 치환되고, a) 조건하의 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 음전하로 하전된 아미노산으로 치환되고, 또는 (ii) b) 조건하의 상기 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124(카밧에 따른 넘버링)의 아미노산이 양전하로 하전된 아미노산으로 치환되고, b) 조건하의 상기 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산이 음전하로 하전된 아미노산으로 치환된다.
- [0435] 다른 양태에서 (i) a) 조건하의 상기 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되고(바람직한 일 구현예에서, 리신(K), 아르기닌(R)으로 독립적으로 치환), a) 조건하의 상기 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되며, 또는 (ii) b) 조건하의 상기 제2 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)(카밧에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환되고(바람직한 일 구현예에서, 리신(K), 아르기닌(R)으로 독립적으로 치환), b) 조건하의 상기 제2 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147의 아미노산 또는 위치 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)으로 독립적으로 치환된다.
- [0436] 일 양태에서, 상기 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)로 치환된다.
- [0437] 일 양태에서, 상기 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 123의 아미노산이 R로 치환되고, 위치 124의 아미노산이 K(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)로 치환된다.
- [0438] 일 양태에서, 상기 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)로 치환된다.
- [0439] 일 양태에서, 상기 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K로 치환되고, 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)로 치환된다.
- [0440] 일 양태에서, 상기 제1 경쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 123의 아미노산이 R로 치환되고, 위치 124의 아미노산이 K로 치환되며, 제1 중쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링)로 치환된다.
- [0441] 일 양태에서, 상기 제2 중쇄의 불변 도메인 CL에서 위치 124 및 123의 아미노산이 K로 치환되고, 상기 제2 경쇄의 불변 도메인 CH1에서 위치 147 및 213의 아미노산이 E로 치환되며, 상기 제1 경쇄의 가변 도메인 VL에서 위치 38의 아미노산이 K로 치환되고, 상기 제1 중쇄의 가변 도메인 VH에서 위치 39의 아미노산이 E로 치환되며, 상기 제2 중쇄의 가변 도메인 VL에서 위치 38의 아미노산이 K로 치환되고, 상기 제2 경쇄의 가변 도메인 VH에서 위치 39의 아미노산이 E로 치환된다(카밧 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0442] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0443] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및
- [0444] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 2가 항체이며, 상기 제2 경쇄 및

상기 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고, 제2 경쇄 및 제2 중쇄의 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환된다.

- [0445] a) 조건하의 상기 항체는 b) 조건하에서 보고된 변형을 포함하지 않고, a) 조건하의 상기 중쇄와 상기 경쇄는 단리된 채들이다. b) 조건하의 상기 항체에서, 경쇄 내에서 상기 가변 경쇄 도메인 VL은 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH로 치환되고, 상기 불변 경쇄 도메인 CL은 상기 항체의 불변 중쇄 도메인 CH1로 치환되며; 중쇄 내에서 상기 가변 중쇄 도메인 VH는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL로 치환되고, 상기 불변 중쇄 도메인 CH1은 상기 항체의 불변 경쇄 도메인 CL로 치환된다.
- [0446] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0447] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및
- [0448] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 제2 경쇄 및 제2 중쇄를 포함하는 2가 항체이고, 상기 제2 경쇄 및 상기 제2 중쇄의 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환된다.
- [0449] a) 조건하의 상기 항체는 b) 조건하에서 보고된 변형을 포함하지 않고 a) 조건하의 상기 중쇄와 상기 경쇄는 단리된 채들이다. b) 조건하의 상기 항체에서 경쇄 내에서 상기 불변 경쇄 도메인 CL은 상기 항체의 불변 중쇄 도메인 CH1로 치환되고; 중쇄 내에서 상기 불변 중쇄 도메인 CH1은 상기 항체의 불변 경쇄 도메인 CL로 치환된다.
- [0450] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0451] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄와 2개의 항체 경쇄로 구성되는 전장 항체, 및
- [0452] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 1, 2, 3 또는 4개의 단일쇄 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체이고,
- [0453] b) 조건하의 상기 단일쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C- 또는 N-말단에서 펩티드 링커를 통해 a) 조건하의 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0454] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab 단편이 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0455] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab(scFab) 단편이 전장 항체의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0456] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 1 또는 2개의 동일한 단일쇄 Fab(scFab) 단편이 전장 항체의 경쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0457] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab(scFab) 단편이 전장 항체의 각각의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0458] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab(scFab) 단편이 전장 항체의 각각의 중쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0459] 일 양태에서, 제2 항원에 결합하는 2개의 동일한 단일쇄 Fab(scFab) 단편이 전장 항체의 각각의 경쇄의 C-말단에서 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체에 융합된다.
- [0460] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0461] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄와 2개의 항체 경쇄로 구성되는 전장 항체,
- [0462] b) ba) 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 또는
- [0463] bb) 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 불변 도메인 1 (CH1)로 구성되는 제1 폴리펩티드(상기 제1 폴리펩티드는 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체의 2개 중쇄 중 하나의 C-말단에 상기 항체의 VH 도메인의 N-말단과 융합됨),
- [0464] c) ca) 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 또는
- [0465] cb) 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성되는 제2 폴리펩티드(상기 제2 폴리펩티드는 펩티드 링커를 통해 상기 전장 항체의 2개 중쇄 중 다른 하나의 C-말단에 상기 VL 도메인의 N-말단과 융합됨)

- [0466] 를 포함하는 3가 항체이며,
- [0467] 상기 제1 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 제2 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)은 함께 제2 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 형성한다.
- [0468] 일 양태에서, b) 조건하의 상기 폴리펩티드의 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 c) 조건하의 상기 폴리펩티드의 항체 경쇄 가변 도메인(VL)은 다음 위치들 사이에 이황화 결합의 도입에 의한 쇠들간 이황화 가교를 통해 연결되어 안정화된다:
- [0469] (i) 중쇄 가변 도메인 위치 44 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100, 또는
- [0470] (ii) 중쇄 가변 도메인 위치 105 내지 경쇄 가변 도메인 위치 43, 또는
- [0471] (iii) 중쇄 가변 도메인 위치 101 내지 경쇄 가변 도메인 위치 100(항상 카뎀 EU 인덱스에 따른 넘버링).
- [0472] 안정화를 위한 비천연적 이황화 가교를 도입하는 기술은 예를 들어 WO 94/029350호, 문헌[Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-1459]; 문헌[Kobayashi, H., et al., Nucl. Med. Biol. 25 (1998) 387-393]; 및 문헌[Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721]에 기술되어 있다. 일 구현예에서 b) 및 c) 조건하에서 상기 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 선택적인 이황화 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 44와 경쇄 가변 도메인 위치 100 사이에 있다. 일 구현예에서 b) 및 c) 조건하에서 상기 폴리펩티드의 가변 도메인 사이의 선택적인 이황화 결합은 중쇄 가변 도메인 위치 105와 경쇄 가변 도메인 위치 43 사이에 있다(항상 카뎀 EU 인덱스에 따른 넘버링). 일 구현예에서, 상기 단일쇄 Fab 단편의 가변 도메인 VH 및 VL 사이에서 선택적인 이황화 결합의 안정화가 결여된 3가인 이중특이적 항체가 바람직하다.
- [0473] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는 삼중특이적 또는 사중특이적 항체로서,
- [0474] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제1 경쇄 및 제1 중쇄, 및
- [0475] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 제2 (변형된) 경쇄 및 제2 (변형된) 중쇄를 포함하며, 상기 가변 도메인 VH 및 VL이 서로 치환되고/되거나 상기 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되고,
- [0476] c) 1개 또는 2개의 또 다른 항원(즉, 제3 및/또는 제4 항원)에 특이적으로 결합하는 1개 내지 4개의 항원 결합 도메인은 펩티드 링커를 통해 a) 및/또는 b)의 경쇄 또는 중쇄의 C- 또는 N-말단에 융합된다.
- [0477] a) 조건하의 상기 항체는 b) 조건하에서 보고된 변형을 포함하지 않고 a) 조건하의 상기 중쇄와 상기 경쇄는 단리된 쇠들이다.
- [0478] 일 양태에서, 상기 삼중특이적 또는 사중특이적 항체는 c) 조건하에서 1개 또는 2개의 또 다른 항원에 특이적으로 결합하는 1개 또는 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0479] 일 양태에서, 상기 항원 결합 도메인은 scFv 단편 및 scFab 단편의 군에서 선택된다.
- [0480] 일 양태에서, 상기 항원 결합 도메인은 scFv 단편이다.
- [0481] 일 양태에서, 상기 항원 결합 도메인은 scFab 단편이다.
- [0482] 일 양태에서, 상기 항원 결합 도메인은 a) 및/또는 b)의 중쇄의 C- 말단에 융합된다.
- [0483] 일 양태에서, 상기 삼중특이적 또는 사중특이적 항체는 c) 조건하에서 1개의 또 다른 항원에 특이적으로 결합하는 1개 또는 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0484] 일 양태에서, 상기 삼중특이적 또는 사중특이적 항체는 c) 조건하에서 제3 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 동일한 항원 결합 도메인을 포함한다. 바람직한 일 구현예에서 이러한 2개의 동일한 항원 결합 도메인은 펩티드 링커를 통해 a) 및/또는 b)의 중쇄의 C- 말단에 융합된다. 바람직한 일 구현예에서 2개의 동일한 항원 결합 도메인은 scFv 단편 및 scFab 단편 중 하나이다.
- [0485] 일 양태에서, 상기 삼중특이적 또는 사중특이적 항체는 c) 조건하에서 제3 및 제4 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일 구현예에서 상기 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 펩티드 커넥터를 통해 a) 및 b)의 중쇄의 C- 말단에 융합된다. 바람직한 일 구현예에서 상기 2개의 항원 결합 도메인은 scFv 단편 및 scFab 단편 중 하나이다.
- [0486] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는

- [0487] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 2개의 경쇄와 2개의 중쇄(및 2개의 Fab 단편을 포함함),
- [0488] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 추가적인 Fab 단편들을 포함하는 이중특이적 및 사중특이적 항체이고, 상기 추가적인 Fab 단편들은 둘 다 펩티드 링커를 통해 a)의 중쇄의 C-또는 N-말단 중 하나에 융합되며,
- [0489] 상기 Fab 단편에서 다음 변형들이 수행되었다.
- [0490] (i) a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 또는 b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되거나,
- [0491] (ii) a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되고, b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고/되거나 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되거나,
- [0492] (iii) a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되고, b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고/되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되거나,
- [0493] (iv) a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고, b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되거나,
- [0494] (v) a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환되고, b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환된다.
- [0495] 일 양태에서, 상기 추가적인 Fab 단편은 둘 다 펩티드 링커를 통해 a)의 중쇄의 C-말단 또는 a)의 중쇄의 N-말단 중의 하나에 융합된다.
- [0496] 일 양태에서, 상기 추가적인 Fab 단편은 둘 다 펩티드 링커를 통해 a)의 중쇄의 C-말단 중의 하나에 융합된다.
- [0497] 일 양태에서, 상기 추가적인 Fab 단편은 둘 다 펩티드 링커를 통해 a)의 중쇄의 N-말단 중의 하나에 융합된다.
- [0498] 일 양태에서, 상기 Fab 단편들에서 다음 변형들이 수행된다: a)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 또는 b)의 2개의 Fab 단편 모두에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되고/되거나, 불변 도메인 CL 및 CH1이 서로 치환된다.
- [0499] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는:
- [0500] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CH1 도메인 쌍을 포함하는 제1 항체의 (변형된) 중쇄로서, 상기 제1 항체의 제2 VH-CH1 도메인 쌍의 N-말단이 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합되는, 중쇄,
- [0501] b) a)의 상기 제1 항체의 2개의 경쇄,
- [0502] c) 제2 항원에 특이적으로 결합하고 제1 VH-CL 도메인 쌍을 포함하는 제2 항체의 (변형된) 중쇄로서, 상기 제2 항체의 제2 VH-CL 도메인 쌍의 N-말단이 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄의 C-말단에 융합되는 중쇄, 및
- [0503] d) 각각 CL-CH1 도메인 쌍을 포함하는 c)의 상기 제2 항체의 2개의 (변형된)경쇄를 포함하는 4가 항체이다.
- [0504] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0505] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄, 및
- [0506] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 N-말단은 펩티드 링커를 통해 상기 경쇄의 C-말단에 연결된다.
- [0507] a) 조건하의 상기 항체는 b) 조건하에서 보고된 변형을 포함하지 않고 상기 중쇄와 상기 경쇄는 단리된 쇄들이다.
- [0508] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는
- [0509] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄와 2개의 항체 경쇄로 구성되는 전장 항체, 및
- [0510] b) VH2 도메인 및 VL2 도메인을 포함하는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 Fv 단편을 포함하되, 상기 2개의 도메인은 이황화 가교를 통해 서로 연결되고,
- [0511] VH2 도메인 또는 VL2 도메인 중 하나만이 펩티드 링커를 통해 제1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 전장 항체

의 중쇄 또는 경쇄에 융합된다.

- [0512] 상기 이중특이적 항체에서, a) 조건하의 상기 중쇄 및 경쇄는 단리된 쇠들이다.
- [0513] 일 양태에서, VH2 도메인 또는 VL2 도메인 중 다른 하나는 펩티드 링커를 통해 제1 항원에 특이적으로 결합하는 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄에 융합되지 않는다.
- [0514] 본원에서 보고된 모든 양태에서 상기 제1 경쇄는 VL 도메인과 CL 도메인을 포함하고 제1 중쇄는 VH 도메인, CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.
- [0515] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0516] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 Fab 단편,
- [0517] b) 상기 CH1 및 상기 CL 도메인이 서로 교환되는, 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 교차Fab 단편,
- [0518] c) 제1 Fc-영역 중쇄와 제2 Fc-영역 중쇄를 포함하는 하나의 Fc-영역을 포함하는 3가 항체이고,
- [0519] 상기 2개의 Fab 단편의 CH1 도메인의 C-말단이 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 N-말단에 연결되고, 상기 교차Fab 단편의 CL 도메인의 C-말단이 상기 Fab 단편 중 하나의 VH 도메인의 N-말단에 연결된다.
- [0520] 일 양태에서, 상기 이중특이적 항체는
- [0521] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 Fab 단편,
- [0522] b) 상기 CH1 및 상기 CL 도메인이 서로 교환되는, 제2 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 교차Fab 단편,
- [0523] c) 제1 Fc-영역 중쇄와 제2 Fc-영역 중쇄를 포함하는 하나의 Fc-영역을 포함하는 3가 항체이고,
- [0524] 제1 Fab 단편의 CH1 도메인의 C-말단이 중쇄 Fc-영역 폴리펩티드의 N-말단에 연결되고, 상기 교차Fab 단편의 CL-도메인의 C-말단이 상기 Fab 단편 중 다른 하나의 VH 도메인의 N-말단에 연결되며, 제2 Fab 단편의 CH1 도메인의 C-말단이 제1 Fab 단편의 VH 도메인의 N-말단에 또는 상기 교차Fab 단편의 VH 도메인의 N-말단에 연결된다.
- [0525] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는
- [0526] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄와 2개의 항체 경쇄로 구성되는 전장 항체, 및
- [0527] b) 중쇄 단편과 경쇄 단편을 포함하는 VH2 도메인과 VL2 도메인을 포함하는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 Fab 단편을 포함하고, 상기 경쇄 단편 내부의 상기 가변 경쇄 도메인 VL2는 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VL2로 치환되고, 상기 중쇄 단편 내부의 상기 가변 중쇄 도메인 VH2는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL2로 치환되고,
- [0528] 상기 중쇄 Fab 단편은 상기 전장 항체의 중쇄들 중 하나의 CH1 도메인과 상기 전장 항체의 각각의 Fc-영역 사이에 삽입되며, 상기 경쇄 Fab 단편의 N-말단은 상기 중쇄 Fab 단편이 삽입되어 있는 상기 전장 항체의 중쇄와 쌍을 이루는 상기 전장 항체의 경쇄의 C-말단에 접합된다.
- [0529] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는
- [0530] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하고 2개의 항체 중쇄와 2개의 항체 경쇄로 구성되는 전장 항체, 및
- [0531] b) 중쇄 단편과 경쇄 단편을 포함하는 VH2 도메인과 VL2 도메인을 포함하는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 Fab 단편을 포함하고, 상기 경쇄 단편 내에서 상기 가변 경쇄 도메인 VL2는 상기 항체의 가변 중쇄 도메인 VH2로 치환되고, 상기 중쇄 단편 내에서 상기 가변 중쇄 도메인 VH2는 상기 항체의 가변 경쇄 도메인 VL2로 치환되며, 상기 Fab 단편의 중쇄 단편의 C-말단이 상기 전장 항체의 중쇄들 중 하나의 N-말단에 접합되고, 상기 Fab 단편의 경쇄 단편의 C-말단이 상기 Fab 단편의 중쇄 단편이 접합되는 상기 전장 항체의 중쇄와 쌍을 이루는 상기 전장 항체의 경쇄의 N-말단에 접합된다.
- [0532] **폴리뉴클레오티드**
- [0533] 본 발명은 더 나아가 본원에서 기술된 이중특이적 항체 또는 그의 단편을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0534] 용어 "핵산 분자" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드의 폴리머를 포함하는 임의의 화합물 및/또는 물질을 포함한다. 각 뉴클레오티드는 염기, 구체적으로 퓨린- 또는 피리미딘 염기(즉, 사이토신(C), 구아닌(G), 아데닌

(A), 티민(T) 또는 우라실(U), 당(즉, 데옥시리보스 또는 리보스), 및 인산염기로 구성된다. 흔히, 상기 핵산 분자는 염기 서열에 의해 기술되고, 상기 염기는 핵산 분자의 일차 구조(선형 구조)를 나타낸다. 상기 염기 서열은 5'에서 3' 방향으로 전형적으로 나타낸다. 본원에서, 용어 핵산 분자는 데옥시리보핵산(DNA)을 포함하며, 예를 들어, 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA, 리보핵산(RNA), 특히 메신저 RNA(mRNA), DNA 또는 RNA의 합성형, 및 2개 이상의 상기 분자를 포함하는 혼합 폴리머를 포함한다. 상기 핵산 분자는 선형이나 환형이다. 또한, 용어 핵산 분자는 센스 및 안티센스 가닥 모두와, 단일 가닥 및 이중 가닥 형태도 포함한다. 더욱이, 본원에 기술된 핵산 분자는 천연 발생 또는 비천연 발생 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 비천연 발생 뉴클레오티드의 예는 유도 당 또는 인산염 골격 연결 또는 화학적 변형 잔기가 있는 변형된 뉴클레오티드 염기를 포함한다. 핵산 분자는 또한 본 발명의 항체의 시험관내 및/또는 생체내, 예를 들어 숙주나 환자에서, 직접 발현을 위한 벡터로서 적합한 DNA 및 RNA 분자를 포함한다. 이러한 DNA(예를 들어, cDNA) 또는 RNA(예를 들어, mRNA) 벡터는 변형되지 않거나 변형될 수 있다. 예를 들어, mRNA는 RNA 벡터의 안정성 및/또는 암호화된 분자의 발현을 증진시키기 위해 화학적으로 변형될 수 있어서 mRNA는 생체내 항체를 생성하는 대상 내로 주입될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Stadler et al, Nature Medicine 2017, published online 12 June 2017, doi:10.1038/nm.4356] 또는 EP 2 101 823 B1호 참조).

[0535] "단리된" 폴리뉴클레오티드는 그의 천연 환경의 구성성분으로부터 분리된 핵산 분자를 말한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 보통 핵산 분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에서 또는 그의 천연 염색체 위치와 다른 염색체 위치에 존재한다.

[0536] 본 발명의 이중특이적 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 전체 항원 결합 분자를 암호화하는 단일 폴리뉴클레오티드 또는 공동-발현된 복수(예를 들어, 2개 이상)의 폴리뉴클레오티드로서 발현될 수 있다. 공동-발현된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는, 예를 들어 이항화 결합이나 기능적 항원 결합 분자를 형성하는 다른 수단을 통하여 결합할 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린의 경쇄 부분은 면역글로불린의 중쇄 부분에서 분리한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있다. 공동-발현될 때, 상기 중쇄 폴리펩티드는 면역글로불린을 형성하기 위한 경쇄 폴리펩티드와 결합할 것이다.

[0537] 일부 양태에서, 본원에서 기술된 것처럼 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 포함된 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 암호화한다.

[0538] 일 양태에서, 본 발명은 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인과 림프구 활성화 유전자-3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 지시되고, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및 (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0539] **B. 재조합 방법**

[0540] 항체는, 예를 들어 US 4,816,567호에 기술된 바와 같이, 재조합 방법 및 조성물을 이용하여 생산될 수 있다. 이 방법을 위해, 항체를 암호화하는 하나 이상의 단리된 핵산(들)이 제공된다.

[0541] 천연 항체 또는 천연 항체 단편의 경우에 2개의 핵산, 즉 경쇄 또는 그의 단편을 위한 핵산 및 중쇄 또는 그의 단편을 위한 핵산이 요구된다. 이러한 핵산(들)은 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄(들))를 포함하는 아미노산 서열을 암호화한다. 이들 핵산은 동일한 발현 벡터 상에 또는 다른 발현 벡터 상에 있을 수 있다. 이중이량체 중쇄가 있는 특정 이중특이적 항체의 경우에 4개의 핵산, 즉 제1 경쇄를 위한 핵산, 제1 이중단량체의 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 제1 중쇄를 위한 핵산, 제2 경쇄를 위한 핵산, 제2 이중단량체의 Fc-영역 폴리펩티드를 포함하는 제2 중쇄를 위한 핵산이 요구된다. 상기 4개의 핵산은 하나 이상의 핵산 분자 또는 발현 벡터에 포함될 수 있다. 예를 들어, 이러한 핵산(들)은 제1 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 제1 이중단량체의 Fc-영역을 포함하는 제1 VH를 포함하는 아미노산 서열 및/또는 제2 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 상기 항체의 제2 이중단량체의 Fc-영역을 포함하는 제2 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화한다(예를 들어, 항체의 제1 및/또는 제2 경쇄 및/또는 제1 및/또는 제2 중쇄(들)). 이들 핵산은 동일한 발현 벡터 상에 또는 다른 발현 벡터 상에 있을 수 있으며, 보통 이 핵산이 2개 또는 3개의 발현 벡터 상에 위치할 수 있다. 즉, 하나의 벡터가 이 핵산들 중 하나 초과로 포함할 수 있다. 이들 이중특이적 항체의 예는 CrossMab 및 T-세포 이중특이성(예를 들어, 문헌[Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-

1191] 참조)이다. 예를 들어, 상기 이중단량체의 중쇄들 중 하나는 소위 "놉 돌연변이"(T366W 및 선택적으로 S354C 또는 Y349C 중 하나)를 포함하고 다른 하나는 소위 "홀 돌연변이"(T366S, L368A 및 Y407V와 선택적으로 Y349C 또는 S354C)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Carter, P. et al., Immunotechnol 2 (1996) 73] 참조).

[0542] 일 양태에서, 본원에서 기술된 이중특이적 항체를 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 PD1 및 LAG3에 각각 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄(들)에서) 암호화한다. 또 다른 양태에서, 그러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 또 다른 양태에서, 그러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 일 양태에서, 숙주 세포는 다음을 포함한다(예를 들어, 이들을 사용하여 변형되었음): (1) 하나가 제1 VL을 포함하고 다른 하나가 항체의 제1 VH를 포함하는 아미노산 서열들을 암호화하는 한 쌍의 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 하나가 제2 VL을 포함하고 다른 하나가 항체의 제2 VH를 포함하는 아미노산 서열들을 암호화하는 한 쌍의 제2 핵산을 포함하는 제2 벡터, 또는 (2) 가변 도메인들 중 하나(바람직하게는 경쇄 가변 도메인)를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터, 하나가 경쇄 가변 도메인을 포함하고 다른 하나가 중쇄 가변 도메인을 포함하는 아미노산 서열들을 암호화하는 한 쌍의 핵산을 포함하는 제2 벡터, 및 하나가 제2 벡터에서와 같이 각각의 다른 경쇄 가변 도메인들을 포함하고 다른 하나가 제2 중쇄 가변 도메인을 포함하는 아미노산 서열들을 암호화하는 한 쌍의 핵산을 포함하는 제3 벡터, 또는 (3) 상기 항체의 제1 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터, 상기 항체의 제1 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제2 벡터, 상기 항체의 제2 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제3 벡터, 및 상기 항체의 제2 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제4 벡터. 일 양태에서, 상기 숙주 세포는 진핵세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 또는 림프계 세포(예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)이다. 일 양태에서, 이중특이적 항체를 만드는 방법이 제공되고, 이 방법은, 상기 제공된 것과 같이, 상기 항체의 발현에 적합한 조건하에서, 상기 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것과 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0543] 본원에 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체의 재조합 생산을 위해서, 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산은, 예를 들어, 상기에서 기술된 것과 같이, 단리되어 숙주 세포에서의 추가적인 클로닝 및/또는 발현을 위해서 하나 이상의 벡터 내로 삽입된다. 이러한 핵산은 종래의 절차를 이용하여 용이하게 단리되고 시퀀싱될 수 있다(예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 이용하여 의해).

[0544] 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 본원에 기술된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는 박테리아에서, 특히 글리코실화와 Fc 효과기 기능이 필요치 않을 때, 생산될 수 있다. 박테리아에서 항체 단편과 폴리펩티드의 발현을 위해서는, 예를 들어, US 5,648,237호, US 5,789,199호, 및 US 5,840,523호를 참조한다. (또한 대장균에서 항체 단편의 발현을 설명하는 문헌[Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후, 상기 항체는 가용성 분획 내의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리되어 추가적으로 정제될 수 있다.

[0545] 원핵생물에 추가적으로, 사상성 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현을 위해 적합하고, 그 미생물은 글리코실화 경로가 "인간화"되어, 부분적으로나 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 항체 생산을 이끌어낼 수 곰팡이 및 효모 균주를 포함한다. 문헌[Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; and Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215]을 참조한다.

[0546] 글리코실화 항체의 발현을 위해 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 생물(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래한다. 무척추동물 세포의 예는 식물과 곤충세포를 포함한다. 곤충세포와의 접합, 특히 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포의 형질주입에 사용될 수 있는 수많은 바칼로바이러스 균주가 확인되었다.

[0547] 식물세포 배양은 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들어, US 특허 5,959,177호, 6,040,498호, 6,420,548호, 7,125,978호, 및 6,417,429호(유전자 변형 식물에서 항체를 생산하는 PLANTIBODIESTM 기술을 설명하고 있음)를 참조한다.

[0548] 척추동물 세포도 또한 숙주로 이용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하는 데 적응하는 포유류 세포주도 유용할 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 다른 예들은 SV40 (COS-7)에 의해 변형된 원숭이 신장 CV1 세포

주; 인간 배아 신장 세포주(예를 들어, 문헌[Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74])에 기술되어 있는 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌[Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252])에 기술되어 있는 TM4 세포); 원숭이 신장세포(CV1); 아프리카 초록원숭이 신장세포(VERO-76); 인간 경추 육종세포(HELA); 개의 신장세포(MDCK; 버팔로 래트의 간세포(BRL 3A); 인간 폐세포 (W138); 인간 간세포 (Hep G2); 마우스 유선종양(MMT 060562); 예를 들어 문헌[Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68])에 기술되어 있는 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유류 숙주 세포주는 DHFR- CHO 세포(Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); 및 Y0, NS0 및 Sp2/0 같은 골수종 세포주를 비롯하여 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유류 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268]을 참조한다.

[0549] **C. 분석**

[0550] 본원에서 제공된 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 이 기술에서 알려진 다양한 분석에 의해 본 항체의 물리학적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인되고, 스크리닝 되며, 또는 특징지어질 수 있다.

[0551] **1. 친화도 분석**

[0552] 본원에서 제공된 이중특이적 항원 결합 분자, 항체 및 항체 단편의 상응하는 항원에 대한 친화도가 Biacore® 기기(GE 헬스케어)와 같은 표준 장치를 사용하여, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의한 실시예에서 제시된 방법에 따라서 측정될 수 있고, 그와 같이 수용체 또는 표적 단백질도 재조합 발현에 의해 얻어질 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 실험 및 예시적 구현예가 실시예 2, 8, 또는 11에 기술되어 있다. 일 양태에 따르면, KD는 BIACORE® T100 기기(GE 헬스케어)를 사용하여 25°C에서 표면 플라즈몬 공명법에 의해 측정된다.

[0553] **2. 결합 분석 및 기타 분석**

[0554] 일 양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 그의 항원 결합 활성, 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법에 의해 시험된다. 본원에서 제공된 이중특이적 항체의 상응하는 재조합 항원에 또는 항원-발현 세포에의 결합은 실시예 8, 또는 11에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 평가될 수 있다.

[0555] 또 다른 양태에서, 신선한 말초 혈액 단핵세포(PBMC)가 단핵구, NK 세포 및 T 세포와 같은 상이한 말초 혈액 단핵세포(PBMC)에 결합을 보여주는 결합 분석에 이용된다.

[0556] 또 다른 양태에서, 이 세포 이량체화 분석은 2개의 상이한 수용체 PD1 및 LAG3의 이량체화 또는 결국 결합/상호작용을 입증하는 데 사용하였고, 2개 표적 모두에 대한 이중특이적 항체와의 라이게이션 또는 교차-결합시, 효소의 두 단편을 사용하여, 세포질적으로 융합한다. 이에 유일하게 하나의 수용체만이 아무런 효소 활성을 보이지 않았다. 이 특이적 상호작용에 관하여, 상기 두 수용체의 세포질내 C-말단 엔드는 수용체 효소의 이중 아단위에 개별적으로 융합된다. 단일 효소 아단위 단독으로는 보고자 활성을 보이지 않았다. 그러나, 상기 두 수용체 모두에 대한 동시 결합이 두 수용체의 국소적인 세포질 축적, 2개의 이중 효소 아단위의 보상으로 이어지고, 결국 기질을 가수분해하는 특이적이고 기능적인 효소를 형성함으로써 화학발광 신호를 생성하게 되는 것으로 예상하였다(실시예 11).

[0557] **3. 활성 분석**

[0558] 일 양태에서, 분석이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 확인하기 위해 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어, 상이한 면역세포들, 특히 T-세포의 활성화 및/또는 증식, IFN γ 또는 TNF-알파와 같은 면역-조절 사이토카인의 분비, PD1 경로 차단, LAG3 경로 차단, 종양세포 사멸을 증진시키는 능력을 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체도 또한 제공된다.

[0559] 특정 양태에서, 본 발명의 항체는 그러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 일 양태에서, 한 개체(공여자 X)의 림프구에서 또 다른 개체(공여자 Y)의 림프구까지 활성을 측정하는 면역세포 분석이 제공된다. 혼합된 림프구 반응(MLR)은 림프구 효과기 세포로의 PD1 경로의 차단 효과를 입증할 수 있다. 상기 분석에서 T 세포는 본 발명의 이중특이적 항체의 존재시 또는 부재시의 활성 및 IFN-감마 분비에 대해 검사된다. 상기 분석은 실시예 9에서 보다 상세히 기술된다.

[0560] **D. 면역접합체**

[0561] 본 발명은 또한 화학요법 제제 또는 약물, 성장 저해 제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 곰팡이, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편들), 방사능 동위원소와 같은 하나 이상의 세포독성 제제에 접합된 본 발명의 이중특이적 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0562] **E. 진단과 검출을 위한 방법과 조성물**

[0563] 특정 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 본원에서 제공되는 이중특이적 항체는 생물학적 샘플에서 PD1 및 LAG3 모두의 존재를 검출하는 데 유용할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "검출"은 정량적 또는 정성적 검출을 총망라한다. 특정 구현예에서, 생물학적 샘플은 AML 줄기 암세포와 같은 세포 또는 조직을 포함한다.

[0564] 일 양태에서, 진단과 검출을 위한 방법에서의 이용을 위한 이중특이적 항체가 제공된다. 또 다른 양태에서, 생물학적 샘플에서 PD1 및 LAG3 모두의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 PD1 및 LAG3 모두에 대한 이중특이적 항체의 결합과 복합체가 이중특이적 항체와 둘 모두의 항원 사이에 형성되어 있는지를 검출함을 허용하는 조건하에서 본원에 기술된 이중특이적 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 것을 포함한다. 이러한 방법은 생체내 또는 시험관내 방법일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 이중특이적 항체는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 치료법에 적합한 대상을 선택하는 데 이용되고, 예를 들어 PD1 및 LAG3은 환자 선택을 위한 바이오마커이다.

[0565] 특정 양태에서, 표지된 이중특이적 항체가 제공된다. 표지는 이에 제한되지 않지만, 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티(형광, 발색단, 전자-밀도, 화학발광, 및 방사능 표지)를 포함할 뿐 아니라, 예를 들어 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출될 수 있는, 효소 또는 리간드와 같은 모이어티도 포함한다. 예시적인 표지는, 이에 제한되지 않지만, 방사성동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, 및 ¹³¹I, 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그 유도체, 로다민 및 그 유도체, 단질, 옴벨리페론, 예를 들어, 반딧불 루시페라제 및 박테리아 루시페라제(미국 특허 4,737,456호)와 같은 루시페라제, 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온(dihydrophthalazinediones), 서양 고추냉이 퍼옥시다제(HRP), 알카리 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제와 같은 사카라이드 옥시다제, 우라카제 및 크산틴 옥시다제와 같은 헤테로고리 옥시다제를 포함하고, 그들은 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지 또는 안정한 자유 라디칼과 같은 염색 전구체를 산화하기 위해 과산화수소를 채택하는 효소와 결합된다.

[0566] **F. 약제학적 조성물, 제형 및 투여 경로**

[0567] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에서 제공되는, 예를 들어 하기 치료 방법들 중 임의의 방법에서 사용하기 위해, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 중 임의의 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 중 임의의 항체 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 중 임의의 항체 및, 예를 들어 아래에 기술된 바와 같이, 적어도 하나의 추가적인 치료 제제를 포함한다.

[0568] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제에 용해되거나 확산된 하나 이상의 이중특이적 항체의 치료 유효량을 포함한다. 문구 "약제학적인 또는 약물학적으로 허용되는"은 채택된 투여량과 농도에서 수용자에게 일반적으로 무독성이며, 즉, 예를 들어 적절한 인간과 같은 동물에게 투여 시 부작용, 알러지 또는 다른 반응을 일으키지 않는 분자성 물질 및 조성물을 의미한다. 적어도 하나의 이중특이적 항체와 선택적으로 추가적인 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물의 제제가 본원에 참조로 인용된 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company (1990)]에 예시된 바와 같이, 본 개시내용에 비추어, 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 조성물은 동결건조된 제형 또는 수용액이다. 본원에서 사용된, "약제학적으로 허용되는 부형제"는 당업자에게 공지된 바와 같이, 임의 및 모든 용매, 완충제, 분산매, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 방부제(예를 들어, 항균제, 항진균제), 등장화제, 염, 안정화제 및 이의 혼합물을 포함한다.

[0569] 비경구용 조성물은 주사, 예를 들어 피하, 피부 내, 병소 내, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 척추강 내 또는 복강 내 주사에 의해 투여하도록 설계된 것들이 포함된다. 주사의 경우, 본 발명의 이중특이적 항체는 수용액 중에, 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 완충제, 예를 들어, 헵크스(Hanks') 용액, 링거(Ringer') 용액 또는 생리

적 식염수 완충액 중에 제형화될 수 있다. 상기 용액은 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 상기 이중특이적 항체는 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들어, 멸균 발열원-비함유수로 조성되기 위한 분말 형태일 수 있다. 멸균 주사액은, 본 발명의 용합 단백질을, 필요에 따라, 하기에 열거된 다양한 다른 성분들과 함께 적절한 용매에 필요량으로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균화는, 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과로써 용이하게 이루어질 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기초 분산매 및/또는 그외 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 속으로 다양한 멸균 활성 성분을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사액, 현탁액 또는 유화액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전에 멸균-여과된 액체 배지로부터 활성 성분과 임의의 추가의 바람직한 성분들의 분말을 제공하는 진공-건조 또는 동결-건조 기술이다. 액체 배지는 필요한 경우 적절히 완충되어야 하며, 액체 희석제는 주사전에 충분한 식염수 또는 글루코스로 먼저 등장성이 되어야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건하에 안정해야 하며, 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보호되어야 한다. 내독소 오염은 안전한 수준에서, 예를 들어, 0.5 ng/mg 단백질 미만으로 최소한으로 유지되어야 함을 인지할 것이다. 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제는, 다음이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 산화방지제; 방부제(예를 들어, 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예를 들어, EDTA; 당, 예를 들어, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-생성 상대-이온, 예를 들어, 나트륨; 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 수성 주사용 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 화합물, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 텍스트란 등을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정화제, 또는 화합물의 용해도를 증가시켜 고농축 용액의 제조를 가능케 하는 약제를 함유할 수 있다. 또한, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 유성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클로는 지방 오일, 예를 들어, 호마유 또는 합성 지방산 에스터, 예를 들어, 에틸 올리에이트 또는 트라이글리세리드 또는 리포솜이 포함된다.

[0570] 활성 성분들은, 예를 들어, 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 미세캡슐, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 미세캡슐 각각에, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 미세유화액, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 거대유화액에 봉입될 수 있다. 상기 기술은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990)]에 개시되어 있다. 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예로는 폴리펩티드를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 상기 매트릭스는 성형 제품, 예를 들어, 필름 또는 미세캡슐의 형태이다. 특정 구현예에서, 주사가 가능한 조성물의 지연된 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이의 혼합물을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0571] 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용되는 부형제는 또한 간질성(intersitial) 약물 분산제, 예를 들어, 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어, 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예를 들어, rHuPH20(하일레넥스(HYLENEX®), 박스터 인터내셔널 코포레이티드(Baxter International, Inc.))이 포함된다. rHuPH20을 비롯하여, 특정한 예시적 sHASEGP 및 사용 방법이 US 2005/0260186호 및 2006/0104968호에 기술되어 있다. 일 양태에서, sHASEGP는 콘드로이티나아제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 혼합된다.

[0572] 예시적 동결건조 항체 제형이 미국특허 제6,267,958호에 기술되어 있다. 수성 항체 제형은 미국특허 제6,171,586호 및 W02006/044908호에 기술되어 있는 것들을 포함하고, 상기 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충액을 포함한다.

[0573] 전술한 조성물에 추가하여, 이중특이적 항체는 또한 데포제로 제형화될 수 있다. 이러한 장시간 작용 제형은 체내 이식에 의해(예를 들어 피하로 또는 근육 내로), 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 이중특이적 항체는 적당한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어 허용되는 오일 속에 유화액으로서), 또는 이온 교환 수지를 사용하여, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들어, 난용성 염으로 제형화될 수 있다.

[0574] 본 발명의 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 통상적인 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 봉입 또는 동결

건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 약제학적 조성물은 단백질의 가공을 용이하게 하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 운반체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 이용하는 종래의 방식으로 약제학적으로 이용될 수 있는 제제로 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

[0575] 이중특이적 항체는 유리산 또는 염기성, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 유리산 또는 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 유지하는 염이다. 이들은 산 부가염, 예를 들어, 단백성 조성의 유리 아미노기에 의해 생성된 염, 또는 예를 들어, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산과 같은 유기산에 의해 생성된 염이 포함된다. 유리 카복실기로 형성된 염 또한, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물과 같은 무기염기로부터; 또는 이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다. 약제학적 염은 상응하는 유리 염기 형태로 있는 것보다 수성 및 다른 양성자성 용매에서 더 가용성인 경향이 있다.

[0576] 본원의 조성물은 또한 치료되는 특정한 적응증에 필요한 대로 하나보다 많은 활성 성분, 바람직하게는 서로에 부정적인 영향을 미치지 않는 상호보완적인 활성을 갖는 활성 성분을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분들은 의도한 목적에 효과적인 양으로 적절히 조합되어 존재한다.

[0577] 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 일반적으로 멸균상태이다. 멸균화는, 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과로써 용이하게 이루어질 수 있다.

[0578] **G. 치료 방법과 조성물**

[0579] 일 양태에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 본원에서 제공되는 이중특이적 항체는 치료 방법에서 이용될 수 있다.

[0580] 치료 방법에서의 이용을 위해서, 이전에 본원에서 정의된 것과 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 양질의 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고 조제되며 투여될 수 있다. 이와 관련하여 고려될 요인으로는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개개 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 약제 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료행위자에게 알려진 그외 다른 요인들이 포함된다.

[0581] 일 양태에서, 약제로서 사용을 위해 본원에서 정의된 것과 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다. 또 다른 양태에서, 본원에서 정의된 것과 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 질병 치료, 특히, 암 치료에서의 사용을 위해 제공된다. 특정 구현예들에서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체가 치료 방법에서의 사용을 위해 제공된다. 일 구현예에서, 본 발명은 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 본 항체를 필요로 하는 개체의 질병 치료에서의 사용을 위해 제공한다. 특정 구현예들에서, 본 발명은, 이중특이적 항체의 치료 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 제공한다. 특정 구현예들에서 치료될 질병은 암이다. 또 다른 양태에서, 치료될 질병은 감염 질환이고, 특히, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스 감염(HBV), C형 간염 바이러스 감염(HCV), 단순 포진 바이러스 1(HSV1), 거대 세포 바이러스(CMV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 또는 엡스타인-바 바이러스(EBV)와 같은 만성 바이러스성 감염이다. 치료를 필요로 하는 대상, 환자, 또는 "개체"는 전형적으로 포유동물이고, 보다 구체적으로는 인간이다.

[0582] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 항체를 필요로 하는 개체의 질병 치료를 위한 약제의 생산 또는 제조에서, 이전에 본원에서 정의된 것과 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체의 사용을 위해 제공한 것이다. 일 구현예에서, 상기 약제는 그 약제의 치료 유효량을 질병을 가진 개체에 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법에 사용하기 위한 것이다.

[0583] 다른 양태에서, 치료될 질환은 증식성 장애이고, 특히 암이다. 암의 예로는 방광암, 뇌암, 두경부암, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 결장암, 대장암, 직장암, 위암, 전립선암, 혈액암, 피부암, 편평세포암종, 뼈암, 및 신장암이 포함된다. 본 발명에 따라 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항

원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 사용하여 치료될 수 있는 다른 세포 증식 질환으로는, 복부, 뼈, 유방, 소화기관, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경계(중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 및 비뇨생식계에 위치한 종양이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 전암성 병태 또는 병변 및 암 전이도 또한 포함된다. 특정 양태에서, 암은 신세포암, 피부암, 폐암, 대장암, 유방암, 뇌암, 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 암은 암종, 림프종(예를 들어 호지킨 또는 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종, 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 치료될 암은 편평 세포 암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐 선암종, 폐 편평 암종, 복막 암, 간세포 암, 위장암, 췌장암, 신경 교종, 자궁 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간 세포종, 유방암, 결장암, 결장 직장암, 자궁 내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 전립선 암, 외음부 암, 갑상선암, 간암종, 백혈병 및 기타 림프구 증식 장애, 및 다양한 종류의 두경부암으로부터 선택된다.

[0584] 또 다른 양태에서, 치료되는 질병은 감염성 질환이고, 특히, 만성 바이러스성 감염이다. 용어 "만성 바이러스성 감염"은 만성 바이러스를 앓고 있거나 감염된 대상에 관한 것이다. 만성 바이러스성 감염의 예로는 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스 감염(HBV), C형 간염 바이러스 감염(HCV), 단순 포진 바이러스 1(HSV1), 거대 세포 바이러스(CMV), 림프성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 또는 엡스타인-바 바이러스(EBV)가 있다.

[0585] 당업자라면 많은 경우에 있어서 상기 이중특이적 분자가 치유를 제공할 수는 없지만 단지 부분적 이점만을 제공할 수 있음을 쉽게 인지한다. 일부 구현예에서, 다소의 이점을 갖는 생리학적 변화도 또한 치료적으로 유리한 것으로 간주된다. 따라서, 일부 구현예에서, 생리학적 변화를 제공하는 상기 이중특이적 항체의 용량은 "유효량" 또는 "치료 유효량"으로 간주한다.

[0586] 또 다른 양태에서, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체의 치료 유효량을 상기 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체의 질병을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 일 구현예에서 조성물은 상기 개체에 투여되고, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 형태로 본 발명의 이중특이적 항체를 포함한다. 특정 구현예에서 치료될 질환은 증식성 장애이다. 특정한 구현예에서, 상기 질환은 암이다. 특정 구현예들에서 상기 방법은, 적어도 하나의 추가 치료제, 예를 들어 치료되는 질환이 암이라면 항암제의 치료 유효량을 상기 개체에 투여하는 것을 또한 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 질환은 만성 바이러스성 감염이다. 상기 구현예들의 "개체"는 포유동물이고, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0587] 질환의 예방 또는 치료를 위해서, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체(단독으로 또는 하나 이상의 추가 치료제와 병용해서 사용될 때)의 적절한 투여량은 치료되는 질환의 유형, 투여 경로, 환자의 체중, 용합 단백질의 유형, 및 질환의 중증도와 경과, 이중특이적 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되었는지의 여부, 과거에 또는 현재 동반되는 치료 개입, 환자의 임상 병력 및 용합 단백질에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 투여를 책임지는 주치의가 어떤 경우에도 조성물에서 활성 성분의 농도 및 대상인 개체에 대한 적절한 투여량을 결정할 것이다. 다양한 시점들에 걸친 단일 또는 다중 투여, 볼루스(bolus) 투여 및 펄스 주입을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 다양한 투약 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0588] 본원에서 정의된 것과 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 일회적으로 또는 일련의 치료를 거듭하여 환자에게 적절하게 투여된다. 질환의 유형과 중증도에 따라, 약 1 µg/kg 내지 15 mg/kg(예를 들어, 0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg)의 이중특이적 항체가, 예를 들어, 하나 이상의 개별 투여에 의해서, 또는 연속 주입에 의해서, 환자에게 투여하기 위한 최초 후보 투여량이 될 수 있다. 하나의 전형적인 일일 투여량은, 상기 언급한 요인들에 따라서, 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 병태에 따라서, 치료는 일반적으로 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 지속된다. 이중특이적 항체의 한 예시적 투여량은 약 0.005 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위에 있을 것이다. 다른 예시들에서, 투여량은 또한 투여당, 약 1 µg/kg 체중, 약 5 µg/kg 체중, 약 10 µg/kg 체중, 약 50 µg/kg 체중, 약 100 µg/kg 체중, 약 200 µg/kg 체중, 약 350 µg/kg 체중, 약 500 µg/kg 체중, 약 1 mg/kg 체중, 약 5 mg/kg 체중, 약 10 mg/kg 체중, 약 50 mg/kg 체중, 약 100 mg/kg 체중, 약 200 mg/kg 체중, 약 350 mg/kg 체중, 약 500 mg/kg 체중, 약 1,000 mg/kg 체중 이상, 및 그 안에서 유도될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 숫자로부터 유도될 수 있는 범위의 예로, 전술한 숫자들에 준하여, 약 5 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 5 µg/kg 체중 내지 약 500 mg/kg 체중

등의 범위가 투여될 수 있다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는 10 mg/kg(또는 이의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 상기 용량은 간헐적으로, 예를 들어, 매주, 또는 3주마다 투여될 수 있다(예를 들어, 환자가 약 2 내지 약 20개, 또는 예를 들어, 약 6개 용량의 용합 단백질을 투여 받도록). 초기에 보다 높은 부하 용량을 투여하고, 이후에 하나 이상의 더 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여량 계획도 유용할 수 있다. 이러한 치료의 진행은 통상적인 기술 및 분석법에 의해 용이하게 모니터링된다.

- [0589] 본원에서 정의된 것과 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 의도하는 목적을 달성하기 위해 효과적인 용량으로 일반적으로 사용될 것이다. 병적 상태를 치료 또는 예방하기 위한 용도로, 본 발명의 이중특이적 항체, 또는 그 약제학적 조성물은 치료 유효량으로 투여되거나 적용된다. 치료 유효량의 결정은 특별히 본원에서 제공된 상세한 개시내용에 비추어, 당업자의 능력에 속한다.
- [0590] 전신 투여의 경우, 치료 유효량은 초기에 세포 배양 분석과 같은 시험관내 분석으로부터 추정될 수 있다. 세포 배양물에서 측정시 IC50을 포함하는 순환 농도 범위를 달성하기 위한 용량을 동물 모델에서 체형화할 수 있다. 그러한 정보는 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0591] 초회 투여량은 또한 당해 기술 분야에서 잘 알려진 기술을 사용하여, 예를 들어, 동물 모델의 생체내 데이터로부터 추정될 수 있다. 당업자는 동물 데이터에 기초하여 인간에 대한 투여를 용이하게 최적화할 수 있다.
- [0592] 투여량과 투여 간격은 치료 효과를 유지하기에 충분한 상기 이중특이적 항체의 혈장 레벨을 제공하기 위해 개별적으로 조정될 수 있다. 주사에 의한 투여에 통상적인 환자 투여량은 약 0.1 내지 50 mg/kg/일, 전형적으로 약 0.5 내지 1 mg/kg/일의 범위이다. 치료적으로 유효한 혈장 레벨은 매일 다중의 용량을 투여함으로써 달성될 수 있다. 혈장에서의 레벨은, 예를 들어, HPLC에 의해 측정될 수 있다.
- [0593] 국소 투여, 또는 선택적 흡수의 경우에, 상기 이중특이적 항체의 유효한 국소 농도는 혈장 농도와 관련되지 않을 수도 있다. 당업자는 과도한 실험 없이 치료적으로 유효한 국소 투여량을 최적화할 수 있을 것이다.
- [0594] 본원에서 기술된 이중특이적 항체의 치료적으로 유효한 투여량은 일반적으로 실질적인 독성을 야기하지 않고 치료 이점을 제공할 것이다. 용합 단백질의 독성 및 치료 효과는 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약제학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 세포 배양 분석 및 동물 연구가 LD₅₀(집단의 50%에서의 치사량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서의 치료적으로 유효한 투여량)을 결정하는 데 이용될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이에 투여량 비율이 치료 지수이고, 그 지수는 LD₅₀/ED₅₀ 비율로 나타낼 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 이중특이적 항체가 바람직하다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 높은 치료 지수를 나타낸다. 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 수득한 데이터를 인간에서의 사용에 적합한 범위의 투여량을 처방하는 데 이용할 수 있다. 상기 투여량은 바람직하게는 독성이 작거나 무독성인 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내에 든다. 상기 투여량은 다양한 요인들, 예를 들어, 사용되는 투여 형태, 사용되는 투여 경로, 대상의 병태 등에 따라 상기 범위 내에서 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 병태에 비추어 개개 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, 본원에 전체로 참고로 인용된 문헌[Fingl et al., 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1]을 참조한다).
- [0595] 본 발명의 이중특이적 항체로 치료 받는 환자의 주치의는 독성, 장기의 기능장애 등으로 인해 어떤 방법으로 그리고 그와 유사한 것으로 인해 어떤 방법으로 및 언제 종료하거나, 중단하거나, 투여를 조정하는지 알 수 있을 것이다. 정반대로, 주치의도 또한 임상적 반응이 적절하지 않다면(방해하는 독성) 요법을 더 높은 레벨로 조정하는 것을 알 것이다. 목적하는 장애의 관리에 있어서 투여되는 용량의 크기는 치료되는 병태의 중증도, 투여 경로 등에 따라 달라질 것이다. 병태의 중증도는, 예를 들어, 표준 진단 평가 방법에 의해, 어느 정도는, 평가될 수 있다. 추가로, 투여량 및 가능하게는 투여 횟수는 또한 연령, 체중, 및 환자 개체의 반응에 따라서 달라질 수 있을 것이다.
- [0596] **기타 제제들 및 요법**
- [0597] 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체는 치료에서 하나 이상의 다른 제제들과 병용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중특이적 항체가 적어도 하나의 추가적인 치료제와 공동-투여될 수 있다. 용어 "치료제"는 그러한 치료를 필요로 하는 개체에서 증상 또는 질병을 치료하기 위해 투여될 수 있는 임의의 제제

를 포함한다. 이러한 추가 치료제는 치료되는 특정 징후에 적합한 임의의 활성 성분들, 바람직하게는 서로 부정적인 영향을 미치지 않는 상호보완적 활성을 갖는 성분들을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 추가 치료제는 또 다른 항암제이다.

[0598] 본 발명의 일 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이, PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암 예방이나 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 암 면역요법에서 사용하기 위한 화학요법제, 방사능 및/또는 기타 제제들과 조합하여 투여된다.

[0599] 본 발명의 특정 양태에서, 본원에서 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체, 또는 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공되고, 상기 이중특이적 항체는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히, 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체와 병용 투여된다. 일 양태에서, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 (a) 서열번호 154의 CDR-H1 서열, 서열번호 155의 CDR-H2 서열, 서열번호 156의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 157의 CDR-L1 서열, 서열번호 158의 CDR-L2 서열, 서열번호 159의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA), 또는 (b) 서열번호 162의 CDR-H1 서열, 서열번호 163의 CDR-H2 서열, 및 서열번호 164의 CDR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 165의 CDR-L1 서열, 서열번호 166의 CDR-L2 서열, 서열번호 167의 CDR-L3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체이다. 일 양태에서, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 160의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 161의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체이거나 서열번호 168의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H CEA) 및/또는 서열번호 169의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L CEA)을 포함하는 제2 항원 결합 도메인이다.

[0600] 또 다른 양태에서, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 특히, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함한다.

[0601] 특정 양태에서, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 146의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 또는 서열번호 147의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 서열번호 148의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드, 및 서열번호 149의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 146의 폴리펩티드 서열, 서열번호 147의 폴리펩티드 서열, 서열번호 148의 폴리펩티드 서열 및 서열번호 149의 폴리펩티드 서열을 포함한다(CEA CD3 TCB).

[0602] 또 다른 특정 양태에서, 상기 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체는 서열번호 150의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드 서열, 서열번호 151의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드 서열, 서열번호 152의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드 서열, 및 서열번호 153의 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 이중특이적 항체는 서열번호 150의 폴리펩티드 서열, 서열번호 151의 폴리펩티드 서열, 서열번호 152의 폴리펩티드 서열, 및 서열번호 153의 폴리펩티드 서열을 포함한다(CEACAM5 CD3 TCB).

[0603] 다른 양태에서, 본원에 기술된 바와 같이 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물 및 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체가 제공된다. 특정 양태에서, 상기 약제학적 조성물은 질환의 병용 요법, 순차적 요법 또는 동시 요법에서 사용하기 위한 것으로, 특히 암치료를 위한 것이다. 보다 구체적으로, 상기 조성물은 고형 종양의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0604] 다른 양태에서, 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체의 유효량을 T-세포 활성화 항-CD3 이중특이적 항체와, 특히 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체 또는 항-FoIR1/항-CD3 이중특이적 항체와 병용하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 개체에서 암의 치료 및 암의 진행 지연을 위한 방법을 제공한다.

- [0605] 이러한 다른 제제들은 의도한 목적에 효과적인 양으로 적절히 조합되어 존재한다. 이러한 다른 제제들의 유효량은 사용된 용합 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 위에서 논의한 다른 요인들에 따라 달라진다. 이중특이적 항체는 일반적으로 본원에 기술된 것과 같은 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기술된 것과 같은 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 경험적으로/임상적으로 적절하다고 결정된 투여량과 경로로 사용된다.
- [0606] 이러한 병용 치료법은 병용 투여(2개 이상의 치료적 제제가 동일한 또는 별개의 조성물에 포함되는 투여), 및 개별 투여를 포함하고, 그런 경우에 이중특이적 항체의 투여가, 추가 치료제 및/또는 증강제의 투여 이전에, 동시에, 및/또는 연이어 일어날 수 있다.
- [0607] **H. 생산 물품**
- [0608] 본 발명의 다른 양태에서, 상기한 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에서 유용한 물질을 함유하는 생산 물품이 제공된다. 생산 물품은 용기 및 상기 용기 위의 또는 상기 용기와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기로는, 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 주머니 등이 포함된다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 제조될 수 있다. 상기 용기는 조성물을 단독으로 또는 병태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 함께 포함하며, 멸균 진입구를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 스톱퍼(stopper)를 갖는 정맥내 용액 주머니 또는 바이알일 수 있다). 본원에서 기술한 바와 같이, 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 PD1에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체이다.
- [0609] 상기 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 선택한 병태를 치료하는 데 이용됨을 알려준다. 추가로, 생산 물품은 (a) 그 안에 함유된 조성물을 담은 제1 용기(상기 조성물은 본 발명의 이중특이적 항체를 포함함); 및 (b) 그 안에 함유된 조성물을 담은 제2 용기(상기 조성물은 또 다른 세포독성 또는 그와 다른 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 구현예에서 생산 물품은, 조성물이 선택한 특정 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 라벨 또는 패키지 삽입물을 더 포함할 수 있다.
- [0610] 대안으로, 또는 추가로, 생산 물품은 또한 약제학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 주사를 위한 정균수(BWFI), 인산염-완충 식염수, 링거씨 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 포함한다. 상기 생산 물품은 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 포함하여, 상업적 및 사용자의 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

표 C(서열)

서열 번호:	이름	서열
1	중쇄 HVR-H1, PD1-0103	GFSFSSY
2	중쇄 HVR-H2, PD1-0103	GGR
3	중쇄 HVR-H3, PD1-0103	TGRVYFALD
4	경쇄 HVR-L1, PD1-0103	SESVDTSDNSF
5	경쇄 HVR-L2, PD1-0103	RSS
6	경쇄 HVR-L3, PD1-0103	NYDVPW
7	중쇄 가변 도메인 VH, PD1-0103	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYTMSWVRQTP EKRLDWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLE MSSLMS EDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTSTVTVSS
8	경쇄 가변 도메인 VL, PD1-0103	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWYQ QRPGQSPKLLIYRSSTLESIGVPRFSGSGSGRTDFTLTIDPV EADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGTKLEIK
9	인간화 변이체 -PD1-0103_01(PD1 0376)의 중쇄 가변 도메인 VH	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAP GKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTSTVTVSS
10	인간화 변이체 -PD1-0103_01(PD1 0376)의 경쇄 가변 도메인 VL	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPKLLIYRSSTLESIGVPRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIK
11	인간화 변이체 -PD1-0103_02 의 경쇄 가변 도메인 VL	DV VMTQSPSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQ QRPGQSPRLLIYRSSTLESIGVPRFSGSGSGTDFTLTKISRV EAEDVGYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIK
12	인간화 변이체 -PD1-0103_03 의 경쇄 가변 도메인 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESIGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIK
13	인간화 변이체 -PD1-0103_04 의 경쇄 가변 도메인 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESIGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIK
14	중쇄 HVR-H1, aLAG3(0414)	DYTMN
15	중쇄 HVR-H2, aLAG3(0414)	VISWDGGGTY YTDSVKG
16	중쇄 HVR-H3, aLAG3(0414)	GLTDTLYGS DY
17	경쇄 HVR-L1, aLAG3(0414)	RASQSISSYL N
18	경쇄 HVR-L2, aLAG3(0414)	AASTLQS
19	경쇄 HVR-L3, aLAG3(0414)	QQTYSPLT
20	경쇄 가변 도메인 VH, aLAG3(0414)	EVQLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFIFD DYTMNWVRQA PGKLEWVAV ISWDGGGTY TDSVKGRFTI SRDDFKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKGL TDTTLYGSDY WGQGTSTVVS S
21	경쇄 가변 도메인 VL, aLAG3(0414)	DIQMTQSPSS LSASVDRVT ITCRASQIS SYLNWYQKPK GKAPKLLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQF EDFATYYCQQ TYSPLTFGG GTKVEIK

[0611]

22	중쇄 HVR-H1, aLAG3(0403)	DYTMH
23	중쇄 HVR-H2, aLAG3(0403)	LVSWDGGGTY YTNSVKG
24	중쇄 HVR-H3, aLAG3(0403)	AITDTSLYGY DY
25	경쇄 HVR-L1, aLAG3(0403)	RASQSISSYL N
26	경쇄 HVR-L2, aLAG3(0403)	AASSLQS
27	경쇄 HVR-L3, aLAG3(0403)	QQTYSTPLT
28	중쇄 가변 도메인 VH, aLAG3(0403)	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFD DYTMHWVRQA PGKGLEWVSL VSWDGGGTY TNSVKGRTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYFCAKAI TDTSLYGYDY WGQGILVTVS S
29	경쇄 가변 도메인 VL, aLAG3(0403)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQIS SYLNWYQQKP GNAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSIPLTFGG GTKVEIK
30	중쇄 HVR-H1, aLAG3(0411)	DYTMN
31	중쇄 HVR-H2, aLAG3(0411)	VISWDGGATY YADSVKG
32	중쇄 HVR-H3, aLAG3(0411)	GLTDDTYLGS DY
33	경쇄 HVR-L1, aLAG3(0411)	RASQSIVSYL N
34	경쇄 HVR-L2, aLAG3(0411)	ASSSLQS
35	경쇄 HVR-L3, aLAG3(0411)	QQTYSTPLT
36	중쇄 가변 도메인 VH, aLAG3(0411)	EVHLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFIVD DYTMNWVRQA PGKGLEWVSV ISWDGGATYY ADSVKGRFTI SRDDFKNTLY LQMNSLRAED TAVYCAKGL TDDTYLGS DY WGQGTLVTVS S
37	경쇄 가변 도메인 VL, aLAG3(0411)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQIV SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA SSSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSIPLTFGG GTKVEIK
38	중쇄 HVR-H1, aLAG3(0417)	DYAMS
39	중쇄 HVR-H2, aLAG3(0417)	GIDNSGYTY YTDSVKG
40	중쇄 HVR-H3, aLAG3(0417)	THSGLIVNDA FDI
41	경쇄 HVR-L1, aLAG3(0417)	RASQSISSYL N
42	경쇄 HVR-L2, aLAG3(0417)	AASSLQS
43	경쇄 HVR-L3, aLAG3(0417)	QQTYSTPLT
44	중쇄 가변 도메인 VH, aLAG3(0417)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL ACAASGFTFS DYAMSWVRQA PGKGLEWVSG IDNSGYTYTY TDSVKGRTI SRDDVKNLY LQMNSLRAED TAVYLCTKTH SGLIVNDAFD IWGQGMVTV SS
45	경쇄 가변 도메인 VL, aLAG3(0417)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSIPLTFGG GTKVEIK
46	중쇄 HVR-H1, aLAG3(0416)	DYAMS
47	중쇄 HVR-H2, aLAG3(0416)	GIDNSGYTY YTDSVKG
48	중쇄 HVR-H3, aLAG3(0416)	THSGLIVNDA FDI

[0612]

49	경쇄 HVR-L1, aLAG3(0416)	RASQSISSYL N
50	경쇄 HVR-L2, aLAG3(0416)	DASSLES
51	경쇄 HVR-L3, aLAG3(0416)	QQSYSTPLT
52	중쇄 가변 도메인 VH, aLAG3(0416)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL ACAASGFTFS DYAMSWVRQA PGKGLEWVSG IDNSGYITYY TDSVKGRFTI SRDDVKNTLY LQMNSLRAED TAVYLCTKTH SGLIVNDAFD IWGQGTMTV SS
53	경쇄 가변 도메인 VL, aLAG3(0416)	DIQLTQSPSS LSASVGDVRT ITCRASQIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLESQVPS RFSGSGSGTD ATLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK
54	중쇄 가변 도메인 VH, BMS-986016 (WO 2014/008218 호 및 US 2016/0326248 호)	QVQLQQWAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYWNWIRQP PGKLEWIGE INHRGSTNSN PSLKSRTVLS LDTSKNQPSL KLRVTAADT AVYYCAFQYS DYEYNWFDPW GQGITLVTVSS
55	경쇄 가변 도메인 VL, BMS-986016 (WO 2014/008218 호 및 US 2016/0326248 호)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQIS SYLAWYQQKP GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FILTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ GINLEIK
56	중쇄 HVR-H1, MDX25F7(25F7)	DYYWN
57	중쇄 HVR-H2, MDX25F7(25F7)	EINHNGNTNSNPSLKS
58	중쇄 HVR-H3, MDX25F7(25F7)	GYSDEYNWF
59	경쇄 HVR-L1, MDX25F7(25F7)	RASQSISSYLA
60	경쇄 HVR-L2, MDX25F7(25F7)	DASNRAT
61	경쇄 HVR-L3, MDX25F7(25F7)	QQRSNWPLT
62	중쇄 가변 도메인 VH, MDX25F7(25F7)(US 2011/0150892 호 및 WO2014/008218 호)	QVQLQQWAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYWNWIRQP PGKLEWIGE INHNGNTNSN PSLKSRTVLS LDTSKNQPSL KLRVTAADT AVYYCAFQYS DYEYNWFDPW GQGITLVTVSS
63	경쇄 가변 도메인 VL, MDX25F7(25F7)(US2011/0150892 호 및 WO2014/008218 호)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQIS SYLAWYQQKP GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FILTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ GINLEIK
64	중쇄 가변 도메인 VH, 인간화 BAP050(LAG525) (US2015/0259420 호)	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGFTLT NYGMNWRQT PGKGLKWMGW INTDTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAS LQINNLEKAD TATYFCARNP PYYYGTNAE AMDYWGQGTI TVVSS
65	경쇄 가변 도메인 VL, 인간화 BAP050(LAG525) (US2015/0259420 호)	DIQMTQTSS LSASLGDVRT ISCSSQDIS NYLMWYQQKP DGTVEVLIY TSLHLGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEL EDIATYYCQQ YYNLPWTFGQ GTKVEIK
66	중쇄 가변 도메인 VH, MDX26H10(26H10) (US2011/0150892 호)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAREW AVASWDYGMV VWGQGTITV SS

[0613]

67	경쇄 가변 도메인 VL, MDX26H10(26H10) (US2011/0150892 호)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYQC QYGSSPFTFG PGTKVDIK
68	인간 카파 경쇄 불변 영역	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
69	인간 람다 경쇄 불변 영역	QPEAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYFGAVTVA WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS
70	IgG1로부터 유래된 인간 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
71	L234A, L235A 및 P329G 의 변이가 있는 IgG1로부터 유래된 인간 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVP KSCDKTHTCP PCPAPAAAGG PSVFLFPPKP KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
72	IgG4로부터 유래된 인간 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMI SRTP EYVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTIKAK GQPREPQVYVYTLPPSRDE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
73	예시적 인간 LAG3 서열(신호 서열 없음)	VPVVWAQEGA PAQLPCSPTI PLQDLALLRR AGVTWQHQPDSGPPAAAPGH PLAPGPHPA PSSWGPRPRR YTVLSVGGP LRSGLPLQP

[0614]

		RVQLDERGRQ RGDPSLWLRP ARRADAGEYR AAVHLRDRAL SCRLRLRLGQ ASMTASPPGS LRASDWVILN CSFSRFDIPA SVHWFRMRGQ GRVTVRESPI HHLAESFLFL PQVSPMDSGP WGCILTYRDG FNVSIMYMLT VLGLEPPTPL TVYAGAGSRV GLPCRLPAGV GTRSFLTAKW TPPGGGFDLL VTGDNGDFTL RLEDVSAQA GTYTCHIHLQ EQQLNATVTL AITVTTKSF GSPGSLGKLL CEVTVVSGQE RFWSSLDIT SQRSFSGPWL EAQEAQLLSQ PWQCQLYQGE RLLGAAVYFT ELSSPGAQRS GRAFGALPAG HLLFLILGV LSLLLVTGA FGFHLWRQW RPRRFALEQ GIHPTQAQSK IEELEQEPEP EPEPEPEPEP EPEPEQL
74	인간 LAG3 세포의 도메인(ECD)	VPVVAQEGA PAQLPCSPTI PLQDLSLLRR AGVTWQHQPDSGPPAAAFGH PLAFGPHAA PSSWGFPRR YTVLSVGGG LRSGLTLQP RVQLDERGRQ RGDPSLWLRP ARRADAGEYR AAVHLRDRAL SCRLRLRLGQ ASMTASPPGS LRASDWVILN CSFSRFDIPA SVHWFRMRGQ GRVTVRESPI HHLAESFLFL PQVSPMDSGP WGCILTYRDG FNVSIMYMLT VLGLEPPTPL TVYAGAGSRV GLPCRLPAGV GTRSFLTAKW TPPGGGFDLL VTGDNGDFTL RLEDVSAQA GTYTCHIHLQ EQQLNATVTL AITVTTKSF GSPGSLGKLL CEVTVVSGQE RFWSSLDIT SQRSFSGPWL EAQEAQLLSQ PWQCQLYQGE RLLGAAVYFT ELSSPGAQRS GRAFGALPAG HL
75	KIEELE(LAG3 세포간 도메인의 일부)	KIEELE
76	프라이머 rbHC.up	aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc
77	프라이머 rbHCf.do	ccattggtga gggtgccgca g
78	프라이머 BcPCR_FHLC_leader.fw	atggacatga gggtcctccgc
79	프라이머 BcPCR_huChkappa.rev	gatttcaact gctcatcaga tggc
80	중쇄 HVR-H1, PD1-0098	<u>GYSITSDY</u>
81	중쇄 HVR-H2, PD1-0098	<u>YSG</u>
82	중쇄 HVR-H3, PD1-0098	<u>HGSAPWYFD</u>
83	경쇄 HVR-L1, PD1-0098	<u>SQNI VHSDGNTY</u>
84	경쇄 HVR-L2, PD1-0098	<u>KVS</u>
85	경쇄 HVR-L3, PD1-0098	<u>GSHFPL</u>
86	중쇄 가변 도메인 VH, PD1-0098	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT <u>GYSITSDY</u> AWWIRQF PGDKLEWLGYITYSGFTWVWPSLKSRIISRDTSKQFFLQ LNSVAFEDTATYYCAR <u>HGSAPWYFD</u> WGRGTTLTVSS
87	경쇄 가변 도메인 VL, PD1-0098	DVLMQTFLSLPVLGDAQASISCRSSQNI <u>VHSDGNTY</u> LEWYL QKPGQSFNLLI <u>KVSR</u> RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDLGVYYCF <u>GSHFPL</u> IFGAGTKLELK

[0615]

88	중쇄 HVR-H1, PD1-0069	<u>GYTFIDY</u>
89	중쇄 HVR-H2, PD1-0069	<u>YSG</u>
90	중쇄 HVR-H3, PD1-0069	<u>GITTFGA</u>
91	경쇄 HVR-L1, PD1-0069	<u>SKGVSTSSYSF</u>
92	경쇄 HVR-L2, PD1-0069	<u>YAS</u>
93	경쇄 HVR-L3, PD1-0069	<u>SREFPW</u>
94	중쇄 가변 도메인 VH, PD1-0069	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFIDYAMHWVKQSH ARTLEWIGVISTYSGDTVMNQKFKDKATMTVDKSSSTAYLE LARNTSEDSAIYYCARLGITTFGAVWGQGLVTVSA
95	경쇄 가변 도메인 VL, PD1-0069	DIIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKGVSTSSYSFMHWYQQ KPRQPTKLLIKYASVLESQVTPARFSGSGSGTDFTLNIHPVE EEDAATYYCHHSREFPWTFGGGTKLEIK
96	PD1(0376)/ aLAG3(0416)에 기초한 1+1 PD1/LAG3 0799 의 중쇄 1	DIIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSF IHWYQ QKFGQSPKLLIYRSTLESQVTPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQNYDVTWTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVYSWNSGALTSGVH TTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICMWNHKPSMT KVDKVEPKSCDKTHCTCPAPEAAGGPSVFLPTPKPFDT LMI SRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVFNAAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDI AVEWESNGQPENNYKTTPTVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFPSCSYMHEALFNHYTQKSLSLSPGK
97	1+1 PD1/LAG3 0799 의 중쇄 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRTISRDDEKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYLCIKTHSGLINDAFDIWGQGTMTVYSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPTVYSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC MWNHKPSMTKVDKVEPKSCDKTHCTCPAPEAAGGPSVF LPTPKPFDLMI SRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV LSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPTVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSYMHEALFNHYTQKSLSLSPG K
98	1+1 PD1/LAG3 0799 의 경쇄 1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSSWVRQAP GKGLEWVATISGGGRDIYVTPDSVKGRTISRDNSENTLYLQ MNSLRAEDTAVYCVLLTGRVYFALDSWGQGLVTVSSASV AAPSVFIFPTSDLEQLKSGTASVCLLNNFYTPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
99	1+1 PD1/LAG3 0799 의 경쇄 2	DIQLTQSPSSLSASVGRVYITCRASQSISSYLHWYQQKFG KAPKLLIYDASSLESQVTPSRFSGSGSGTDATLTISLQPED FATYYCQSYSTITLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPTSDR KLKSGTASVCLLNNFYTPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

[0616]

100	PD1(0376)/ aLAG3(0414)에 기초한 1+1 PD1/LAG3 0927 의 종쇄 2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFDDYTMHWVRQAPGRGLEWFAVYISWDGGGTYYTDSVKGRTISRDDEKFTLTLQMNLSLAEDTAVYYCARGLTDTLYGSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFTLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSSSLGTQTYICNWNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCTPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFMYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
101	1+1 PD1/LAG3 0927 의 경쇄 2	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLAHWYQQKFGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSDTFLTISSLPEDFATYYCQQTYSSTLTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVWCLLNFYPREAKVQWKEVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEHKVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
102	PD1(0069)/ aLAG3(MDX25F7)에 기초한 1+1 PD1/LAG3 0222 의 종쇄 1	DIIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKGVSTSSYSPMHWYQQKPRQPPKLLIKYASVLESGVPSRFSGSGSDTFLNIHPVEEDDAATYYCHHSREFPWFPGGKLEIKSSASTKGPSVFTLAPSSKSTSGGTAALGCLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSSSLGTQTYICNWNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCTPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFMYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLTTPCRDELTKNQVSLWCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
103	1+1 PD1/LAG3 0222 의 종쇄 2	QVQLQQWGAGLLEKPSSETLSLTCAVYGGSFSDYYWVIRQPPGRGLEWIGEINHGNTSATSLKSRVTLSDTSKNTQPSLKLRSVTAADTAVYYCAFQSDYEVWFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFTLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVWTVPSSSLGTQTYICNWNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCTPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFMYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPTVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
104	1+1 PD1/LAG3 0222 의 경쇄 1	QVQLQQSGPELVTPGVSVKISCRGSGYTFIDYAMHWVKQSHARTLEWIGVISTYSGDTNMQKFKDKATMTYDKSSSTAYLELARMTSEDSAIYYCARLGITGFAVWGQGLTVTVSAASVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVWCLLNFYPREAKVQWKEVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEHKVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	1+1 PD1/LAG3 0222 의 경쇄 2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAHWYQQKFGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSMWTLTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR

[0617]

		KLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSDKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
106	PD1(0098)/ aLAG3(MDX25F7)에 기초한 1+1 PD1/LAG3 0224 의 중쇄 1	DVLMQTPLSLPVLGDQASISCRSSQNI VHSDGNTYLEWYL QKPGQSPNLLI IKVSRRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDLGVYYCFQ GSHFPLTFGAGTKLELKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYLS SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
107	1+1 PD1/LAG3 0224 의 경쇄 1	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT GYSITSDY AWNWRQF PGDKLEWLG YITYSGFTN VNPSLKSRI SISRDTSKNQFFLQ LNSVATEDATYICAR WHGSAPWYFDY WGRGTTLTVSSASVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
108	aLAG3(0156) 중쇄 (MDX25F7)	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSDYYNWRQPP GKGLEWIGEINHNQNTNSNPSLKSRLVSLDTSKNQFSLKL RSVTAADTAVYYCAFQGYSDYENWFDPWGQGLVTVSSGQP KAPSVFPLAPCCGDTIPSSITVLGCLVKGYLPEPVTVTWNSG TLTNGVRTFPPSVRQSSGLYLS SSVSVTSSSQPVTCNVAHP ATNTKVDKTVAPSTCSPKTPPEPELLGGPSVFI FPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPP REQQFNSTIRVSVTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPI EKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY PSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYNKLSVPT SEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKLSISRSPGK
109	aLAG3(0156) 경쇄 (MDX25F7)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPED FAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSDKDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
110	aLAG3(0414) 중쇄	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMNWVRQAP GKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRTIS SRDDFENTLYLQ MNSLR AEDTAVYYCAKGLDITLYGSDYWGQGLVTVSSGQ PKAPSVFPLAPCCGDTIPSSITVLGCLVKGYLPEPVTVTWNS GTLTNGVRTFPPSVRQSSGLYLS SSVSVTSSSQPVTCNVAH PATNTKVDKTVAPSTCSPKTPPEPELLGGPSVFI FPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPP LREQQFNSTIRVSVTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPI IEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY YPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYNKLSVP TSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKLSISRSPGK

[0618]

111	aLAG3(0414) 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLHWYQQKPG KAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPED FATYYCQTYSSPLIFGGGKVEIKGTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSYSLSSITLTLSEADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
112	aLAG3(0416) 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAAAGFTFSDYAMSWYRQAP GKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRTISRDDVENLTLQ MNSLRAEDTAVYLCIKTHSGLVNDAFDIWGQGMVTVSSG QPKAPSVFPLAPCCGDTIPSSITLGLVKGILPEPVTVTW SGTLTNGVRFPSVRQSSGLYSLSVVSIVTSSSQPVTCWA HPATNFKVDKTVAPSTCSEPTCPPELGGPSVFIFPKPK DTLMI SRTPEVTCVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVTAAP PLRQQFMSTIRVYSTLPFAHQDWLRGKEFKCKVHEKALPA PIEKTISKARGQLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMING FYTSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSGGSYFLYNKLSV PTSEWQRGDVFTCSVMHEALHMHYTKKSI SRSFGE
113	aLAG3(0416) 경쇄	DIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLHWYQQKPG KAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDAITLITSSLPED FATYYCQSYSTPLIFGGGKVEIKGTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSYSLSSITLTLSEADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
114	PD1(0376)/ aLAG3(0414)에 기초한 2+2 PD1/LAG3 8970 의 중쇄	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAAAGFIFDDYTMHWYRQAP GKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRTISRDDFENLTLQ MNSLRAEDTAVYCAKGLDITLIGSDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVEDVFPPEVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTVSSSLGTQTYICN VNHKPSNFKVDEKVEPKSCDKTHTCTPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFHWYVDGVE VHEARTKPREBQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALGAPIEKTISKARGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFPYSDIAVEWESEGQPEENYKTPAVLDSGGSFPL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHMHYTKKSLSLSPGG GSGGGGSGGGGSGGGSEVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFSFSSYTMHWYRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYTDSVK GRFTISRDNKNTLILQMNSLRAEDTAVYCVLLTGRVYFA LDSWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWC LLANFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSITLTLSEADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
115	2+2 PD1/LAG3 8970 의 경쇄 1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSNFIHWYQ KFTGQSPKLLIYRSTLESGLVDRFSGSGSGTDFLTITSSL QAEDWAVYCCQNYDVPWFQGGKVEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSVTVTVSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KYDKKVEPKSC

[0619]

<p>116</p>	<p>PD1(0376)/ aLAG3(0416)에 기초한 2+2 PD1/LAG3 8984 의 중쇄</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAAAGFTFSFDYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNLTYLQ MNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGGGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSYTMWVRQAPGKLEWVATISGGGRDIYYPDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYVCVLLTGRVYF ALDSWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV CLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>117</p>	<p>PD1(0376)/ aLAG3(MDX25F7)에 기초한 2+2 PD1/LAG3 9010 의 중쇄</p>	<p>QVQLQQWAGLLKPKSETLSLCAVYGGSFSDYYWNWIRQPP GKLEWIGEINHNNTNSNP SLKSRVTLSDTSKNQFSLKL RSVTAADTAVYICAFGYSDYENWFDPWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGGGGGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSSYTMWVRQAPGKLEWVATISGGGRDIYYPDSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYVCVLLTGRVYFAL DSWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL STLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>118</p>	<p>aLAG3(0414)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 8310 의 중쇄 1</p>	<p>EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMWVRQAP GKLEWVAVISWGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYICAKGLTDITLYGSDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGGGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAA SGFSFSSYTMWVRQAPGKLEWVATISGGGRDIYYPDSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYVCVLLTGRVYFA</p>

[0620]

		LDSWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SSITLTLSEADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
119	2+1 PD1/LAG3 8310 의 증쇄 2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIIDYTMNWVRQAP GKGLEWVAVISWGGGTYTDSVKGRTISRDDFKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGLDITLYGSDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	aLAG3(0416)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 8311 의 증쇄 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRTISRDDVENTLYLQ MNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGSGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSYTMSSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSV KGRFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYF ALDSWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASV VCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSITLTLSEADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
121	2+1 PD1/LAG3 8311 의 증쇄 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRTISRDDVENTLYLQ MNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

[0621]

<p>122</p>	<p>aLAG3(25F7)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 1252 의 중쇄 1</p>	<p>QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCVAVYGGSFSDYYWNWIRQPP GKGLEWIGEINHNNGNTNSNPSLKSRTVLSLDTSKNQFSLKL RSVTAADTAVYYCAFQYSDYENWFDPWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGGG SGGGSGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRRLSCAAS GFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKG RFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFAL DSWGQGLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSL STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>123</p>	<p>aLAG3(0414)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 8312 의 중쇄 1</p>	<p>EVQLLESGLLVQPGGSLRRLSCAASGFIFDDYTMNWRQAP GKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGLDITLYGSDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICN VHNKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGG GGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVDTSDNSF IHWYQQKPKGQSPKLLIYRSTLESVGP DRFSGSGGTDFTLTITSSLAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLK KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRRL SCAASGFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYP DSVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGR VYFALDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKSC</p>
<p>124</p>	<p>aLAG3(0416)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 8313 의 중쇄 1</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAAAGFTFSDYAMSWVRQAP GKGLEWVSGIDNSGYYTYTDSVKGRFTISRDDVKNLTYLQ MNSLRAEDTAVLCTKTHSGLVINDAFDIWGQGMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHNKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</p>

[0622]

		<p>SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSTLESQV PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCQNYDVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGG GSGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESQGGGLVQPGGSLR LSCAASGFSFSSYTMSSWRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYY PDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC</p>
125	aLAG3(25F7)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 1088 의 중쇄 1	<p>QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIHQPP GKLEWIGEINHGNTNSNPSLKSRTVLSLDTSKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCAFQYSDYENWFDPWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSTLESQVDP RFSGSGSGTDFTLTITSSLAQEDVAVYYCQNYDVPWTFGQGT KEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSE ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESQGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYTMSSWRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC</p>
126	aLAG3(25F7)/PD1(0376)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 0918 의 중쇄 1	<p>QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNIHQPP GKLEWIGEINHGNTNSNPSLKSRTVLSLDTSKNQFSLKLR SVTAADTAVYYCAFQYSDYENWFDPWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVKDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV</p>

[0623]

		SKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSPGGG GGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSV KGRFTISRDNSENKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVLLTGRVYF ALDSWGQGLVTVSS
127	2+1 PD1/LAG3 0918 의 중쇄 2	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSDYYNWIQQP GKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLKSRLSLDTSKNQFSLKL RSVTAADTAVYYCAFQYSDYENWFDPWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSPGGG GGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVDTSDNSFIHWYQQKPKGQSPKLLIYRSTLESQVDP RFSGSGSGTDFLTITISLQAEADVYYCQNYDVPWTFGQG TKVEIK
128	인간 PD1	UniProt accession no. Q15116 MQIPQAPWPV VVAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFNST ESFVLNRYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFVTLQ PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPV CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL
129	펩티드 링커 G4S	GGGGS
130	펩티드 링커 (G4S) ₂	GGGSGGGGS
131	펩티드 링커 (SG4) ₂	SGGGSGGGG
132	펩티드 링커 (G4S) 2G4	GGGSGGGSGGGG
133	펩티드 링커	GSPGSSSSGS
134	펩티드 링커 (G4S) ₃	GGGSGGGSGGGGS
135	펩티드 링커 (G4S) ₄	GGGSGGGSGGGSGGGGS
136	펩티드 링커	GSGSGSGS
137	펩티드 링커	GSGSGNGS
138	펩티드 링커	GGSGSGSG
139	펩티드 링커	GGSGSG
140	펩티드 링커	GGSG
141	펩티드 링커	GGSGNGSG

[0624]

142	펩티드 링커	GGNGSGSG
143	펩티드 링커	GGNGSG
144	aLAG3(0414)에 기초한 1+1 PD1/LAG3 0725(1 +1 트랜스)의 중쇄 2	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQP REPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMNWVRQAPGKLEWVAV ISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGLTDITLYGSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSC
145	aLAG3(0414)에 기초한 2+1 PD1/LAG3 0750(2 +1 트랜스)의 중쇄 2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMNWVRQAP GKLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGLTDITLYGSDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FDD YTMNWVRQAPGKLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISR DDFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDITLYGSDYWGQ GLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
146	경쇄 „CEA _{2F1} “ (CEA TCB)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASAAYGTYVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPED FATYYCHQYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
147	인간화 경쇄 CD3 _{CH2627} (교차 fab, VL-CH1) (CEA TCB)	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVILTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQAFRGLIGGINKRAPGTPARFSGSLLGKKAALTLGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
148	CEA _{CH1A1A 08/09} - 인간화 CD3 _{CH2627} (교차 fab VH-Ck)-Fc(knob) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAP GQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYME LRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0625]

		GALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDGGGSGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKLEWVSRIR <u>SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDT</u> AVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYERHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149	CEA <small>CH1A1A 08/99</small> (VH-CH1)-Fc (홀) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWRQAP GQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVITTDSTSTAYME LRSLRSDDAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPVSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
150	CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAP GKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
151	인간화 CEA VH-CH1(EE)-Fc (홀, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNISKDYMHWRQAP GQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKQGRVITADTSTSTAYME LSSLRSEDAVYYCAPFGYVSDYAMAYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPVSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
152	인간화 CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL- CH1-Fc (홀, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNISKDYMHWRQAP GQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKQGRVITADTSTSTAYME LSSLRSEDAVYYCAPFGYVSDYAMAYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDGGGSGGGGSAVVTQEPVSLT VSPGGITVLTGSSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGG

[0626]

		TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDAEEYICALW YNSLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDILMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
153	인간화 CEA VL-CL(RK) (CEACAM5 TCB)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQTNEPDTYFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDRKLSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
154	CEA-HCDR1	EFGMN
155	CEA-HCDR2	WINTKTGEATYVEEFGK
156	CEA-HCDR3	WDFAYYVEAMDY
157	CEA-LCDR1	KASAAVGTYYA
158	CEA-LCDR2	SASYRKR
159	CEA-LCDR3	HQYYTYPLFT
160	CEA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAP GQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFGKRVITTTDTSTSTAYME LRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSS
161	CEA VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASAAVGTYYAVYQQKPG KAPKLLIYSASYRKRGRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCHQYYTYPLFTIFGQGTKLEIK
162	CEA-HCDR1 (CEACAM5)	DTYMH
163	CEA-HCDR2 (CEACAM5)	RIDPANGNSKYVPKFQG
164	CEA-HCDR3 (CEACAM5)	FGYYVSDYAMAY
165	CEA-LCDR1 (CEACAM5)	RAGESVDIFGVGLH
166	CEA-LCDR2 (CEACAM5)	RASNRAIT
167	CEA-LCDR3 (CEACAM5)	QQTNEPDTY
168	CEA VH (CEACAM5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHWVRQAP GQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVITITADTSTSTAYME LSSLRSEDTAIVYCAFFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSS
169	CEA VL (CEACAM5)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQTNEPDTYFGQGTKLEIK

[0627]

[0628] 다음의 번호가 붙여진 단락(paras)은 본 발명의 양태를 기술한다:

[0629] 1. 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD1)에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 도메인 및 림프구 활성화 유전자 -3(LAG3)에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체로서,

[0630] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

[0631] (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,

[0632] (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및

[0633] (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및

[0634] (i) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,

[0635] (ii) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및

[0636] (iii) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

[0637] 2. 단락 1에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 IgG인 Fc 도메인, 특히 IgG1 Fc 도메인 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함하고, 상기 Fc 도메인은 Fc 수용체, 특히 Fc γ 수용체에 대한 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환

을 포함하는 이중특이적 항체.

3. 단락 1 또는 단락 2에 있어서, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은

- [0638] (a) (i) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0639] (ii) 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0640] (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0641] (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0642] (ii) 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0643] (iii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0644] (b) (i) 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0645] (ii) 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0646] (iii) 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0647] (i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0648] (ii) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0649] (iii) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0650] (c) (i) 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0651] (ii) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0652] (iii) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0653] (i) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0654] (ii) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0655] (iii) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0656] (d) (i) 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0657] (ii) 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0658] (iii) 서열번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0659] (i) 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0660] (ii) 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0661] (iii) 서열번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나,
- [0662] (e) (i) 서열번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
- [0663] (ii) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및
- [0664] (iii) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 VH 도메인, 및
- [0665] (i) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
- [0666] (ii) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
- [0667] (iii) 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.

4. 단락 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은

- [0669] (a) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는

- [0671] (b) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0672] (c) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0673] (d) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0674] (e) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0675] 5. 단락 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0676] (a) 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0677] (b) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0678] (c) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0679] (d) 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0680] (e) 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0681] 6. 단락 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은
- [0682] (a) 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0683] (b) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0684] (c) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인, 또는
- [0685] (d) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0686] 7. 단락 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서,
- [0687] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,
- [0688] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하거나, 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0689] 8. 단락 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서,
- [0690] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,
- [0691] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0692] 9. 단락 1 내지 4 또는 단락 6 중 어느 하나에 있어서,
- [0693] PD1에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및

서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고,

- [0694] LAG3에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 도메인은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0695] 10. 단락 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 인간화 또는 키메라 항체이다.
- [0696] 11. 단락 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 L234A, L235A 및 P329G(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링)의 아미노산 돌연변이가 있는 인간 IgG1 하위계열의 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0697] 12. 단락 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 결합을 촉진하는 변형을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0698] 13. 단락 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 농업 인투 홀 방법에 따라서 Fc 도메인의 제1 아단위는 농업들을 포함하고 Fc 도메인의 제2 아단위는 홀들을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0699] 14. 단락 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fc 도메인의 상기 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W(EU 넘버링)를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 상기 제2 아단위는 Y349C, T366S 및 Y407V(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0700] 15. 단락 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 Fab 단편 및 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 Fab 단편을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0701] 16. 단락 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fab 단편들 중 하나에서, 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되어 상기 VH 도메인이 경쇄의 일부이고 상기 VL 도메인이 중쇄의 일부가 되는 이중특이적 항체.
- [0702] 17. 단락 15 또는 단락 16에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제1 Fab 단편에서, 상기 가변 도메인 VL 및 VH가 서로 치환되는 이중특이적 항체.
- [0703] 18. 단락 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 Fab 단편을 포함하고, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링) 이중특이적 항체.
- [0704] 19. 단락 15 내지 18 중 어느 하나에 있어서, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 제2 Fab 단편에서, 불변 도메인 CL에서, 위치 124의 아미노산이 리신(K), 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)으로 독립적으로 치환되고(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링), 불변 도메인 CH1에서, 위치 147과 213의 아미노산이 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)으로 독립적으로 치환되는(카뱃 EU 인덱스에 따른 넘버링) 이중특이적 항체.
- [0705] 20. 단락 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서,
- [0706] (a) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0707] 서열번호 97의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0708] (b) 서열번호 96의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 98의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0709] 서열번호 100의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0710] (c) 서열번호 102의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 104의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0711] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0712] (d) 서열번호 106의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 107의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,

- [0713] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0714] 21. 단락 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 제3 Fab 단편을 포함하고, 상기 제3 Fab 단편은 LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0715] 22. 단락 1 내지 19 또는 21 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 상기 2개의 Fab 단편이 동일한 이중특이적 항체.
- [0716] 23. 단락 1 내지 19 또는 21 또는 22 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.
- [0717] 24. 단락 1 내지 19 또는 단락 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서,
- [0718] (a) 서열번호 118의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0719] 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0720] (b) 서열번호 120의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0721] 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄, 또는
- [0722] (c) 서열번호 122의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 경쇄,
- [0723] 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0724] 25. 단락 1 내지 19 또는 단락 21 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 제4 Fab 단편을 포함하고, 상기 제4 Fab 단편은 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0725] 26. 단락 1 내지 19 또는 단락 21 내지 23 또는 단락 25 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 상기 2개의 Fab 단편이 동일한 이중특이적 항체.
- [0726] 27. 단락 1 내지 19 또는 단락 21 내지 23 또는 단락 25 또는 단락 26 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 상기 2개의 Fab 단편은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 각각 융합되는 이중특이적 항체.
- [0727] 28. 단락 1 내지 19 또는 단락 21 내지 23 또는 단락 25 내지 27 중 어느 하나에 있어서,
- [0728] (a) 서열번호 114의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0729] (b) 서열번호 116의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제2 경쇄, 또는
- [0730] (c) 서열번호 117의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄, 서열번호 115의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 제1 경쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 제2 경쇄를 포함한다.
- [0731] 29. 단락 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 단일쇄 Fab(scFab)를 포함하는 이중특이적 항체.

- [0732] 30. 단락 1 내지 14 또는 29 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 상기 scFab는 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.
- [0733] 31. 단락 1 내지 14 또는 단락 29 또는 30 중 어느 하나에 있어서,
- [0734] (a) 서열번호 123의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 119의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 101의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0735] (b) 서열번호 124의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 121의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 99의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄, 또는
- [0736] (c) 서열번호 125의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 103의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 105의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0737] 32. 단락 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 Fc 도메인, LAG3에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 각각 포함하는 2개의 Fab 단편 및 PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 VH 및 VL 도메인을 포함하는 이중특이적 항체.
- [0738] 33. 단락 1 내지 14 또는 32 중 어느 하나에 있어서, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VH 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 하나의 C-말단에 융합되고, PD1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인의 상기 VL 도메인은 펩티드 링커를 통해 상기 중쇄들 중 다른 하나의 C-말단에 융합되는 이중특이적 항체.
- [0739] 34. 단락 1 내지 14 또는 단락 32 또는 33 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 126의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제1 중쇄, 서열번호 127의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제2 중쇄, 및 서열번호 109의 서열과 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0740] 35. 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [0741] 36. 단락 35에 따르는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터.
- [0742] 37. 단락 35 또는 단락 36에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포.
- [0743] 38. 단락 1 내지 34의 이중특이적 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 이중특이적 항체의 발현에 적합한 조건하에서 단락 37의 숙주 세포를 배양하는 단계 및 배양물로부터 상기 이중특이적 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법.
- [0744] 39. 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0745] 40. 약제로서 사용하기 위한 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 단락 39의 치료제로서의 사용을 위한 약제학적 조성물.
- [0746] 41. 하기 용도로 사용하기 위한 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 단락 39의 약제학적 조성물:
 - [0747] i) T 세포 활성의 회복과 같은 면역 반응의 조절,
 - [0748] ii) T 세포 반응의 자극,
 - [0749] iii) 감염의 치료,
 - [0750] iv) 암의 치료,
 - [0751] v) 암 진행의 지연,
 - [0752] vi) 암 환자의 생존 연장.
- [0753] 42. 암의 치료에 사용하기 위한 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 단락 39의 약제학적 조성

물.

[0754] 43. 만성 바이러스성 감염의 치료에 사용하기 위한 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 단락 39의 약제학적 조성물.

[0755] 44. 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체 또는 단락 39의 약제학적 조성물로서, 상기 이중특이적 항체는 항암화학요법제, 방사선 및/또는 암 면역치료에 사용하는 기타 제제와 병용 투여되는 이중특이적 항체 또는 약제학적 조성물.

[0756] 45. 개체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법으로서, 단락 1 내지 34 중 어느 하나의 이중특이적 항체의 유효량을 상기 개체에게 투여하여 상기 종양 세포의 성장을 억제하는 단계를 포함하는 방법.

[0757] **실시예**

[0758] 다음은 본 발명의 방법과 조성물의 실시예들이다. 상기에 제공된 일반적인 설명을 고려하여, 다양한 다른 구현예가 실행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0759] **물질 및 일반적 방법**

[0760] 인간 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보가 문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서 제공된다. 상기에 정의된 바와 같이, 항체쇄들의 아미노산은 카바트에 따른 넘버링 시스템에 따라 넘버링되고 지칭된다(Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

[0761] **재조합 DNA 기술**

[0762] 문헌[Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 기술된 바와 같이, 표준 방법들이 DNA를 조작하는 데 사용되었다. 분자생물학의 시약들을 제조사의 지침에 따라 사용하였다.

[0763] **유전자 합성**

[0764] 원하는 유전자 절편을 화학 합성에 의해 만들어진 올리고뉴클레오티드로부터 제조하였다. 단일 제한 엔도뉴클레아제 절단 위치 측면에 배치된 600 ~ 1800 bp 길이의 유전자 절편은, 올리고뉴클레오티드를 PCR 증폭을 비롯하여 어닐링 및 라이게이션함으로써 조립하였으며, 그런 다음, 상기 지시된 제한 부위, 예를 들어 KpnI/SacI 또는 AscI/PacI를 통해, pGA4 클로닝 벡터에 기초한 pPCRScript(Stratagene)내로 클로닝하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. Geneart(Regensburg, 독일)에서 제공되는 설명서에 따라 유전자 합성 단편을 정렬하였다.

[0765] **DNA 서열 결정**

[0766] MediGenomix GmbH(Martinsried, 독일) 또는 Sequiserve GmbH (Vaterstetten, 독일)에서 수행한 이중 가닥 시퀀싱에 의해 DNA 서열을 결정하였다.

[0767] **DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리**

[0768] GCG(Genetics Computer Group, 메디슨, 위스콘신) 소프트웨어 패키지 버전 10.2 및 Infomax's Vector NT1 Advance suite 버전 8.0을 서열의 생성, 맵핑, 분석, 주석 및 도해에 사용하였다.

[0769] **발현 벡터**

[0770] 기술된 항체의 발현을 위해서, CMV-Intron A 프로모터를 갖거나 갖지 않는 cDNA 조직 또는 CMV 프로모터를 갖는 계놈 조직 중 하나에 기초한, 일시적 발현(예를 들어, HEK293에서의 발현) 세포에 대한 발현 플라스미드의 변이체를 사용하였다.

[0771] 항체 발현 카세트 외에도, 상기 벡터는 다음을 함유한다:

[0772] - *E. coli*에서 이러한 플라스미드의 복제를 가능하게 하는 복제 기점, 및

[0773] - *E. coli*에서 암피실린 저항성을 부여하는 β -락타메이즈 유전자.

[0774] 상기 항체 유전자의 전사 단위는 다음 요소들로 구성된다:

- [0775] - 5' 엔드의 고유한 제한 부위(들),
- [0776] - 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 전초기 인핸서 및 프로모터,
- [0777] - 상기 cDNA 조직의 경우에 다음에 이어지는 인트론 A 서열,
- [0778] - 인간 항체 유전자의 5'-비번역 영역,
- [0779] - 면역 글로불린 중쇄 신호 서열,
- [0780] - cDNA 또는 면역 글로불린 엑손-인트론 조직이 있는 게놈 조직 둘 중 하나로서의 (야생형 또는 도메인 교환이 있는) 인간 항체 쇄,
- [0781] - 폴리아데닐화 신호 서열이 있는 3' 비번역 영역, 및
- [0782] - 3' 엔드의 고유한 제한 부위(들).
- [0783] 하기에 기술된 것처럼 항체 쇄들을 포함하는 융합 유전자를 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해 생성하였고, 상응하는 핵산 절편의 연결에 의한 알려진 제조법과 기술로, 예를 들어, 각각의 벡터에 고유한 제한 부위를 사용하여, 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열을 DNA 시퀀싱에 의해 검증하였다. 일시적 형질감염을 위해 더 많은 양의 플라스미드가 변형된 *E. coli* 배양물(Nucleobond AX, Macherey-Nagel)로부터의 플라스미드 제제에 의해 제조하였다.
- [0784] **세포 배양 기술**
- [0785] 표준 세포 배양 기술을 문헌[Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc]에서 기술된 바와 같이 사용하였다.
- [0786] 다중특이적 항체가, 하기에 기술된 바와 같이, 점착하여 성장하는 HEK293-EBNA 또는 현탁액에서 성장하는 HEK29-F 세포에서 각각의 발현 플라스미드의 일시적 공동-형질감염에 의해 발현되었다.
- [0787] **HEK293 시스템에서 일시적 형질감염**
- [0788] 모든 항체 및 이중특이적 항체를 프리 스타일 시스템(ThermoFisher)을 사용하여 293F 세포의 일시적 형질감염에 의해 생성하였다. 여기서 293F 세포를 F17 배지에서 배양하였고, 293Free(Novagene)로 형질감염시켰으며 4시간 후에 VPA 4mM 및 피드(Feed) 7을 공급하였고, 0.6 % 글루코스를 16시간 후에 공급하였다. 또한 Expi293F™ 발현 시스템 키트(ThermoFisher)를 사용하였다. 여기서 Expi293F™ 세포를 Expi293™ 발현 배지에서 배양하였고 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트를 사용하여 제조사의 지침에 따라 형질감염 시켰다. 개선된 안정성과 순도 및 CH1/CL 계면에서 추가적으로 유도된 아미노산의 하전된 쌍이 있는(추가 세부사항에 대해서는 각각 서열에서의 위치를 참조) **CrossMab^{VI-VL}** 이중특이적 항체의 감소된 응집 경향 덕분에 플라스미드 비율의 어떤 조정도 실행되지 않았다. 따라서 1+1 CrossMab의 상대적 플라스미드 비율 1:1:1:1 또는 2+2 CrossMab의 1:1:1을 LC, HC, 교차된 LC 및 교차된 HC 플라스미드의 공동-형질감염에 사용하였다. 세포 상청액을 7일 후 획득하였고 표준 방법에 의해 정제하였다.
- [0789] **단백질 측정**
- [0790] 문헌[Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423]에 따라 아미노산 서열을 기반으로 산출된 몰 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서 광학 밀도(OD)를 측정함으로써 정제된 항체와 유도체들의 단백질 농도를 측정하였다.
- [0791] **상청액에서의 항체 농도 측정**
- [0792] 세포 배양 상청액에서 항체 및 유도체의 농도는 단백질 A 아가로스-비드(로슈)를 사용한 면역침강에 의해 추정하였다. 60 µL 단백질 A 아가로스 비드를 TBS-NP40(50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40)에서 3회 세척하였다. 그런 다음, 세포 배양 상청액 1~15 mL를 TBS-NP40에서 미리 평형화시킨 단백질 A 아가로스 비드에 도포하였다. 실온에서 1시간 동안 비드를 배양한 후에 Ultrafree-MC-필터 컬럼(Amicon) 상에서 TBS-NP40 0.5 mL로 1회, 2x 인산염 완충 식염수(2xPBS, 로슈) 0.5 mL로 2회, 및 100 mM Na-구연산염 pH 5.0 0.5 mL로 간단히 4회 세척하였다. NuPAGE® LDS 샘플 완충액(Invitrogen) 35 µl의 첨가에 의해 결합된 항체를 용출시켰다. 샘플의 절반을 NuPAGE® Sample Reducing Agent와 결합시키거나 비환원 상태로 두고, 각각 70°C에서 10분동안

가열하였다. 그 결과로서, 5~30 μ l는 4~12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen)(비환원성 SDS-PAGE의 경우 MOPS를 사용하고, 환원성 SDS-PAGE의 경우 NuPAGE® Antioxidant running buffer additive (Invitrogen)와 함께 MES 완충액을 사용하여)에 뿌리고 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색하였다.

[0793] 세포 배양 상청액에서 항체와 유도체의 농도를 친화성 HPLC 크로마토그래피에 의해 정량적으로 측정하였다. 간략히, 단백질 A에 결합하는 항체와 유도체를 함유하는 세포 배양 상청액은 200 mM KH₂PO₄, 100 mM 구연산 나트륨, pH 7.4의 Applied Biosystems Poros A/20 컬럼에 도포하였고, Agilent HPLC 1100 시스템에서 200 mM NaCl, 100 mM 구연산, pH 2.5를 이용하여 매트릭스로부터 용출시켰다. 용출된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적 적분에 의해 정량화하였다. 정제된 표준 IgG1 항체가 표준으로 사용하였다.

[0794] 대안으로, 세포 배양 상청액에서 항체와 유도체의 농도를 Sandwich-IgG-ELISA에 의해 측정하였다. 간략히, StreptaWell High Bind Streptavidin A-96 웰 마이크로티터 플레이트(로슈)를 0.1 μ g/mL로 실온에서 1시간 동안 또는 대안으로 4°C에서 밤새 100 μ L/웰 비오틴닐화 항-인간 IgG 포획 분자 F(ab')₂-Fc γ BI(Dianova)로 코팅하고, 그런 다음 200 μ L/웰 PBS, 0.05% Tween(PBST, Sigma)으로 3회 세척하였다. 세포 배양 상청액을 함유한 각 항체의 PBS(Sigma)에서 100 μ L/웰의 희석계열을 웰에 첨가하였고 실온에서 1-2시간 동안 미량정량관 진탕기 상에서 배양하였다. 상기 웰을 200 μ L/웰 PBST로 3회 세척하였고, 결합 항체는, 100 μ l F(ab')₂-Fc γ POD (Dianova)를 사용하여 실온에서 1~2시간 동안 0.1 μ g/mL로 미량정량관 진탕기 상에서 검출 항체로서 검출하였다. 미결합 검출 항체를 200 μ L/웰 PBST로 3회 세척하였고 상기 결합 검출 항체를 100 μ L ABTS/웰을 첨가해서 검출하였다. 흡광도의 측정은 테칸 플루오르 분광기(Tecan Fluor Spectrometer) 상에서 405 nm의 측정 파장(기준 파장 492 nm)으로 수행하였다.

[0795] **단백질 정제**

[0796] 표준 프로토콜을 참조하여, 여과된 세포 배양 상청액으로부터 단백질을 정제하였다. 간략하게, 항체들을 단백질 A 세파로스 컬럼(GE 헬스케어)에 도포하고 PBS로 세척하였다. 항체의 용출을 pH 2.8에서 달성한 후 샘플을 즉시 중화시켰다. 응집된 단백질을 PBS 중에서 또는 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl pH 6.0 중에서 크기 배제 크로마토그래피(슈퍼덱스(Superdex) 200, GE 헬스케어)에 의해 단량체성 항체들로부터 분리하였다. 단량체성 항체 분획들을 모으고, (필요한 경우) 예를 들어, 밀리포어 아미콘 울트라(MILLIPORE Amicon Ultra)(30 MWCO) 원심분리 농축기를 사용하여 농축시키고, 냉동시키고 -20°C 또는 -80°C에서 저장하였다. 예를 들어, SDS-PAGE, 크기 배제 크로마토 그래피(SEC) 또는 질량 분석법에 의한 후속의 단백질 분석 및 분석 특성화를 위해 샘플 일부를 제공하였다.

[0797] **SDS-PAGE**

[0798] NuPAGE® 프리-캐스트(Pre-Cast) 겔 시스템(인비트로젠(Invitrogen))을 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 특히, 10% 또는 4 내지 12% NuPAGE® 노백스(Novex®) 비스-트리스(Bis-TRIS) 프리-캐스트 겔(pH 6.4) 및 NuPAGE® MES(환원 겔, NuPAGE® 산화방지제 실행 완충액(running buffer) 첨가제 사용) 또는 MOPS(비-환원 겔) 실행 완충액을 사용하였다.

[0799] **분석용 크기 배제 크로마토그래피**

[0800] 항체들의 응집 및 올리고머 상태를 측정하기 위한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 HPLC 크로마토그래피로 수행하였다. 간략하게, 단백질 A 정제된 항체를 애질런트(Agilent) HPLC 1100 시스템 상에서 300 mM NaCl, 50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5 중에서 토소(Tosoh) TSK겔 G3000SW 컬럼에 도포하거나, 디오넥스 HPLC-시스템상에서 2 x PBS 중에서 슈퍼덱스 200 컬럼(GE 헬스케어)에 도포하였다. 용출된 단백질을 UV 흡광도 및 피크 면적 적분에 의해 정량화하였다. 바이오라드 겔 여과 표준(BioRad Gel Filtration Standard) 151-1901을 표준으로 사용하였다.

[0801] **질량 분석법**

[0802] 본 섹션은 이의 정확한 조립을 강조하여 VH/VL 교환(VH/VLCrossMab)을 갖는 다중특이적 항체의 특징 규명을 기술한다. 탈글리코실화된 온전한 CrossMab 및 탈글리코실화/플라스민 절단되거나 양자택일적으로 탈글리코실화/제한 LysC 절단된 CrossMab의 전자분무 이온화 질량 분석법(ESI-MS)에 의해 예상된 1차 구조를 분석하였다.

[0803] 37°C에서 1 mg/mL의 단백질 농도에서 포스페이트 또는 트리스 완충액 중에서 N-글리코시다제 F를 사용하여 17시간 이하 동안 VH/VL CrossMab을 탈글리코실화시켰다. 플라스민 또는 제한 LysC(로슈) 절단은 각각 실온에서 120시간 동안 및 37°C에서 40분 동안, 트리스 완충액 pH 8 중에서 100 μ g 탈글리코실화 VH/VL CrossMab을 사용하

여 수행하였다. 질량 분석 전에, 샘플들을 세파텍스 G25 컬럼(GE 헬스케어) 상에서 HPLC에 의해 탈염시켰다. 트라이버사 나노메이트(TriVersa NanoMate) 광원(애드비온(Advion))이 장착된 maXis 4G UHR-QTOF MS 시스템(브루커 달토닉(Bruker Daltonik)) 상에서 ESI-MS에 의해 총 질량을 측정하였다.

[0804] **표면 플라즈몬 공명(SPR) (BIACORE)을 사용한 다중특이적 항체의 결합과 결합 친화도의 측정**

[0805] 생성된 항체들의 각각의 항원들에 대한 결합을 비아코어 기기(GE 헬스케어 바이오사이언시즈 AB, 스웨덴 옴살라)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사하였다. 센서그램의 분석 및 친화도 데이터의 산출을 위해 각각의 비아코어 평가 소프트웨어를 이용하였다.

[0806] **실시예 1**

[0807] **항-PD-1 항체의 생성**

[0808] **마우스의 면역화**

[0809] 100 µg 벡터 DNA(플라스미드15300_hPD1-f1)를 피내 적용한 후, 전기천공(1,000 V/cm, 기간 0.1 ms, 간격 0.125 s의 2회 사각펄스; 그런 다음 287.5 V/cm, 기간 10 ms, 간격 0.125 s의 4회 사각펄스)에 의해 전장 인간 PD-1을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터를 사용하여, NMRI 마우스를 유전적으로 면역화시켰다. 마우스들은 0, 14, 28, 42, 56, 70 및 84일에 6회 연속 면역접종을 받았다. 36일, 78일 및 92일에 채혈하여 혈청을 준비하였고, 준비된 혈청을 ELISA(하기 참조)에 의한 역가 측정에 사용하였다. 최고 역가를 갖는 동물들을 96일에 50 µg의 재조합 인간 PD1 인간 Fc 키메라의 정맥내 주사에 의한 추가접종을 위해 선별하고, 추가접종 3일 후에 비장세포를 골수종 세포주에 융합시켜, 하이브리도마 기술에 의해 단클론 항체를 단리하였다.

[0810] **혈청 역가의 측정(ELISA)**

[0811] 재조합 인간 PD1 인간 Fc 키메라를 PBS 중 0.3 µg/mL, 100 µL/웰로 96-웰 눈크 맥시소프(NUNC Maxisorp) 플레이트 상에 고정시킨 후: PBS, 200 µL/웰 중 2% 크로테인 C(Crotein C)로 플레이트를 차단하고; PBS, 100 µL/웰 중 0.5% 크로테인 C 중에서 항혈청의 연속 희석물을 2중으로 적용하고; HRP-접합된 염소 항-마우스 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)/디아노바(Dianova) 115-036-071; 1/16 000)로 검출하였다. 모든 단계에서, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 모든 단계들 사이에, 플레이트를 PBS 중 0.05% Tween 20으로 3회 세척하였다. 신호는 BM Blue POD Substrate soluble(로슈), 100 µl/웰의 첨가로 발생되었고; 1 M HCl, 100 µl/웰의 첨가로 중단되었다. 흡광도는 690 nm를 기준으로, 450 nm에서 판독되었다. 역가는 반-최대 신호를 야기하는 항혈청의 희석률로 정의되었다.

[0812] **실시예 2**

[0813] **항-PD1 항체의 특징화/항-PD1 항체의 인간 PD1에 대한 결합**

[0814] **인간 PD1에 관한 ELISA**

[0815] 눈크 맥시소프 스트랩타비딘 코팅된 플레이트(마이크로코트(MicroCoat) #11974998001)를 25 µL/웰 비오티닐화 PD1-ECD-AviHis로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL 항 PD1 샘플 또는 참조 항체(인간 항 PD1; 로슈/마우스 항-PD1; 바이오레전드(Biolegend); 카달로그 번호 329912)를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)/양-항-마우스-POD(GE 헬스케어; NA9310)를 1:2000/1:1000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질(로슈 카달로그 번호 11835033001)을 첨가하고 2 내지 3의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다.

[0816] 세포 ELISA 결과는 하기 표 1 및 2에 요약하여 EC50-값(ng/mL)으로서 열거되어 있다.

[0817] **PD1에 대한 세포 ELISA**

[0818] 부착성 CHO-K1 세포주를 전장 인간 PD1을 코딩하는 플라스미드 15311_hPD1-f1_pUC_Neo로 안정하게 형질감염시키고, G418(플라스미드 상의 네오마이신 내성 마커)을 사용하여 선별하고 384-웰 바닥이 편평한 플레이트에 0.01x10E6 세포/웰의 농도로 접종하고 밤새 성장시켰다.

[0819] 다음날, 25 µL/웰의 PD1 샘플 또는 인간 항-PD1(로슈)/마우스 항-PD1(바이오레전드; 카달로그 번호 329912) 참조 항체를 첨가하고 4°C에서(내재화를 방지하기 위해) 2시간 동안 배양하였다. 조심스럽게 세척(1x90 µL/웰

PBST)한 후, 1xPBS-완충액에 희석된 30 μL/웰 0.05% 글루타르알데하이드(시그마(Sigma), 카탈로그 번호 G5882, 25%)를 첨가하여 세포를 고정시키고 실온에서 10분 동안 배양하였다. 세척(3x90 μL/웰 PBST)한 후, 검출을 위해 25 μL/웰의 2차 항체: 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)/양-항-마우스-POD(GE Na9310)를 첨가한 다음 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(3x90 μL/웰 PBST) 후에, 25 μL/웰 TMB 기질용액(로슈 11835033001)을 첨가하고 1.0 내지 2.0의 OD까지 배양하였다. 플레이트를 370/492 nm에서 측정하였다.

[0820] 세포 ELISA 결과는 하기 표 2에 요약하여 "EC50 CHO-PD1"-값(ng/mL)으로 열거되어 있다.

[0821] **cyno PD1에 관한 ELISA**

[0822] 눈크 맥시소프 스트렙타비딘 코팅된 플레이트(마이크로코트 #11974998001)를 25 μL/웰 비오티닐화 cyno PD1-ECD-비오티닌으로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL 항-PD1 샘플 또는 참조 항체(인간 항 PD1; 로슈)를 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)를 1:1000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 3의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다.

[0823] ELISA 결과는 하기 표 1 및 2에 요약하여 EC50-값(ng/mL)으로서 열거되어 있다.

[0824] **PD 리간드 1 치환 분석**

[0825] 눈크 맥시소프 스트렙타비딘 코팅된 플레이트(마이크로코트 #11974998001)를 25 μL/웰 비오티닐화 PD1-ECD-AviHis로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL 항-PD1 샘플 또는 참조 항체(마우스 항-PD1; 바이오레전드; 카탈로그 번호 329912)를 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 PD-L1(재조합 인간 B7-H1/PD-L1 Fc 키메라; 156-B7, R&D)을 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)를 1:1000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 3의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다.

[0826] ELISA 결과는 하기 표 2에 요약하여 IC50-값(ng/mL)으로서 열거되어 있다.

[0827] **PD 리간드 2 치환 분석**

[0828] 눈크 맥시소프 스트렙타비딘 코팅된 플레이트(마이크로코트 #11974998001)를 25 μL/웰 비오티닐화 PD1-ECD-AviHis로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL 항-PD1 샘플 또는 참조 항체(인간 항 PD1; 로슈)를 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 PD-L2(재조합 인간 B7-DC/PD-L2 Fc 키메라; 1224-PL-100, R&D)을 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)를 1:2000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 3의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다.

[0829] ELISA 결과는 하기 표 2에 요약하여 IC50-값(ng/mL)으로서 열거되어 있다.

[0830] **에피토프 매핑 ELISA/결합 경쟁 분석**

[0831] 눈크 맥시소프 플레이트(눈크c #464718)를 25 μL/웰 포획 항체(염소 항 마우스 IgG; JIR; 115-006-071)로 코팅하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 플레이트를 실온에서 진탕기 상에서 2% BSA 함유 PBS 완충액으로 1시간 동안 차단하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL 마우스 항-PD1 샘플을 첨가하고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 포획 항체를 실온에서 진탕기 상에서 30 μL/웰 마우스 IgG(JIR; 015-000-003)로 1시간 동안 차단하였다. 동시에 비오티닐화 PD1-ECD-AviHis를 실온에서 진탕기 상에서 제2 샘플 항체와 함께 1시간 동안 예비 배양하였다. 분석 플레이트를 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰)한 후에, PD1 항체 혼합물을 분석 플레이트로 옮기고 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)를 1:4000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진

탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μ L/웰) 후에, 25 μ L/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 1.5 내지 2.5의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다. 에피토프 군들은 참조 항체에 대한 계층적 군집화(hierarchical clustering)에 의해 정의되었다.

표 1

예시적 항체의 결합, PD-L1 저해 및 에피토프 영역 군(ELISA)

항체	ELISA huPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA PD-L1 저해 IC ₅₀ [ng/ml]	ELISA PD-L2 저해 IC ₅₀ [ng/ml]	에피토프 영역군 (경쟁 분석에 의함)
PD1-0050	17.9	9.8	128	34	1
PD1-0069	45.7	22.7	225	89	6
PD1-0073	15.1	8.3	124	65	5
PD1-0078	26.3	22.4	x	86	2
PD1-0098	50.8	54.6	174	45	5
PD1-0102	34.2	52.7	>35.5 μ g/ml	140	4
PD1-0103	33.7	36.9	182	51	5

[0832]

표 2

모 마우스 항체 PD1-0103에서 유도된 인간화 PD1 항체의 생화학적- 및 세포-결합(ELISA)

인간화 항체	ELISA huPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC ₅₀ [ng/ml]	ELISA CHO-PD1 EC ₅₀ [ng/ml]
PD1-103-0312	11	8.3	10.1
PD1-103-0313	15	11	10.8
PD1-103-0314	11	8.3	7.7
PD1-103-0315	10	7.9	7.3

[0833]

[0834] 인간화 항-PD-1 항체의 비아코어 특징규명

[0835] 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기반 분석을 이용하여 여러 쥐 PD1 바인더뿐 아니라 상업적인 인간 PD1 결합 참조 항체 사이의 결합의 동적 파라미터를 측정하였다. 따라서, 항-인간 IgG를 CM5 센서 칩(비아코어)의 표면에 아민 커플링시킴으로써 고정시켰다. 상기 샘플을 포획하고, hu PD1-ECD를 상기 샘플들에 결합시켰다. 센서 칩 표면은 매 분석 주기 후에 재생시켰다. 데이터를 1:1 랭뮤어 상호작용 모델에 맞추므로써 평형 상수 및 동적 속도 상수

를 최종적으로 수득하였다.

- [0836] 20 µg/mL 항-인간 IgG의 약 2000 반응 단위(RU)(GE 헬스케어 #BR-1008-39)를, GE 헬스케어에서 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 pH 5.0에서 비아코어 T200에서 CM5 센서 칩의 유동 세포 1 및 2(대안으로, 3 및 4) 상에 결합하였다.
- [0837] 샘플 및 실행 완충액은 HBS-EP+(0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4)이었다. 유동 세포 온도는 25°C로 설정하였고 샘플 구획 온도는 12°C로 설정하였다. 시스템은 실행 완충액으로 작동 준비되었다.
- [0838] 샘플을 10 nM의 농도로 20초 동안 주입하여 제2 유동 세포에 결합시켰다. 그런 다음, 인간 PD1-ECD 농도(144 nM, 48 nM, 16 nM, 5.33 nM, 1.78 nM, 0.59 nM, 0.20 nM 및 0 nM)의 완전한 세트를 각 샘플에 대해 120초 동안 주입한 후, 30/300초의 해리 시간 및 3 M MgCl₂를 사용한 두 번의 20초 재생 단계가 이어졌으며, 상기 두 번의 재생 단계 중 마지막 단계는 실행 완충액으로 "주입후 추가 세척"을 포함하였다.
- [0839] 최종적으로, 이종의 기준 데이터를 비아코어 T200 평가 소프트웨어(Evaluation Software)를 사용하여 1:1 랭뮤어 상호작용 모델에 맞추었다.
- [0840] 수득된 KD, k_a 및 k_d 값들을 표 3에 나타낸다.

표 3

비아코어에 의해 측정된 키메라 PD1-0103 및 인간화 PD1-Abs의 동적 속도 상수 및 평형 상수

리간드	$k_a [M^{-1}s^{-1}]$	$k_d [s^{-1}]$	$K_D [nM]$
키메라 PD1-0103	3.86E+05	3.07E-04	0.8
PD1-0103-0312	1.95E+05	3.45E-04	1.8
PD1-0103-0313	1.60E+05	3.67E-04	2.3
PD1-0103-0314	1.87E+05	2.79E-04	1.5
PD1-0103-0315	1.89E+05	2.91E-04	1.5

- [0841]
- [0842] 표 3에 나타낸 바와 같이, 키메라 PD1-0103의 인간화 변이체들(생성은 실시예 6 참조) 모두 모 항체(키메라 PD1-0103)와 유사한 동적 성질들을 나타낸다.
- [0843] **역학**
- [0844] CM5 센서 시리즈 S를 비아코어 4000 시스템에 장착하고 검출 스팟을 제조사의 지침에 따라 유체역학적으로 지정하였다.
- [0845] 다클론 토끼 IgG 항체 <IgGFC γM>R (잭슨 이뮤노리서치 래버러토리즈 인코포레이티드(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.))를 10000 Ru에서 유동 세포 1,2,3 및 4 중의 검출 스팟 1 및 5 상에 고정시켰다. 커플링은 EDC/NHS 화합물을 제조사의 지침에 따라 사용하여 수행하였다. 유동 세포들 중 남은 스팟들은 기준의 역할을 하였다. 샘플 완충액은 1 mg/mL 카복시메틸렉스트란이 보충된 시스템 완충액이었다.
- [0846] 일 구현예에서, 분석을 25°C에서 수행하였다. 또 다른 구현예에서, 분석을 37°C에서 수행하였다. 50 nM의 각 쿼의 단클론 항체는 10 µL/분으로 1분 동안 주입시켜 센서 표면 상에 포획하였다. 그런 다음, 각각의 항원들을 100 nM, 2x 33 nM, 11 nM, 4 nM, 1 nM 및 시스템 완충액 0 nM의 일련의 농도로 30 µL/분으로 4분의 결합상 시간 동안 주입하였다. 추가 4분 동안 해리를 모니터링하였다. 포획 시스템은 30 µL/분으로 10 mM 글리신(pH 1.5)의 3분 주입을 이용하여 재생되었다. 비아코어 평가 소프트웨어를 제조사의 지침에 따라 사용하여 관련된 동적 데이터를 산출하였다.
- [0847] **에피토프 맵핑**
- [0848] 비아코어 4000 기기에 비아코어 CAP 센서를 장착하고 제조사가 권장한 바와 같이 제조하였다. 기기 완충액은 HBS-ET(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% w/v Tween 20)이었다. 기기는 25°C에서 운전되었다.

[0849] 모든 샘플을 시스템 완충액에 희석하였다. 35 kDa 비오틴화 항원 PD1-ECD-AviHis를 200 RU에서 유동 세포 1, 2, 3 및 4 중의 스팟 1 및 5에서 30 μ L/분으로 1분 동안 주입시켜 CAP 센서 표면 상에서 포획하였다. 스팟 2, 3 및 4는 기준의 역할을 하였다. 또 다른 구현예에서, 35 kDa 비오틴화 항원 PD1-ECD-AviHis를 200 Ru에서 동일한 방식으로 CAP 센서 상에서 포획하였다.

[0850] 그런 다음, 1차 항체를 100 nM에서 30 μ L/분으로 3분 동안 주입한 후 2차 항체를 100 nM에서 30 μ L/분으로 3분 동안 주입하였다. 1차 항체는 표면 제시된 항원이 완전히 포화될 때까지 주입하였다. 1차 및 2차 항체 주입 단계의 마지막에, 각 항체들의 결합 반응을 모니터링하기 위해 기록점 "말기 결합"(BL)을 설정하였다. 2차 항체 결합 반응 "BL2"와 1차 항체 반응 "BL1" 사이의 비율인 물비를 산출하였다. 상기 물비는, 항원이 이미 1차 항체에 의해 복합체화된 경우, 2차 항체의 항원 접근성의 지표로서 사용되었다.

[0851] 복합체들은, 2M 구아니딘-HCL 250 mM NaOH 재생 완충액을 제조사에서 권장한 대로 30 μ L/분으로 2분 동안 주입한 후, 시스템 완충액을 30 μ L/분으로 1분 동안 주입시켜 센서 표면으로부터 완전히 제거하였다.

[0852] **실시예 3**

[0853] **혼합된 림프구 반응(MLR)에서 사이토킨 생산에 대한 상이한 항-PD1 항체의 효과**

[0854] **3A)** 혼합 림프구 반응(MLR)은 한 개체(공여자 X)로부터 또 다른 개체(공여자 Y)의 림프구까지 림프구의 활성화를 측정하는 면역 세포 분석법이다. 혼합 림프구 반응을 이용하여 림프구 효과기 세포에 대한 PD1 경로 차단 효과의 효과를 입증하였다. 분석에서는 T 세포를 항-PD1 mAb의 존재 또는 부재 하에서 활성화 및 그의 IFN γ 분비에 대해 검사하였다.

[0855] 동종이계 MLR을 수행하기 위해, 미지의 HLA 유형을 갖는, 적어도 4명의 건강한 공여자들로부터의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를, 류코셉(Leukosep)(그레이너 바이오 원(Greiner Bio One), 227 288)을 이용한 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하였다. 간략하게, 헤파린 첨가 혈액 샘플을 3배 부피의 PBS로 희석하고, 희석된 혈액 25 mL 분취량을 50 mL 류코셉 튜브에 적층시켰다. 실온에서 800 x g에서 15분 동안 원심분리(휴지 없이) 후에, 림프구 함유 분획들을 수거하고, PBS에 세척하고, 기능 분석에 직접 사용하거나 냉동 배지(10% DMSO, 90% FCS)에 1.0E+07 세포/mL로 재현탁하고 액체 질소 중에 저장하였다. 2명의 상이한 공여자들로부터의 PBMC를 1:1 자극자/반응자 세포 비로 혼합함으로써 개별적인 2-방향 MLR 반응을 설정하였고, 상이한 농도 범위의, 정제된 항-PD1 단클론 항체들 PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103의 존재 또는 부재 하에, 37°C, 5% CO₂에서 바닥이 편평한 96-웰 플레이트에서 적어도 2중으로 공배양을 6일 동안 수행하였다. 참조 항-PD1 항체로서, 니볼루맵(MDX-5C4 또는 MDX-1106으로도 알려져 있음) 또는 펌브롤리주맵(MK-3475 또는 Org 1.09A로도 알려져 있음)의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체를 합성하고, 인간 IgG1(돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바의 EU 인덱스) 포함)의 골격과 함께 클로닝하였다. 음성 대조군으로서 항체를 사용하지 않거나 이소타입 대조군 항체를 사용하였으며, rec hu IL-2(20 EU/mL)를 양성 대조군으로 사용하였다. 6일 후에, 사이토카인 측정을 위해 각 배양물로부터 100 μ L의 배지를 취하였다. IFN-감마의 수준을 OptEIA ELISA 키트(BD 바이오사이언시즈)를 사용하여 측정하였다.

[0856] 결과를 표 4(IFN γ 분비/방출)에 나타낸다. 항-PD1 단클론 항체는 T 세포 활성화 및 IFN-감마 분비를 농도 의존적 방식으로 촉진하였다. IFN γ 분비의 % 증가율의 값은, 어떤 차단 mAb도 첨가하지 않고 MLR의 IFN γ 생성에 대해 산출하였고((E-c로서 기저 동종이계 자극 유도된 IFN γ 값), 20 EU/mL rec hu IL-2의 첨가 하에 MLR의 IFN γ 생성에 대해 산출하였으며(양성 대조군 = E+c로서 100% IFN γ 값), 다음 식에 따라 산출하였다: 상대 자극[%] = ((실시예 - E-c)/(E+c - Ec)*100

표 4

양성 대조군으로서 재조합 인간 IL-2 처리(20 EU/mL)(= 100% 증가)의 효과와 비교시 동종이계 자극 및 항-PD-1 항체로 처리후 IFN 감마 분비의 백분율

	농도(μg/ml)	1:12	1:120	1:1200	MLR에서의 효과
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

[0857]

[0858]

여러 PD1 차단 항체들 PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103은 인터페론 감마(IFN γ)의 분비를 증대시킴으로써 강한 면역 조절 활성을 나타냈다(모든 항체들에 대해 데이터를 나타내지는 않음).

[0859]

3B) 또 다른 실험에서, 키메라 PD1-0103(돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 인덱스)를 갖는 인간 IgG1 이소타입)을 평가하였다. 키메라 PD1-0103에 의한 PD1의 차단은 동종이계 자극 1차 인간 T 세포에 의한 IFN-감마 분비를 크게 증대시킨다. 키메라 PD1-0103은 참조 항-PD1 항체들보다 효능이 더 강했다. 비교를 위해, 인간 IgG1(돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 인덱스)가 있음)의 골격으로 니볼루맵(MDX-5C4 또는 MDX-1106으로도 알려져 있음) 및 펌브롤리주맵(MK-3475 또는 Org 1.09A로도 알려져 있음) 중 어느 하나의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 참조 항-PD1 항체를 합성하고, 클로닝하였다.

[0860]

3C) 추가 실험에서, 항-PD-1 항체 PD1-0103의 인간화 변이체들(도 2 및 3에서, 인간화 항체 PD1-0103-0312, PD1-0103-0314, 및 하기 실시예 9를 참조)의 면역 조절 활성, a) IFN γ 방출(분비), b) TNF-알파 방출(분비)을 전술한 바와 같이 MLR에서 평가하였다. 키메라 PD1-0103 항체 및 그의 인간화 변이체들의 효과를, 인간 IgG1(돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 인덱스) 포함)의 골격과 함께 니볼루맵(MDX-5C4 또는 MDX-1106으로도 알려져 있음) 및 펌브롤리주맵(MK-3475 또는 Org 1.09A로도 알려져 있음)의 어느 하나의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 참조 항-PD1 항체와 비교하였다. MLR 배양 6일 후에, 50 μL의 상청액을 취하고 바이오-플렉스 프로(Bio-Plex Pro™) 인간 사이토카인 Th1/Th2 분석법(바이오-레드 래버러토리즈 인코포레이티드(Bio-Rad Laboratories Inc.))을 이용하여 여러 사이토카인들을 단일 배양물 중에서 측정하였다(모든 사이토카인에 대해 데이터를 나타내지는 않음). 키메라 PD1-0103 항체 및 그의 인간화 변이체들(PD1-0103_0312 및 PD1-0103_0314)은 T 세포 활성화 및 IFN-감마 분비를 증대시키는 데 있어서, 참조 항-PD1 항체들에 비해 효능이 더 강했다. 또한, 키메라 PD1-0103 항체 및 그의 인간화 변이체들은 항원 제시 세포에 의한 종양 괴사 인자 알파(TNF 알파) 및 IL-12 분비를 증가시키고, T 세포를 자극하는 단핵구/대식세포 또는 항원 제시 세포의 능력을 증대시킨다.

[0861]

실시예 4

[0862]

동종이계 성숙 수지상 세포와 함께 배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출 및 IFN- γ 분비에 대한 항-PD1 차단의 효과

[0863]

동종이계 배경에서 항-PD-1 처리의 효과를 더 조사하기 위해, 새로 정제된 CD4 T 세포를 단핵구-유래 동종이계 성숙 수지상 세포(mDC)의 존재 하에서 5일 동안 공배양하는 분석법을 개발하였다. 1주 전에 플라스틱 부착을 통해 새 PBMC로부터 단핵구를 단리한 후, 비-부착 세포를 제거하였다. 그런 다음, 이들을 GM-CSF(50 ng/mL) 및 IL-4(100 ng/mL)를 함유하는 배지 내에서 5일 동안 배양하여 단핵구들로부터 미성숙 DC를 생성하였다. iDC 성숙을 유도하기 위해, 배양 배지에 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6(각각 50 ng/mL)을 추가 2일 동안 첨가하였다. 그런 다음, 유세포분석(LSRFortessa, BD 바이오사이언시즈)을 통해 주 조직적합성 복합체 클래스 II(MHCII), CD80, CD83 및 CD86의 표면 발현을 측정함으로써 DC 성숙을 평가하였다.

[0864]

최소 혼합 림프구 반응(mMLR) 당일에, 비관련 공여자로부터 획득된 10⁸개 PBMC로부터 마이크로비드 키트(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))을 통해 CD4 T 세포를 농축시켰다. 배양 전에, CD4 T 세포를 5 μM의 카복시-플루오레세인-숙신이미딜 에스터(CFSE)로 표지하였다. 그런 다음, 도면에서 달리 나타내지 않는 한, 10 μg/mL의 농도에서, 차단 항-PD1 항체(PD1-0103, 키메라 PD1-0103, 또는 0312, 0313, 0314, 0315로 약칭되어 있는 인간화 항

체 PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315)의 존재 또는 부재 하에, 10⁵개의 CD4 T 세포를 성숙 동종이계-DC와 함께(5:1) 96 웰 플레이트에 플레이팅하였다.

[0865] 5일 후에, 세포-배양 상청액을 수거하고, 나중에 ELISA(R&D systems)에 의해 IFN- γ 수준을 측정하기 위해 사용하였다. 세포를 37°C에서 골지 플러그(Golgi Plug)(브레펠딘(Brefeldin) A) 및 골지 스탱(Golgi Stop) (모넨신(Monensin))의 존재 하에서 5시간 동안 더 방치하였다. 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸(Live/Dead) 정착성 염료 아쿠아(Aqua)(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄(Fix/Perm) 완충액(BD 바이오사이언스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언스), IFN- γ 및 IL-2(둘 다 e바이오사이언스 제품)에 대한 세포내 염색을 수행하였다.

[0866] 모든 PD1-0103의 인간화 변이체들(0312, 0313, 0314, 0315로 약칭되어 있는 인간화 항체 PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315)이 그랜자임 B 및 인터페론 감마를 증대시키는데 있어서 동일하게 우수함을 밝혀냈다(데이터 나타내지 않음).

[0867] **실시예 5**

[0868] **키메라 PD1 항체 유도체**

[0869] 항-PD1 마우스 항체 PD1-0098, PD1-0103의 가변 중쇄 및 경쇄 영역들을 PCR을 통해 증폭시키고, 이들을, 효과기 기능을 제거하는 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 인덱스)(류신 234가 알라닌으로, 류신 235가 알라닌으로, 프롤린 329가 글리신으로 치환됨)를 갖는 인간 IgG1 골격/인간 CH1-힌지-CH2-CH3과의 융합 단백질로서 중쇄 발현 벡터 내에 클로닝시키고 인간 C-카파에 융합 단백질로서 경쇄 발현 벡터 내에 클로닝시켜 키메라 PD1 항체들을 생성하였다. 그런 다음, LC 및 HC 플라스미드를 HEK293에 공동 형질감염시키고, 7일 후에 항체 정제에 대한 표준 방법으로 상청액으로부터 정제하였다. 상기 키메라 PD1-항체들은 키메라 chiPD1-0098(chiPD1-0098) 및 키메라 PD1-0103(chiPD1-0103)으로 다시 명명하였다. 비교를 위해, 인간 IgG1(돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(카바트의 EU 인덱스)가 있음)의 골격으로 니볼루맵(MDX-5C4 또는 MDX-1106으로도 알려져 있음) 및 펌브롤리주맵(MK-3475 또는 Org 1.09A로도 알려져 있음) 중 어느 하나의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 참조 항-PD1 항체를 합성하고, 클로닝하였다.

[0870] **실시예 6**

[0871] **항-PD1 항체 PD-0103의 인간화 변이체(huMab PD-0103)의 생성, 발현 및 정제, 및 특징규명**

[0872] 쥐 항-PD1 항체 0103의 VH 및 VL 도메인의 인간화

[0873] 쥐 항-PD1 항체 0103의 쥐 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열(서열번호 7 및 8)을 기반으로, 인간화 항-항-PD1 항체 변이체들을 생성하였다.

[0874] 인간화 VH-변이체는 여러 개의 돌연변이를 갖는 인간 J-요소 생식계열IGHJ5-01과 함께 인간 생식계열IMGT_hVH_3_23을 기반으로 한다(서열번호 9 생성).

[0875] VL의 인간화 변이체는 인간 J-요소 생식 계열IGKJ1-01과 함께 인간 생식 계열IMGT_hVK_4_1, IMGT_hVK_2_30, IMGT_hVK_3_11 및 IMGT_hVK_1_39를 기반으로 한다. 상이한 돌연변이들에 의해 서열번호 10 내지 서열번호 13의 인간화 변이체들이 생성되었다.

[0876] PD1-0103의 중쇄 및 경쇄 가변 영역들에 대한 인간화 아미노산 서열들을 DNA로 역-번역하고, 생성된 cDNA를 합성(젠아트(GenArt))한 다음, 효과기 기능을 제거하는 LALA 및 PG 돌연변이(류신 234가 알라닌으로, 류신 235가 알라닌으로, 프롤린 329가 글리신으로 치환됨)를 갖는 인간 IgG1 골격/인간 CH1-힌지-CH2-CH3과의 융합 단백질로서 중쇄 발현 벡터 내에 클로닝시키거나 인간 C-카파에 융합 단백질로서 경쇄 발현 벡터 내에 클로닝시켰다. 그런 다음, LC 및 HC 플라스미드를 HEK293에 공동 형질감염시키고, 7일 후에 항체 정제에 대한 표준 방법으로 상청액으로부터 정제하였다. 생성된 인간화 PD1-항체들은 다음과 같이 명명하였다:

표 5

PD1-0103의 인간화 변이체 항체들의 VH 및 VL 서열

PD1-0103의 인간화 항체	VH/서열번호의 인간화 변이체:	VL/서열번호의 인간화 변이체:
PD1-0103-0312	서열번호 9	서열번호 10
PD1-0103-0313	서열번호 9	서열번호 11
PD1-0103-0314	서열번호 9	서열번호 12
PD1-0103-0315	서열번호 9	서열번호 13

[0877]

[0878]

인간화 PD1-0103의 항체 변이체들 및 모 키메라 PD1-0103을 상기한 바와 같이 특징을 규명하였다. 결과를 표 6에 나타낸다.

표 6

인간화 PD1-0103 항체 변이체 및 모 키메라 PD1-0103에 대한 결과의 요약

분석	키메라 PD1-0103	PD-0103-0312	PD-0103-0313	PD-0103-0314	PD-0103-0315
친화도 K_D 37°C [nM]	2.0 / 0.8	1.5 / 1.8	1.9 / 2.3	1.6 / 1.5	1.7 / 1.5
ELISA EC ₅₀ [nM]	0,2	0,1	0,07	0,07	0,06
CHO-PD1 EC ₅₀	+	+	+	+	+
IC ₅₀ PD-L1, 2 [nM]	1,35	tbd	tbd	tbd	tbd
혼합 림프구 반응 분석	+++	+++	+++	++++	++
게막이원충이 교차반응성 (EC ₅₀ [nm])	+	0,08	0,06	0,05	0,04

[0879]

[0880]

인간화 변이체 Pd-0103-0312는 하기에서 aPD1 항체 클론 PD1-0376으로 지칭된다.

[0881]

실시예 7

[0882]

항-LAG3 항체의 생성

[0883]

토끼의 면역화

[0884]

인간화 항체 레퍼토리를 발현하는 로슈 독점 형질감염 토끼를 플라스미드 DNA를 발현하는 LAG3으로 면역화하였다.

[0885]

400 µg 벡터 DNA를 피내 적용 후 전기천공(기간 10 ms, 간격 1초, 750 V/cm의 5회 사각펄스)에 의해, 전장 인간 LAG3을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터(15352_pIntronA-fl-hLag3-DNA-IMS)를 이용하여, 한 세트의 세 마리 토끼를 유전적으로 면역화하였다. 토끼들은 0, 14, 28, 42, 56, 70, 98 및 126일에 7회 연속 면역접종을 받았다. 혈액(총 혈액 용적의10%)을 35일, 77일, 105일 및 133일에 채혈하였다. 혈청이 준비되었고, 이것을 ELISA(하기 참조)에 의한 역가 측정에 사용하였고, 말초 단핵구를 단리하여, 하기 B 세포 클로닝 공정에서 항원-특이적 B 세포의 소스로 사용하였다.

[0886]

혈청 역가의 측정(ELISA)

- [0887] 재조합 인간 PD1 인간 Fc 키메라를 PBS 중 2 $\mu\text{g/ml}$, 100 μL /웰로 96-웰 눈크 맥시소프(NUNC Maxisorp) 플레이트 상에 고정화시킨 후: PBS, 200 μL /웰 중 2% 크로테인 C(Crotein C)로 플레이트를 차단하고; PBS, 100 μL /웰 중 0.5% 크로테인 C 중에서 항혈청의 연속 희석물을 2중으로 적용하고; (1) HRP-접합된 당나귀 항-토끼 IgG 항체(잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch)/디아노바(Dianova) 711-036-152; 1/16 000), 또는 (2) HRP-접합된 토끼 항-인간 IgG 항체(Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000), 또는 (3) 비오티닐화 염소 항-인간 카파 항체(Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5 000) 및 스트렙타비딘-HRP; PBS 중 100 μL /웰 중 0.5% 크로테인 C 중에서 각각 희석시켜 검출하였다. 모든 단계에서, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 모든 단계들 사이에, 플레이트를 PBS 중 0.05% Tween 20으로 3회 세척하였다. 신호는 BM Blue POD Substrate soluble(로슈), 100 μl /웰의 첨가로 발생되었고; 1 M HCl, 100 μl /웰의 첨가로 중단되었다. 흡광도는 690 nm를 기준으로, 450 nm에서 관독되었다. 역가는 반-최대 신호를 야기하는 항혈청의 희석물로 정의되었다
- [0888] **토끼 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 단리**
- [0889] 혈액 샘플을 면역화된 형질감염 토끼에서 채취하였다. EDTA 함유 전혈을 1x PBS(PAA, 파스칭, 오스트리아)로 2배 희석한 후, 포유동물의 림프구(Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 밀도 원심분리하였다. 상기 PBMC를 1x PBS로 2회 세척하였다.
- [0890] **EL-4 B5 배지**
- [0891] 10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA), 2 mM 글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신 용액(PAA, 파스칭, 오스트리아), 2 mM 피루브산 나트륨, 10 mM HEPES(PAN Biotech, 아이텐마크, 독일) 및 0,05 mM b-머캅토에탄올(Gibco, 파이스리, 스코틀랜드)로 보강된 RPMI 1640(Pan Biotech, 아이텐마크, 독일)을 사용하였다.
- [0892] **단백질 항원을 이용한 플레이트 코팅**
- [0893] 멸균 세포 배양 6-웰 플레이트를 탄산염 완충액(0,1 M 중탄산나트륨, 34 mM 중탄산수소나트륨, pH 9,55) 내 인간 Fc 부분 (2 $\mu\text{g/ml}$)에 접합된 인간 LAG3 ECD로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 사용 전에 플레이트를 멸균 PBS로 3회 세척하였다.
- [0894] **세포의 고갈**
- [0895] (a) CHO 세포의 함유 단층으로 덮인 멸균 6-웰 플레이트(세포 배양 등급)가 비특이적 부착을 통해 마크로파지/단핵구를 고갈시키는 데 사용되었고, 또한 비특이적 결합 림프구에도 사용되었다.
- [0896] (b) 블랭크 멸균 6-웰 플레이트(세포 배양 등급)가 비특이적 부착을 통해 마크로파지와 단핵구 및 다른 세포를 고갈시키는 데 사용되었다.
- [0897] 절반의 PBMC 샘플이 (a)를 위해 또한 절반은 (b)를 위해 사용되었다.
- [0898] 각 웰은 최대 4 ml 배지와 면역화된 토끼의 6×10^6 PBMC 이하로 채워지고, 1시간 동안 37°C로, 배양기에서 결합시킬 수 있었다. 항원 패닝 단계에서 상청액(말초 혈액 림프구(PBLs))의 세포를 사용하였다.
- [0899] **LAG3 항원 상에서 B 세포의 농축**
- [0900] 단백질 항원: LAG3-ECD-huFc 단백질로 코팅된 6-웰 조직 배양 플레이트에 블랭크 6-웰 플레이트를 사용하여, 고갈 단계의 배지 4 ml 당 6×10^6 이하로 PBL을 접종하였고 1시간 동안 37°C로, 배양기에서 결합시킬 수 있었다. 1x PBS로 1회 내지 2회 웰을 세심하게 세척하여 비-부착형 세포를 제거하였다. 남아있는 점착성 세포를 10분 동안 37°C로, 배양기에서 트립신으로 분리시켰다. 트립신화는 EL-4 B5 배지로 중단되었다. 상기 세포는 면역 형광 염색을 수행할 때까지 얼음 위에 보관되었다.
- [0901] 세포 표면 항원: 인간 LAG3-양성 CHO 세포의 단층으로 덮인 6-웰 조직 배양 플레이트에 CHO-커버 6-웰 플레이트를 사용하여, 고갈 단계의 배지 4 ml 당 6×10^6 이하로 PBL을 접종하였고 1시간 동안 37°C로, 배양기에서 결합시킬 수 있었다. 1x PBS로 1회 내지 2회 웰을 세심하게 세척하여 비-부착형 세포를 제거하였다. 남아있는 점착성 세포를 10분 동안 37°C로, 배양기에서 트립신으로 분리시켰다. 트립신화는 EL-4 B5 배지로 중단되었다. 상기 세포는 면역 형광 염색을 수행할 때까지 얼음 위에 보관되었다.
- [0902] **면역 형광 염색과 유동 세포 분석**
- [0903] 단일 세포 분류에 항-IgG FITC(AbD Serotec, 뒤셀도르프, 독일) 및 항-huCk PE (Dianova, 함부르크, 독일) 항

체를 사용하였다. 표면 염색에서, 고갈 및 농축 단계의 세포를 항-IgG FITC 및 항-huCk PE 항체로 PBS 중에서 배양하였고, 4°C로 45분간 암실에서 배양하였다. 염색 후 PBMC를 얼음처럼 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 마지막으로 상기 PBMC는 얼음처럼 차가운 PBS 중에서 재현탁시켜, 즉시 FACS 분석에 들어갔다. FACS 분석에 앞서 죽은 세포와 살아있는 세포를 구별하기 위해 5 µg/ml(BD Pharmingen, 샌디에고, 캘리포니아, 미국) 농도의 프로피디움 아이오다이드를 첨가하였다. 컴퓨터가 구비된 Becton Dickinson FACSAria 및 FACSDiva 소프트웨어(BD 바이오사이언시즈, 미국)를 사용하였다.

[0904] B-세포 배양

[0905] 토끼의 B-세포 배양을 Seeber 등에 기술된 방법으로 수행하였다(S Seeber et al. PLoS One 9 (2), e86184. 2014년 2월 4일). 간략하게, 판소르빈 세포(Pansorbin Cells)(1:100000) (Calbiochem (Merck), 다름스타트, 독일), 5% 토끼 흉선 상청액(MicroCoat, 베른리에드(Bernried), 독일) 및 감마선 조사된 쥐 EL-4 B5 흉선 세포(5 × 10e5 세포/웰)를 함유하는 200 µl/웰 EL-4 B5 배지를 이용하여 단일 분류된 토끼의 B 세포를 96-웰 플레이트에서 7일간 37°C로 인큐베이터에서 배양하였다. B-세포 배양의 상청액을 스크리닝을 위해 제거하였고 남은 세포는 즉시 수거하여, 100 µl RLT 완충액(Qiagen, 힐덴, 독일)에서 -80°C에서 냉동시켰다.

[0906] LAG3 항체의 V-도메인의 단리

[0907] V-도메인의 PCR 증폭

[0908] 총 RNA를, 제조사의 프로토콜에 따라, NucleoSpin 8/96 RNA 키트(Macherey&Nagel; 740709.4, 740698)를 사용하여, B 세포 용해물(lysate) (RLT 완충액 - Qiagen - Cat. No 79216에서 재현탁)로 제조하였다. RNA를 무수 60 µl RNase로 희석하였다. RNA 6µl를, 제조사의 지침에 따라, Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix(Invitrogen 18080-400) 및 oligo dT-프라이머를 이용하는 역전사효소 반응으로 DNA를 생성시키기 위해서 사용하였다. 모든 과정은 해밀톤 ML 스타 시스템(Hamilton ML Star System) 상에서 수행되었다. 중쇄에 대한 프라이머 rbHC.up 및 rbHC.do와 경쇄에 대한 프라이머 BcPCR_FHLC_leader.fw 및 BcPCR_huCkappa.rev(표 7)를 사용하여 50 µl의 최종 부피로 AccuPrime Supermix(인비트로젠 12344-040)로 번역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변부(VH 및 VL)를 증폭시키기 위해 4µl의 cDNA를 사용하였다. 모든 정방향 프라이머는 (VH 및 VL 각각의) 단일 펩티드에 대해 특이적이고, 반면 역방향 프라이머는 (VH 및 VL 각각의) 불변 영역에 대해 특이적이다. RbVH를 위한 PCR 조건은 다음과 같다: 94°C에서 5분간 높은 온도로 시작; 94°C에서 20초, 70°C에서 20초, 68°C에서 45초, 및 최종 연장인 68°C에서 7분간의 35회의 사이클. HuVL을 위한 PCR 조건은 다음과 같다: 94°C에서 5분간 높은 온도로 시작; 94°C에서 20초, 52°C에서 20초, 68°C에서 45초, 및 최종 연장인 68°C에서 7분간의 40회의 사이클.

표 7

서열번호 76 rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGGCTGGCTTC
서열번호 77 rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
서열번호 78 BcPCR_FHLC_leader.fw	ATGGACATGAGGGTCCCGC
서열번호 79 BcPCR_huCkappa.rev	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

[0909]

[0910] PCR 용액 50 µl 중 8 µl를 48 E-Gel 2%(인비트로젠 G8008-02) 상에 로딩하였다. 양성 PCR 반응은 제조사의 프로토콜에 따라, NucleoSpin Extract II 키트(Macherey&Nagel; 740609250)를 사용하여 정제되었고 용출 완충액 50 µl로 용출되었다. 모든 과정은 해밀톤 ML 스타 시스템 상에서 수행되었다.

[0911] 토끼 단클론 2가 항체의 재조합 발현

[0912] 토끼 단클론 2가 항체의 재조합 발현을 위해, VH 또는 VL을 코딩하는 PCR-산물을 오버행 클로닝 방법(RS Haun et al., Biotechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256)에 의해 발현 벡터 속으로 들어가는 cDNA로서 클로닝하였다. 발현 벡터는, 인트론 A, 및 3' BGH 폴리 아데닐화 서열을 갖는 5' CMV 프로모터로 구성되는 발현 카세트를 함유한다. 발현 카세트에 더하여, 플라스미드는 pUC18-유래 복제 기점 및 E.coli에서 플라스미드 증폭에 대한 암피실린 저항성을 부여하는 베타-락타메이즈 유전자를 함유한다. 기

본 플라스미드의 세가지 변이체를 사용하였다: 하나는 VH 영역을 수용하도록 고안된 토끼 IgG 불변 영역을 함유하는 반면 나머지는 VL 영역을 수용하는 인간 카파 LC 불변 영역을 함유한다. 카파 또는 감마 LC 불변 영역 및 VL /VH 인서트를 코딩하는 선형화 발현 플라스미드를 중첩 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 정제된 PCR 산물을 단일-가닥 오버행을 생성하는 T4 DNA-폴리머라제에 배양하였다. 상기 반응은 dCTP 첨가로 중단되었다.

[0913] 다음 단계에서, 플라스미드와 인서트를 조합하여 위치 특이적 재조합을 유도하는 recA를 사용하여 배양하였다. 상기 재조합 플라스미드는 E.coli 내로 형질전환되었다. 다음 날 성장한 콜로니를 수거하여 플라스미드 제조, 제한 분석 및 DNA-시퀀싱에 의해서 정확한 재조합 플라스미드에 대해 검사하였다.

[0914] 항체 발현을 위해, 단리된 HC 및 LC 플라스미드는 HEK293 세포 속으로 일시적으로 공동-형질감염시키고 그 상층액을 1주 후 수거하였다.

[0915] 실시예 8

[0916] 항-Lag3 항체의 특징규명

표 8

항-Lag3 항체의 특징규명의 요약

항-Lag3 항체	aLAg3(0403)	aLAg3(411)	aLAg3(414)	aLAg3(416)	aLAg3(417)	MDX-25F7(25F7)	BMS-986016	MDX-28H10 (28H10)	인간화 BAP 050 (LAG25)
K _D [M] 1가 2가	tbd	tbd	4.63 E-10	2.82 E-11	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd
	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd	tbd
kd [1/s]	5,00 E-06	3,87 E-05	1,95 E-04	2,21 E-04	9,48 E-05	3,86 E-04		3,99 E-04	
에피토프 빈(Bin)	E3	E3	E3	E2b	E3	E5 (D1-루프)	E5	E4	E2c
MHCII/ ELISA IC ₅₀ [nM]	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.8/ 0.6	/0.4	0.9 / 0.6	/1.0
CHO-세포 ELISA 변곡점[ng/ ml]	30.9	41.3	48.1	37.2	27.8	75			

[0917]

[0918] 인간 Lag3에 관한 ELISA

[0919] 눈크 맥시소프 플레이트(NUNC 464718)를, 25 μl/웰 재조합 인간 PD1 인간 Fc 키메라 단백질(R&D Systems, 2319-L3)로, 800 ng/ml의 단백질 농도에서 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하거나 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 각각의 웰을 90 μl의 차단 완충액(PBS + 2% BSA + 0.05% Tween 20)을 사용하여 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μl 항-Lag3 샘플을 1~9 μg/ml(OSEP 완충액에서 1:3 희석) 농도로 첨가하고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 염소 항-인간 Ig κ 쇄 항체-HRP 접합체(Milipore, AP502P)를 1:2000 희

석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μ L/웰) 후에, 25 μ L/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다.

[0920] **세포-표면 Lag3 결합 ELISA**

[0921] 25 μ L/웰 Lag3 세포(Lag3을 발현하는 재조합 CHO 세포, 10000 세포/웰)를 조직 배양 처리 384-웰 플레이트(Corning, 3701) 속으로 접종하여 37°C에서 하루 또는 이틀 동안 배양하였다. 다음 날 배지 제거 후, 25 μ L/웰 항-Lag3 샘플(OSEP 완충액에서 1:3 희석, 6~40 nM 농도로 시작함)을 첨가하고 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 세척(PBST에서 1x90 μ L/웰) 후에, 10분간 실온에서, 최종 농도 0.05% 이하로 30 μ L/웰 글루타르알데하이드(Sigma Cat. No: G5882)를 첨가하여 고정시켰다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μ L/웰) 후에, 25 μ L/웰 염소 항-인간 Ig κ 쇠 항체-HRP 접합체(Milipore, AP502P)를 1:1000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μ L/웰) 후에, 25 μ L/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 6 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다.

[0922] **항-Lag3 항체의 SPR (Biacore) 특징규명**

[0923] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기반 분석을 이용하여 25°C에서 2가 포맷의 또는 1가 Fab 단편으로서 항-Lag3 항체 및 인간 Fc 태그 인간 Lag3 세포의 도메인(ECD) 사이에 있는 결합의 동적 파라미터를 측정하였다.

[0924] 따라서, C1 바이오센서 칩의 2개의 유동 세포는, pH 4.5 아세트이트 완충액 중 25 μ g/ml로 희석하고, 상기 센서 칩 상으로 "고정화 마법사"를 이용하여, 비아코어 T200에서 뉴트라비딘을 고정화시켜 제조하였다. 상기 제조에서 약 1900 Ru의 고정화 레벨이 얻어졌다. CaptureSelect™ Biotin 항-IgG-Fc(인간) 접합체는 실행 완충액(HBS-EP+, GE 헬스케어)에서 20 μ g/ml 희석물을 사용하여, 뉴트라비딘에 결합되었다.

[0925] 상기 방법 자체는 사이클 당 네 번의 명령을 포함한다. 제1 명령:약 46 Ru의 huLag3-Fc(20s, 10 μ l/min)의 포획. 제2 명령: 120초 동안 샘플 주사 후 30 μ l/min 유속으로 1200초간 헤리. 제3 및 제4 명령: 30초간 pH 1.5에서 Glycine-HCl 주사에 의한 재생성. 그런 다음, 각 항체 Fab 단편의 희석물 계열(3.13 nM ~ 200 nM, 실행 완충액에서 2배 희석) 및 추가적인 블랭크 사이클을 전술한 방법을 사용하여 측정하였다. 그런 다음, 포획 레벨이 완전히 재생 가능하지 않았기 때문에, 1:1 랭뮤어 핏을 Rmax 핏 파라미터 세트에 "국소"에 적용해서 역학 값을 획득하기 위해 비아코어 T200 평가 소프트웨어를 사용하였다. 결과(K_D 값 및 kd 값)를 표 8에 나타낸다.

[0926] **에피토프 맵핑**

[0927] 에피토프 비닝을 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기반 분석을 사용하여 수행하였다. 따라서, aLag3 바인더는 비아코어 T200 기기 상에서 huLag3에 결합한다. 그런 다음, 이전에 형성된 aLag3 바인더 - huLag3 복합체에 대한 다른 바인더의 접근성을 평가하였다.

[0928] 본 분석을 수행하기 위해 A SA CAP 키트(GE 헬스케어)를 사용하였다. 달리 기술되지 않는다면, 상기 분석을 SA CAP 키트 매뉴얼에 따라 수행하였다. 상기 실험은 유일하게 1 사이클 유형만 포함한다. 이중교배 후, 비오티닐화 huFc-태그된 huLag3의 10 nM 희석물은 10 μ l/분 유속으로 20초 동안 센서 칩 상에 스트렙타비딘에 결합할 수 있었다. 실행 완충액에서 희석된 제1 200 nM 샘플을 30 μ l/분 유속으로 180초 동안 주입한 후, 동일한 조건 하에 제2 샘플을 즉시 주입하였다. 그런 다음, 상기 표면은 재생되었다.

[0929] 그런 다음, 상기 샘플을 유사한 경쟁 패턴을 가진 상이한 에피토프 군에 할당하였다. 바인더를 제1 및 제2 샘플로서 주입했을 때 관찰되는 가장 높은 값을 갖 상회하는 6.1 Ru의 역치를 사용한 두 번째 주입의 상대적 반응에 기초해, 제1의 대략적 분류화를 수행하였다. 모든 값 및 결정사항은 마지막으로 센서그램의 육안 검사를 통해 확인하였다.

[0930] 결과를 표 8에 나타낸다. 세 가지 주요한 에피토프 패턴(E1, E2 및 E3)을 확인하였다. aLag3-0416 및 인간화 BAP 050은 동일한 군을 공유하지만, 완벽하게 서로를 저해하지 않기 때문에, aLag3-0416 및 인간화 BAP 050은 서브그룹 E2b 및 E2c에 할당되었다.

[0931] **tg 토끼 내지 cyno Lag3 양성 HEK 세포에 대한 항-Lag3 항체의 결합**

[0932] 인간 Lag3을 그 표면에 재조합으로 발현하는 HEK 세포를 이용하는 결합 분석에 추가적으로, 게막이원숭이 Lag3-양성 HEK 세포에 대한 결합도 또한 평가되었다. 이 실험을 위해, 이전에 cyno-LAG-3으로 일시적으로 형질감염되었던, 냉동 HEK293F 세포가 해동되고, 원심분리되고, PBS/2%FBS에서 재보강되었다. 1.5x10⁵ 세포/웰을 96-웰 플

레이트에 접종하였다. 항-Lag3 항체가 10 µg/ml의 최종 정상화 농도로 첨가되었다. 참조를 위해서 또한 대조로서, 이소타입 대조(Sigma의 huIgG1, cat.no. # I5154, *테이터 미도시*) 항체뿐 아니라 자가형광 및 양성 대조(Medarex 25F7) 항체를 본 실험에서 제조하고 측정하였다. HEK 세포를 45분 동안 얼음 위에서 지시된 항체와 배양하였고, 2% FBS를 함유하는, 200 µl의 얼음처럼 차가운 PBS 완충액으로 2회 세척한 후, 2차 항체(APC-표지된 염소 항-인간 IgG-카파, 인비트로젠, cat.no. #MH10515)를 첨가하였고(FACS-Puffer/웰에서 1:50 희석), 또한 30분 동안 얼음 위에서 배양하였다. 다시 세포를 200 µl의 얼음처럼 차가운 PBS/2% FBS 완충액으로 2회 세척한 후, 샘플을 150 µl FACS 완충액에 재현탁하고, 결합을 FACS CANTO-II HTS 모듈 상에서 측정하였다.

[0933] **결과:** cynoLAG3을 발현하는 HEK293 세포에 대한 상이한 항-Lag3 항체의 결합 및 교차-반응성을 하기 표에 나타내었는데, 여기서 결합은 양성세포 % 또는 신호 강도의 GeoMean 중 하나로 주어진다.

표 9

제조합 cyno Lag3 양성 HEK 세포에 대한 상이한 항-Lag3 항체의 결합

Lag3 항체	양성세포 %	GeoMean
참조 LAG3 항체 MDX25F7	41.2	3062
aLAG3(O411)	88.6	11007
aLAG3(O414)	81.6	9169
aLAG3(O416)	67.9	4221
aLAG3(O417)	75.9	7115
aLAG3(O403)	82.0	7457

[0934]

[0935] **Lag3을 발현하는 Tg 토끼 내지 (활성화) 게묵이원숭이 PBMC/T 세포에 대한 항-Lag3 항체의 결합**

[0936] 제조합 Lag3 단백질 및 포유동물 세포 상에 제조합으로 발현된 Lag3에 대한 결합 후에, 활성화 게묵이원숭이 T 세포 상에 발현된 Lag3에 대한 결합을 또한 평가하였다.

[0937] 게묵이원숭이 T 세포 또는 PBMC의 세포 표면 상에 발현된 Lag3에 새로이 생성된 항-Lag3 항체(로슈의 유전자 변형 토끼에서 추출)의 결합 특징을 FACS 분석으로 확인하였다. Lag3은 천연 T 세포 상에서는 발현되지 않는 반면, 활성화 및/또는 탈진 T 세포 상에서는 상향조절된다. 따라서, 게묵이원숭이의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 게묵이원숭이의 신선한 혈액으로부터 제조되고, 그런 다음 2-3일 동안 CD3/CD28 전처리(1 µg/ml)에 의해 활성화되었다. 그 후, Lag 발현을 위해 활성화된 세포를 분석하였다: 간략하게, 1~3x10⁵ 활성화 세포를, 지시된 항-Lag3 항체 및 각각의 대조 항체들과 함께 10 µg/ml의 최종 농도로, 30~60분간 얼음 위에서 염색하였다. 상기 결합된 항-Lag3 항체는 형광크롬-결합 항-IgG 또는 항-토끼 IgG 2차 항체를 통해 검출하였다. 염색 후, 세포를 PBS/2% FCS로 2회 세척하였고, FACS Fortessa(BD) 상에서 분석하였다.

[0938] **결과:** 다음의 표는 활성화 게묵이원숭이 PBMC 내에서 Lag3 양성 세포의 백분율을 요약한다.

표 10

Lag3을 발현하는 (활성화)게먹이원숭이 PBMC/T 세포에 대한 상이한 항-Lag3 항체의 결합

항-Lag3/대조군 항체	CD3/CD28 활성화 후 양성 게먹이원숭이 세포(PBL) %
제 2 Ab (hu)에서만	7.62
Dp47(인간 이소타입)	9.19
참조 LAG3 항체(MDX25F7)	22.1
참조 LAG3 항체 BMS-986016	18.6
참조 LAG3 항체(인간화 BAP050(LAG525))	50.7
제 2 Ab (hu)에서만	5.26
aLAG3(0403)	44.2
aLAG3(0411)	46.6
aLAG3(0414)	43.0
aLAG3(0416)	38.9
aLAG3(0417)	35.3

[0939]

[0940]

활성화된 게먹이원숭이 T 세포 상에 토끼 항-Lag3 항체 전부가 Lag3⁺ 세포에 대한 유의한 결합을 나타내었다. 이에 의해, 새로이 생성된 항체 전부는, 인간 항-Lag3 참조 항체 (예를 들어, MDX25F7, BMS-986016)에 비해, 양성 세포의 백분율이 증가함을 보여주었다.

[0941]

인간 A375 종양 세포에 발현된 MHC-II에 대한 LAG-3 결합의 저해 (ELISA에 의함)

[0942]

25 μL/웰 A375 세포(10000 세포/웰)를 조직 배양 처리 384-웰 플레이트(Corning, 3701) 속으로 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 항-LAG3 항체는 비오틴닐화-Lag3(250 ng/ml)와 함께 세포 배양 배지에서 1시간 동안 1:3 희석물에서 3 μg/ml 항체-농도로 시작하여 사전-배양하였다. 접종한 세포와 함께 배지 제거 후, 25 μL/웰 항-Lag3 사전-배양 혼합물은 웰로 옮겨졌고, 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 세척(PBST에서 1x90 μL/웰) 후에, 10분간 실온에서, 최종 농도 0.05% 이하로 30 μL/웰 글루타르알데하이드(Sigma Cat. No: G5882)를 첨가하여 고정시켰다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 폴리-HRP40-스트렙타비딘(Fitzgerald, 65R-S104PHRPx)을 1:2000 또는 1:8000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 μL/웰) 후에, 25 μL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다.

[0943]

인간 A375 종양 세포에 발현된 MHC-II에 대한 LAG-3 결합의 저해(FACS 분석에 의함)

[0944]

분석 원칙: 항-Lag3 항체의 길항성 기능을 연구하기 위해, MHCII:Lag3 경쟁 분석을 수행하였다. MHCII⁺ 인간 A375 세포를 사내 생성 비오틴닐화 Lag3: 항-Lag3 항체와의 사전-배양을 하고 또는 하지 않은 Fc 융합 단백질과 염색하였다. 상기 분석은 FACS 경쟁 실험에서 수행하였다: EBSS(PAN, cat.no. #P04-00509), 10% FBS, 2mM L-글루타민, 1x NEAA 및 1x 피루브산 나트륨으로 보강된 EM Eagle의 배지에서 2~3회 통과시키는 동안 A375 세포(ATCC, #CRL-1619)를 배양하였다. 모든 항체는 FACS 완충액에서 최종 농도가 (96 웰 U-바닥 플레이트에서) 25 μL 중에 20 μg/ml로 희석하였다. 25 μL의 사내에서 자체 생성된, 비오틴닐화 재조합 LAG-3:Fc 융합 단백질을 배지 또는 항-Lag3 항체 중 어느 하나에 10 μg/ml의 최종 농도로 첨가하였고, 실온에서 30분 동안 사전-배양하였다. A375 세포를 PBS로 세척하여 PBS에서 3x10⁶ 세포/ml로 조절하였다. 96 웰 V-바닥 플레이트에 웰당 100 μL를 접종하였다. 플레이트를 원심 분리하여 상청액을 제거하였다. 그런 다음, 사전-배양된 LAG-3:Fc 융합 단백질/항체 혼합물(50 μL/웰)을 세포에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 200 μL FACS 완충액으로 세포를 세척하였다. 세포 MHCII에 결합된 비오틴닐화된 Lag3:Fc 단백질의 검출을 위해, APC-접합된 염소 항-바이오틴 항체를 3 μL/샘플(Miltenyi Biotec, cat.no. #130-090-856)에서 사용하였고, 추가로 10~15분 동안 배양하였다. 염색 후, 세포를 다시 세척한 다음 150 μL FACS 완충액(PBS/2% FBS) 내에서 U-바닥 플레이트로 옮기고 HTS 모듈을 사용하여 FACS Canto-II에서 분석하였다.

[0945] 2개의 항-Lag3 항체(클론 25F7 및 26H10; Medarex)를 양성 대조군으로서 인간 IgG1(Sigma, cat.no. #I5154)을 적절한 이소타입 대조군으로서 사용하였다. 모든 항체를 10 µg/ml의 최종 농도로 사용하였다.

[0946] **결과:** 세포 위의 MHC-II에 결합하는 Lag3 단백질의 백분율 저해를 보여주는 FACS 분석의 결과를 하기 표에 나타내었다(차단 항체의 부재 시 최대값에 대한 참조로서 감소된 결합 신호로서 계산됨).

표 11

Lag3을 발현하는 (활성화)게막이원증이 PBMC/T 세포에 대한 상이한 항-LAG3 항체의 결합

aLAG3 항체	저해%
aLAG3(0403)	34.9
aLAG3(0414)	67.3
aLAG3(0411)	45.6
aLAG3(0416)	68.6
aLAG3(0417)	59.1
참조 MDX25F7	70.0
참조 MDX26H10	71.7
이소타입 대조군	-2.9
mAb 없음	0.0

[0947]

[0948] 이들 데이터는 Lag3과의 기능적 상호 작용 및 시험한 모든 항체의 세포 상호작용의 차단을 지원한다.

[0949] **표준 LAG3 차단 바이오/리포터 분석법에서 신규한 항-LAG3 항체의 중화 역량**

[0950] 시험관내에서 억제된 T 세포 반응의 복구 시 신규한 항-Lag3 항체의 중화 효능을 시험하기 위해, 상업적으로 시판하는 리포터 시스템을 이용하였다. 상기 시스템은 Lag3+ NFAT Jurkat 효과기 세포(프로메가(Promega), cat. no. #CS194801), MHC-II⁺ Raji 세포(ATCC, #CLL-86), 및 슈퍼 항원을 포함한다. 간략하게, 상기 리포터 시스템은 3 단계를 기반으로 한다: (1) 슈퍼 항원-유도 NFAT 세포 활성화, (2) MHC-II(Raji 세포) 및 Lag3⁺ NFAT Jurkat 효과기 세포 사이의 상호작용 저해에 의해 매개된 활성 신호의 저해, 및 (3) Lag3-길항성/VH-Fc 융합 자극제의 중화에 의한 NFAT 활성 신호의 회복.

[0951] 상기 실험에서, Raji 세포 및 Lag-3⁺ Jurkat/NFAT-luc2 효과기 T 세포를 본원에 기술된 것처럼 배양하였다. 여러 개의 항-Lag3 및 참조 항체의 연속 희석물(40 pg/ml~50 µg/ml)(RPMI 1640 (PAN Biotech, cat.no. #P04-18047), 1%FCS)을 백색 평평 바닥 96-웰 배양 플레이트(Costar, cat.no. #3917)에서 준비하였다. 1x10⁵ Lag3⁺ NFAT-JurkaT 세포/웰을 항체 용액에 첨가하였다. 상기 단계 후에, 2.5x10⁴ Raji 세포/웰을 최종 농도 50 ng/ml의 SED 슈퍼-항원(Toxin technology, cat.no. DT303)과 함께 JurakT 세포/항체 혼합물에 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO₂에서 6시간 동안 배양한 후, 바이오-글로(Bio-Glo) 기질(Promega, #G7940)을 실온으로 가온시켰고, 웰 당 75 µl를 첨가하고, 5 내지 10분 동안 배양한 후, 테칸 인피니트(Tecan Infinite) 판독기에서 키트 제조사의 권장사항에 따라서 전체 발광을 측정하였다.

[0952] SED 자극 하에 상이한 항-Lag3 항체에 의한 NFAT 루시퍼라제 신호의 MHCII/Lag3-매개 억제의 복구가 표에 나타난다(EC₅₀ 값으로 주어짐).

표 12

표준 LAG3 차단 바이오/리포터 분석법에서 상이한 항-LAG3 항체를 이용한 결과

항-LAG3	Jurkat LAG3 + SED + Raji 에서 EC ₅₀ [nM]		
	제 1 분석	제 2 분석	제 3 분석
참조 MDX25F7	7.8/5.9	8.6	n.t.
참조 BMS-986016	n.t.	9.6	n.t.
참조 인간화 BAP050(LAG525)	n.t.	22.6	n.t.
Lag3 IgG-Fc	n.t.	효과 없음	n.t.
aLAG3(0411)	1.1	1.0	n.t.
aLAG3(0414)	1.1	1.0	1.8
aLAG3(0416)	3.1	2.5	3.5
aLAG3(0417)	1.0	n.t.	n.t.

n.t. 본 실험에서 검사를 하지 않은 분자

[0953]

[0954] 실시예 9

[0955] 항-Lag3 항체의 기능적 특징규명

[0956] 표 13은 본원에서 기술한 상이한 분석법으로 상이한 항-Lag3 항체(단독으로 또는 항-PD1 항체와 조합하여)의 생물학적 활성 및 효과를 요약한다.

표 13

상이한 항-Lag3 항체(단독으로 또는 항-PD1 항체와 함께)의 생물학적 활성의 요약

분석 유형	항-Lag3 aLAG3 (0403)	항-Lag3 aLAG3 (0411)	항-Lag3 aLAG3 (0414)	항-Lag3 aLAG3 (0416)	항-Lag3 aLAG3 (0417)	참조 1 BMS 986016	참조 2 인간화 BAP050 (LAG525)
mMLR (GrzB)	+	-	+++	++	+	-	++
mMLR (IL-2)	-	-	+	+	++	+	++
CD4+ARH7 7			+++	+++		+	+
Treg-억제 (Grz B)			+++	+		-	+
Treg-억제 (IFN-γ)			+++	++		+	+
흑색종 환자 PBMC			+++				

[0957]

[0958] 동종이계 성숙 수지상세포와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출과 IL-2 분비에 대한 PD-1 및 LAG-3 차단 효과

[0959] 동종이계 환경에서 항-PD-1과 조합하여 항-LAG-3 차단 항체를 스크리닝하기 위해서, 새로 정제된 CD4 T 세포를

단핵구-유래 동종이계 성숙 수지상 세포(mDC)의 존재 하에서 5일 동안 공배양시키는 분석법을 개발하였다. 1주 전에 플라스틱 부착을 통해 새 PBMC로부터 단핵구를 단리한 후, 비-부착 세포를 제거하였다. 그런 다음, 이들을 GM-CSF(50 ng/mL) 및 IL-4(100 ng/mL)를 함유하는 배지 중에서 5일 동안 배양하여 단핵구들로부터 미성숙 DC를 생성하였다. iDC 성숙을 유도하기 위해, 배양 배지에 TNF-알파, IL-베타 및 IL-6(각각 50 ng/mL)을 추가 2일 동안 첨가하였다. 그런 다음, 유세포분석(LSR포르테사(LSRFortessa), BD 바이오사이언시스)을 통해 주 조직적합성 복합체 클래스 II(MHCII), CD80, CD83 및 CD86의 표면 발현을 측정함으로써 DC 성숙을 평가하였다.

[0960] 최소 혼합 림프구 반응(mMLR) 당일, 비관련 공여자로부터 수득된 10^8 개 PBMC로부터 마이크로비드 키트(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 통해 CD4 T 세포를 농축시켰다. 배양 전에, CD4 T 세포를 5 μ M의 카복시-플루오레세인-숙신이미딜 에스터(CFSE)로 표지하였다. 그런 다음, 차단 항-PD1 항체 aPD1(0376)(= PCT 출원 PCT/EP2016/073248에서 또는 이전에 본원에서 기술된 바와 같은 PD1-0103-0312)의 존재 또는 부재 하에, 성숙 동종이계-DC와 함께(5:1), 단독으로 또는 키메라 항-LAG-3 항체(aLAG3(0403) 내지 aLAG(0418)) 또는 참조 항체(인간화BAP050(LAG525) 및 BMS 986016)와 함께, 10^5 개 CD4 T 세포를 10 μ g/ml의 농도로 96 웰 플레이트에 플레이트하였다. DP47은, Fc γ R에 의한 인식을 회피하기 위한 Fc 부분에서 LALA 돌연변이가 있는 비-결합 인간 IgG이며, 음성 대조군으로 사용되었다.

[0961] 5일 후에, 세포-배양 상청액을 수거하여, 나중에 ELISA(R&D systems)에 의해 IL-2 수준을 측정하기 위해 사용하였고, 세포를 37°C에서 골지 플러그(브레펠딘 A) 및 골지 스타프(모넨신)의 존재 하에서 5시간 동안 더 방치하였다. 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸 정착성 염료 아쿠아(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄 완충액(BD 바이오사이언시스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언시스) 및 IFN- γ (e바이오사이언시스)에 대한 세포내 염색을 수행하였다. 결과는 도 2a 및 2b에 도시되어 있다.

[0962] B 세포-림프아세포양 세포주(ARH77)와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출에 대한 PD-1 및 LAG-3 차단의 효과

[0963] 기능의 연구에서, PD-1 차단에 대한 LAG-3 길항작용의 기여를 더 특징화하기 위해, CD4 T 세포를 종양 세포주 ARH77, 즉 mDC보다 더 낮은 PDL-1의 레벨을 발현하는 B 림프아세포양 세포주와 공배양하였다. 나머지 실험용 설정 및 관독은 mMLR로부터 변하지 않은 채로 남겨 두었다. PD-1 항체와 조합한 항-LAG-3 항체(mMLR에서 IL-2 및 그랜자임 B를 공분비하는 이들의 능력을 기초로 한 aLAG3(0414) 및 aLAG3(0416))는, 도 3에 도시된 바와 같이, 참조 항-LAG-3 항체((인간화 BAP050(LAG525) 및 BMS 986016)) ($P < 0.05$) 및 항-PD-1 항체 단독 사용($P < 0.01$)보다 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 분비를 더욱 현저히 증가시켰다.

[0964] 방사능 조사된 동종이계의 PBMC와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B의 Treg 억제와 IFN- γ 방출에 대한 PD-1 및 LAG-3 차단의 효과

[0965] 조절 T 세포(Treg)-억제 분석을 포함하는 기능의 연구에서, 동일한 공여자로부터의 PBMC는 2개의 샘플로 나누어졌는데: 두 개의 샘플 중 하나는 CD4 T 세포가 풍부하였고, 다른 하나는 마이크로비드 키트(Miltenyi Biotec)를 통해서 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T 세포로 정의된 Tregs가 풍부하였다. 일단 상기 두 집단을 정제하였으면, FACS에서 하기 세포를 구별할 수 있도록 CD4 T 세포는 5 μ M의 카복시-플루오레세인-숙신이미딜 에스테르(CFSE)로, 한편 Tregs는 5 μ M Cell-Trace-Violet(CTV)로 표지하였다.

[0966] 그런 다음, 항-LAG-3 항체(aLAG3(0414) 및 aLAG3(0416)) 또는 참조 항-LAG-3 항체(인간화 BAP050(LAG525) 및 BMS 986016)의 존재 또는 부재 하에서, 관련 없는 공여자로부터 방사능 조사된 CD4-고갈 PBMC(10^5)와 함께, 10 μ g/ml의 농도에서 항-PD-1 항체 aPD1(0376)과 조합하여, CD4 T 세포(10^5) 및 Tregs(10^5) 둘 모두를 96 웰 플레이트에서 1:1 비율로, 공배양하였다. Tregs로 CD4 T 세포 효과기 기능의 억제 정도를 추정하기 위한 대조군으로서, Tregs의 부재 하에서 방사능 조사된 PBMC(10^5)와 CD4 T 세포(10^5) 또한 공배양하였다.

[0967] 5일 후에, 세포-배양 상청액을 수거하여, 나중에 ELISA(R&D systems)에 의해 IFN- γ 수준을 측정하기 위해 사용하였고, 골지 플러그(브레펠딘 A) 및 골지 스타프(모넨신)의 존재 하에서 추가 5시간 동안 세포를 37°C에서 더 방치하였다. 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸 정착성 염료 아쿠아(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄 완충액(BD 바이오사이언시스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언시스) 및 IFN- γ (e바이오사이언시스)에 대한 세포내 염색을 수행하였다. 결과는 도 4a 및 4b에 도시되어 있다.

[0968] 항-PD1이 단독으로 존재 시($P < 0.05$) 또는 체크포인트 억제제의 부재 시($P < 0.001$) Tconv보다 현저하게 많은 양의

그랜자임 B 분비에 의해 나타나듯이, 항-LAG-3 항체(항-PD-1 항체 aPD1(0376)와 조합된 aLAG3(0414) 및 aLAG3(0416)(= PD1-0103-0312, PCT 출원 PCT/EP2016/073248호에 나옴)은 조절 T 세포의 엄격한 통제로부터 Tconv 회피를 이끌어내었다. 항-PD-1과 조합된 항-LAG-3 항체(인간화 BAP050 (LAG525) 및 BMS 986016)는 Tregs 억제로부터 Tconv 효과기 기능을 유의하게 구제하지 못하였다. 그 차이가 단지 4명의 공여자만으로 통계적 유의성에 도달하지 못했더라도, IFN- γ 에 대해 유사한 결과를 얻었다.

[0969] **면역원성 흑색종-항원 펩티드 풀로 기억된 후에 흑색종 환자 PBMC로부터 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B와 IFN- γ 의 분비에 대한 PD-1과 LAG-3 차단 효과**

[0970] 흑색종 환자 PBMC가 검출가능한 빈도의 종양-항원 특이적 T-세포를 함유한다는 것은 이전에 기술되었다. 그러므로, POC 목적을 위해, 면역원성 흑색종 관련 항원 펩티드 풀을 이용하여 밤새 재자극받은 흑색종 환자 PBMC에 대해 항-LAG-3 항체(0414) + 항-PD-1 대 또는 항-PD-1 단독으로 시험하였다.

[0971] 항-LAG-3(aLAG3(0414)=(0414), 10 μ g/ml) 항체와 조합되어, 포화 농도(10 μ g/ml)의 항-PD-1 단독(0376)의 존재 또는 부재 하에, 흑색종 환자로부터 10^5 내지 10^6 개의 PBMC를 실온에서 배양하였다. 그런 다음, 단백질 수송 저해제 골지 플러그(브레펠딘 A) 및 골지 스탱(모넨신)의 존재 하에 MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, Melan-A/MART-1, NYESO-1, 멜라닌세포 단백질 Pmel 17 gp100, 티로시나제, 티로신-관련 단백질 2와 같은 면역원성 종양 관련 항원의 풀을 이용하여 T-세포들을 밤새 재자극하였다.

[0972] 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸 정착성 염료 아쿠아(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄 완충액(BD 바이오사이언스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언스) 및 IFN- γ (e바이오사이언스)에 대한 세포내 염색을 수행하였다.

[0973] 항-LAG-3 및 항-PD-1 항체의 조합($P < 0.01$ 및 $P < 0.001$)으로 종양-항체 특이적 T 세포 효과기 기능(즉, 그랜자임 B 및 IFN- γ 분비)은 유의미하게($P < 0.01$ 및 $P < 0.0001$) 증강되었지만, PD-1 차단 단독으로는 어떤 효과도 나타나지 않았다(데이터 미도시).

[0974] **실시예 10**

[0975] **이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 생성 및 제조**

[0976] **10.1 하나의 결합 팔에서 VH/VL 도메인 교환/치환(*CrossMab*^{Vh-VL})을 이용하고 CH1/CL 계면에서 단일 하전 아미노산 치환을 이용하여 PD1 및 LAG3에 결합하는 이중특이적 항체의 제조 및 발현**

[0977] 인간 PD1 및 인간 LAG3에 결합하는 다중특이적 항체는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성되었고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현되었다. 다중특이적 1+1 *CrossMab*^{Vh-V1} 항체는 또한 WO 2009/080252호에 기술되어 있다. 상기 다중특이적 항체는 표 14에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 1+1 *CrossMab*^{Vh-V1} 이중특이적 항체의 모식도는 도 1a에 도시되어 있다.

표 14

VH/VL 도메인 교환/치환(1+1 *CrossMab*^{2h-7f})이 있는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열

1+1 항체	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1/LAG3 0799 PD1(0376)/ aLAG3(0416)	서열번호 96	서열번호 97	서열번호 98	서열번호 99
PD1/LAG3 0927 PD1(0376)/ aLAG3(0414)	서열번호 96	서열번호 100	서열번호 98	서열번호 101
PD1/LAG3 0222 PD1(0069)/ aLAG3(25F7)	서열번호 102	서열번호 103	서열번호 104	서열번호 105
PD1/LAG3 0224 PD1(0098)/ aLAG3(25F7)	서열번호 106	서열번호 103	서열번호 107	서열번호 105

[0978]

[0979]

모든 작제물에서, (상기 묘사된 각각의 상응하는 중쇄(HC) 서열에 포함된) (두 개의 추가로 도입된 시스테인 잔기 S354C/Y349'C뿐만 아니라) 제1 CH3 도메인의 전형적 늑(T366W) 치환 및 제2 CH3 도메인의 상응하는 홀 치환(T366S, L368A and Y410V)이 있는 늑 인투 홀 이중다량체 기술을 사용하였다.

[0980]

10.2 2개의 결합 팔에서 CH1/Ck 도메인 교환/치환(2+2 *CrossMab*^{CH1/Ck})을 이용하고 다른 하나의 CH1/CL 계면에서 하전 아미노산 치환을 이용하여 PD1 및 LAG3에 결합하는 다중특이적 항체의 생산 및 발현

[0981]

이 실시예에서 인간 PD1 및 인간 TIM3에 결합하는 다중특이적 항체는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적인 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성되었고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현되었다. 다중특이적 2+2 *CrossMab*^{CH1/Ck} 항체는 또한 WO 2010/145792호에 기술되어 있다. 상기 다중특이적 항체는 표 15에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 2+2 *CrossMab*^{CH1/Ck} 이중특이적 항체의 모식도는 도 1a에 도시되어 있다.

표 15

VH/VL 도메인 교환/치환이 있는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열(2+2 *CrossMab*^{CH1/Ck})

2+2 항체	2x HC	2x LC1	2x LC2
PD1/LAG3 8970 PD1(0376)/ aLAG3(0414)	서열번호 114	서열번호 115	서열번호 101
PD1/LAG3 8984 PD1(0376)/ aLAG3(0416)	서열번호 116	서열번호 115	서열번호 99
PD1/LAG3 9010 PD1(0376)/ aLAG3(25F7)	서열번호 117	서열번호 115	서열번호 105

[0982]

[0983] 10.3 하나의 결합 팔(Fc 늑 중쇄의 C-말단에 융합한 PD1 교차Fab)에서 CH1/Ck 도메인 교환/치환(2+1 *CrossMab*^{CH1/Ck})을 이용하고 다른 하나의 CH1/CL 계면에서 하전 아미노산 치환을 이용하여 PD1 및 LAG3에 결합하는 다중특이적 항체의 생산 및 발현

[0984] 이 실시예에서 인간 PD1 및 인간 TIM3에 결합하는 다중특이적 항체는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적인 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성되었고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현되었다. 다중특이적 2+1 *CrossMab*^{CH1/Ck} 항체는 또한 W02013/026831호에 기술되어 있다. 상기 다중특이적 항체는 표 16에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 2+1 *CrossMab*^{CH1/Ck} 이중특이적 항체의 모식도는 도 1b에 도시되어 있다.

표 16

CH1/Ck 도메인 교환/치환이 있는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열(2+1 *CrossMab*^{CH1/Ck})

2+1 항체	HC1	HC2	LC1	2x LC2
PD1/LAG3 8310 aLAG3(0414)/ PD1(0376)	서열번호 118	서열번호 119	서열번호 115	서열번호 101
PD1/LAG3 8311 aLAG3(0416)/ PD1(0376)	서열번호 120	서열번호 121	서열번호 115	서열번호 99
PD1/LAG3 1252 aLAG3(25F7)/ PD1(0376)	서열번호 122	서열번호 103	서열번호 115	서열번호 105

[0985]

[0986] 대안적으로, 상기 Fc 늑 중쇄의 C-말단에 융합된 PD1 교차Fab는 단일쇄 Fab(scFab)로 치환될 수 있다. scFab를 포함하는 이러한 다중특이적 2+1 항체는 또한 W02010/136172호에 기술되어 있고 표 17에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현될 수 있다. 상기 Fc 늑 중쇄의 C-말단에서 융합한 scFab를 갖는 상기 2+1 이중특이적 항체는 도1c에 도시되어 있다.

표 17

PD1 scFab 을 갖는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열

2+1 항체	HC1	HC2	2x LC
PD1/LAG3 8312 aLAG3(0414)/ PD1(0376)	서열번호 123	서열번호 119	서열번호 101
PD1/LAG3 8313 aLAG3(0416)/ PD1(0376)	서열번호 124	서열번호 121	서열번호 99
PD1/LAG3 1088 aLAG3(25F7)/ PD1(0376)	서열번호 125	서열번호 103	서열번호 105

[0987]

[0988] 중쇄(2+1 PRIT 포맷)의 C-말단에 각각 융합한 VH/VL을 갖는 PD1 및 LAG3에 결합하는 다중특이적 항체의 생산 및 발현

[0989] 이 실시예에서 인간 PD1 및 인간 TIM3에 결합하는 다중특이적 항체는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적인 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성되었고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현되었다. 상기 다중특이적 2+1 항체의 이 유형은 또한 WO 2010/115589에 기술되어 있다. 상기 다중특이적 항체는 표 18에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 2+1 PRIT-유형 이중특이적 항체의 모식도는 도 1d에 도시되어 있다.

표 18

C-말단에서 중쇄에 융합된 VH 및 VL 도메인을 갖는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열

2+1 항체	HC1	HC2	2x LC
PD1/LAG3 0918 aLAG3(25F7)/ aPD1(0376)	서열번호 126	서열번호 127	서열번호 109

[0990]

[0991] 10.5 하나의 결합 팔에서 VH/VL 도메인 교환/치환(*CrossMab*^{VH/VL} 트랜스 포맷)을 이용하고 Fc 홀 중쇄의 C-말단에 융합된 LAG3 Fab의 CH1/CL 계면에서 하전 아미노산 치환을 이용하여 PD1 및 LAG3에 결합하는 이중특이적 항체의 제조 및 발현

[0992] 인간 PD1 및 인간 LAG3 모두에 1가로 결합하는 다중특이적 항체를 생산하였고, LAG3 Fab는 상기 중쇄 중 하나의 말단에, 바람직하게는 Fc 홀 중쇄의 C-말단에, LAG3 Fab 가변성 중쇄를 통하여 융합시킨다. 상기 분자는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적인 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성시켰고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현하였다. 상기 다중특이적 항체는 표 19에 묘사된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 1+1 *CrossMab*^{VH-VL} 트랜스 유형 이중특이적 항체의 모식도는 도 1h에 도시되어 있다.

표 19

C-말단에서 중쇄에 융합된 aLAG3 Fab를 갖는 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열

1+1 항체	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1/LAG3 0725 aLAG3(0414)/ aPD1(0376)	서열번호 96	서열번호 144	서열번호 98	서열번호 101

[0993]

[0994] 10.6 하나의 결합 팔에서 VH/VL 도메인 교환/치환(*CrossMab*^{VH/VL} 트랜스 포맷)을 이용하고 하나가 Fc 홀 중쇄의 C-말단에 융합된 2개의 LAG3 Fab의 CH1/CL 계면에서 하전 아미노산 치환을 이용하여 PD1 및 LAG3에 결합하는 이중특이적 항체의 제조 및 발현

[0995] 인간 PD1에 1가로 결합하고 인간 LAG3에 2가로 결합하는 다중특이적 항체를 생산하였고, LAG3 Fab는 상기 중쇄 중 하나의 말단에, 바람직하게는 Fc 홀 중쇄의 C-말단에, LAG3 Fab 가변성 중쇄를 통하여 융합된다. 상기 분자는 고전적인 분자 생물학적 기술에 의해 일반적인 방법 섹션에 기술한 바와 같이 생성시켰고 상기한 바와 같이 Expi293F 세포의 293F에서 일시적으로 발현하였다. 상기 다중특이적 항체는 표 20에 묘사된 아미노산 서열을 암

호화하는 핵산을 함유하는 발현 플라스미드를 사용하여 발현되었다. 상기 2+1 CrossMab^{VH-VL} 트랜스 유형 이중특이적 항체의 모식도는 도 1i에 도시되어 있다.

표 20

aLAG3 Fab 중 하나가 C-말단에서 중쇄에 융합된 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)의 아미노산 서열

1+1 항체	HC1	HC2	LC1	2 x LC2
PD1/LAG3 0750 aLAG3(0414)/ aPD1(0376)	서열번호 96	서열번호 145	서열번호 98	서열번호 101

[0996]

[0997] **10.7 PD1 및 TIM3에 결합하는 다중특이적 항체의 정제 및 특징규명**

[0998] 발현된 상기 다중특이적 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피의 조합에 의해 상청액으로부터 정제하였다. 모든 다중특이적 항체는 양호한 수득률로 생산될 수 있고 안정하다. 수득된 산물은, 질량 분석법과 SDS-PAGE에 의한 순도, 단량체 함유율 및 안정도와 같은 분석적 특성들에 의해 그 고유성에 대해 특징규명하였다.

[0999] 질량 분석법

[1000] 탈글리코실화된 온전한 CrossMab 및 탈글리코실화/플라스민 절단되거나 양자택일적으로 탈글리코실화/제한 LysC 절단된 CrossMab의 전자분무 이온화 질량 분석법(ESI-MS)에 의해 예상된 1차 구조를 분석하였다.

[1001] 37°C에서 1 mg/mL의 단백질 농도에서 포스페이트 또는 트리스 완충액 중에서 N-글리코시다제 F를 사용하여 17시간 이하의 시간 동안 CH1/Ck CrossMab을 탈글리코실화시켰다. 플라스민 또는 제한 LysC(로슈(Roche)) 절단은 각각 실온에서 120시간 동안 및 37°C에서 40분 동안, 트리스 완충액 pH 8 중에서 100 µg 탈글리코실화 CH1/Ck CrossMab을 사용하여 수행하였다. 질량 분석 전에, 샘플들을 세파텍스 G25 컬럼(GE 헬스케어) 상에서 HPLC에 의해 탈염시켰다. 총 질량은 트라이버사 나노메이트 광원(애드비온)이 장착된 maxis 4G UHR-QTOF MS 시스템(브루커 달토닉) 상에서 ESI-MS에 의해 측정하였다.

[1002] 다중특이적 항체의 안정성

[1003] 항체 작제물의 안정성을 평가하기 위해, 내열 안정성 및 응집 개시 온도를 또한 다음 절차에 따라 평가한다. 지시된 항체의 샘플은 20 mM 히스티딘/히스티딘 염화물, 140 mM NaCl, pH 6.0에서 1 mg/mL 농도로 제조하여, 10 µL 마이크로-큐벳 어레이(micro-cuvette array) 속으로 옮기고, 정적 광산란 데이터 및 266 nm 레이저를 사용한 들뜸 상태에 대한 데이터를 Optim1000 기기(Avacta Inc.)로 기록하였고, 샘플을 25°C에서 90°C까지 0.1°C/분의 속도로 가열하였다.

[1004] 응집 개시 온도(T_{agg})는 산란광 강도가 증가하기 시작하는 온도로서 정의한다. 녹는 점(T_m)은 형광 강도 대 파장 그래프에서의 변곡점으로 정의한다.

[1005] **실시예 11**

[1006] **이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 특징규명**

[1007] **11.1 결합 Elisa**

[1008] **인간 PD1에 관한 ELISA**

[1009] 뉴크 맥시소프 스트렙타비딘 코팅 플레이트(마이크로코트 #11974998001)를 25 µL/웰 비오틀닐화 PD1-ECD-AviHis로 500 ng/ml의 농도로 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL 항-PD1 항체 샘플을 농도를 증가시키면서 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-098)를 1:5000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질

(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 3의 OD까지 배양하였다. 측정은 370/492 nm에서 수행되었다.

[1010] **인간 PD1에 대한 세포 ELISA**

[1011] 부착성 CHO-K1 세포주를 전장 인간 PD1을 코딩하는 플라스미드 15311_hPD1-f1_pUC_Neo로 안정하게 형질감염시키고, G418(플라스미드 상의 네오마이신 내성 마커)을 사용하여 선별하고 384-웰 바닥이 편평한 플레이트에 0.01x10E6 세포/웰의 농도로 접종하고 밤새 성장시켰다.

[1012] 다음날, 25 µL/웰의 PD1 샘플 또는 인간 항-PD1(로슈)/마우스 항-PD1(바이오레전드; 카달로그 번호 329912) 참조 항체를 첨가하고 4°C에서(내재화를 방지하기 위해) 2시간 동안 배양하였다. 조심스럽게 세척(1x90 µL/웰 PBST)한 후, 1xPBS-완충액에 희석된 30 µL/웰 0.05% 글루타르알데하이드(시그마(Sigma), 카달로그 번호 G5882, 25%)를 첨가하여 세포를 고정시키고 실온에서 10분 동안 배양하였다. 세척(3x90 µL/웰 PBST)한 후, 검출을 위해 25 µL/웰의 2차 항체: 염소-항-인간 H+L-POD(JIR, JIR109-036-088)/양-항-마우스-POD(GE Na9310)를 첨가한 다음 실온에서 진탕기 상에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(3x90 µL/웰 PBST) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질용액(로슈 11835033001)을 첨가하고 1.0 내지 2.0의 OD까지 배양하였다. 플레이트를 370/492 nm에서 측정하였다.

[1013] 세포 ELISA 결과는 하기 표 21에 요약하여 "EC50 CHO-PD1"-값[nM]으로 열거되어 있다.

[1014] **인간 Lag3에 관한 ELISA**

[1015] 눈크 맥시소프 플레이트(NUNC 464718)를, 25 µl/웰 재조합 인간 PD1 인간 Fc 키메라 단백질(R&D systems, 2319-L3)로, 800 ng/ml의 단백질 농도에서 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하거나 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 각각의 웰을 90 µl의 차단 완충액(PBS + 2% BSA + 0.05% Tween 20)을 사용하여 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µl 항-Lag3 샘플을 1~9 µg/ml(OSEP 완충액에서 1:3 희석) 농도로 첨가하고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 염소 항-인간 Ig κ 쇠 항체-HRP 접합체(Milipore, AP502P)를 1:2000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다.

[1016] **세포-표면 Lag3 결합 ELISA**

[1017] 25 µL/웰 Lag3 세포(Lag3을 발현하는 재조합 CHO 세포, 10000 세포/웰)를 조직 배양 처리 384-웰 플레이트(Corning, 3701) 속으로 접종하여 37°C에서 하루 또는 이틀 동안 배양하였다. 다음 날 배지 제거 후, 25 µL/웰 항-Lag3 샘플(OSEP 완충액에서 1:3 희석, 6~40 nM 농도로 시작함)을 첨가하고 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 세척(PBST에서 1x90 µL/웰) 후에, 10분간 실온에서, 최종 농도 0.05% 이하로 30 µL/웰 글루타르알데하이드(Sigma Cat. No: G5882)를 첨가하여 고정시켰다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 염소 항-인간 Ig κ 쇠 항체-HRP 접합체(Milipore, AP502P)를 1:1000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 6 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다. 세포 ELISA 결과는 하기 표 21에 요약하여 "EC50 CHO-LAG3"-값[nM]으로 열거되어 있다.

[1018] **인간 A375 종양 세포에 발현된 MHC-II에 대한 LAG-3 결합의 저해(ELISA에 의함)**

[1019] 25 µL/웰 A375 세포(10000 세포/웰)를 조직 배양 처리 384-웰 플레이트(Corning, 3701) 속으로 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 항-LAG3 항체는 비오틴화-Lag3 (250 ng/ml)와 함께 세포 배양 배지에서 1시간 동안 1:3 희석물에서 3 µg/ml 항체-농도로 시작하여 사전-배양하였다. 접종한 세포와 함께 배지 제거 후, 25 µL/웰 항-Lag3 사전-배양 혼합물은 웰로 옮겨졌고, 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 세척(PBST에서 1x90 µL/웰) 후에, 10분간 실온에서, 최종 농도 0.05% 이하로 30 µL/웰 글루타르알데하이드(Sigma Cat. No: G5882)를 첨가하여 고정시켰다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µl/웰 폴리-HRP40-스트렙타비딘(Fitzgerald, 65R-S104PHRPx)을 1:2000 또는 1:8000 희석 하에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척(PBST-완충액으로 3x90 µL/웰) 후에, 25 µL/웰 TMB 기질(로슈, 11835033001)을 첨가하고 2 내지 10분 동안 배양하였다. 측정은 Tecan Safire 2 기기 상에서 370/492 nm에서 수행하였다. 저해 ELISA 결과는 하기 표 21에 "IC50 MHCII/ELISA"-값[nM]으로 열거되어 있다.

표 21

상이한 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 결합의 요약

이중특이적 항체	ELISA huPD1 rel. EC50 [nM]	ELISA huLAG3 rel. EC50 [nM]	EC50 CHO-PD1 rel. EC50 [nM]	EC50 CHO-LAG3 rel. EC50 [nM]	MHCII/E LISA IC50 [nM]
PD1/LAG3 0927 (PD1-0376/LAG3-0414) (1+1)	0.07	0.18	0.1	0.23	1.11
PD1/LAG3 0799 (PD1-0376/LAG3-0416) (1+1)	0.06	0.07	0.07	0.20	0.72
PD1/LAG3 0222 (PD1-0069/ LAG3 25F7) (1+1)	0.16	1.14	0.28	0.72	0.77
PD1/LAG3 0224 (PD1-0098/ LAG3 25F7) (1+1)	0.04	0.86	0.06	0.86	0.79
PD1/LAG3 8310 (PD1-0376/LAG3-0414) (1+2)	0.06	0.06	0.34	0.20	0.47
PD1/LAG3 8311 (PD1-0376/LAG3-0416) (1+2)	0.05	0.06	0.32	0.17	0.39
PD1/LAG3 1252 (PD1-0376/LAG3 25F7) (1+2)	0.03	0.02	0.31	0.64	0.47
PD1/LAG3 8970 (PD1-0376/LAG3-0414) (2+2)	0.05	0.04	0.46	0.20	0.45
PD1/LAG3 8984 (PD1-0376/LAG3-0416) (2+2)	0.05	0.05	0.54	0.17	0.44
PD1/LAG3 9010 (PD1-0376/LAG3-25F7) (2+2)	0.04	0.05	0.36	0.48	0.52

[1020]

[1021] 11.2 결합 비아코어

[1022] PD1 및 LAG3에 결합하는 다중특이적 항체의 항원 결합 특성

[1023] 각각의 표적 항원, 즉 PD1 및 TIM3에 대한 상기 다중특이적 항체의 결합을 비아코어®에 의해 평가하였다.

[1024] PD1 결합은 다음 절차에 따라 평가할 수 있다:

[1025] 항-인간 Fc IgG를 아민 커플링에 의해 CM5 센서 칩(비아코어)의 표면에 고정시켰다. 상기 샘플을 포획하고, hu PD1-ECD를 상기 샘플들에 결합시켰다. 센서 칩 표면은 매 분석 주기 후에 재생시켰다. 데이터를 1:1 랭뮤어 상호작용 모델에 맞추므로써 평형 상수 및 동적 속도 상수들을 최종적으로 수득하였다.

[1026] 20 µg/mL 항-인간 IgG의 약 10,000 반응 단위(RU)(GE 헬스케어 #BR-1008-39)를, GE 헬스케어에서 공급된 아민 커플링 키트를 사용하여 pH 5.0에서 비아코어 T200에서 CM5 센서 칩의 유동 세포 상에 결합하였다. 샘플 및 실행 완충액은 HBS-EP+(0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4)이었다. 유동 세포 온도는 25°C로 설정하였고 샘플 구획 온도는 12°C로 설정하였다. 시스템은 실행 완충액으로 작동 준비되었다.

[1027] 샘플을 10 nM의 농도로 15초 동안 주입하여 제2, 제3 및 제4 유동 세포에 결합시켰다. 그런 다음, 인간 PD1-ECD 농도의 완전한 세트(300 nM, 100 nM, 2 nM, 33.3 nM, 11.1 nM, 3.7 nM, 1.2 nM 및 0 nM)를 각 샘플에 대해 120 초 동안 주입한 후, 10/600초의 해리 시간 및 3 M MgCl₂를 사용한 30초의 두 가지 재생 단계가 이어졌으며, 상

기 두 가지 재생 단계 중 마지막 단계는 실행 완충액으로 "주입 후 추가 세척"을 포함하였다. 최종적으로, 이 중의 기준 데이터를 비아코어 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 1:1 랭뮤어 상호작용 모델에 맞추었다.

- [1028] LAG3 결합은 다음 절차에 따라 평가할 수 있다:
- [1029] GE 헬스케어에서 제공한 비아코어 SA CAP 키트를 이 분석을 수행하기 위해 사용하였다. 역학 값을 HBS-EP+(Ge 헬스케어) 완충액 중 25°C에서 획득하였다.
- [1030] SA CAP 칩을 CAP 키트의 매뉴얼의 규정에 따라 비아코어 T200에 도킹시켰다. 상기 실행 방법은 네 가지 명령을 포함한다. 먼저 CAP 시약을, 'General' 명령을 사용하여, 고정화된 단일 가닥 DNA를 하이브리드화를 위해, 10 µl/분의 유속에서 300초 동안 주입하였다. 다음 명령에서 실행 완충액 중에 비오틴화 Fc-태그된, 인간 Lag3 세포외 도메인의 1 µg/ml 희석물을 15초간 주입하였다. 이로써 약 50 RU의 포획 레벨의 결과가 있었다. 단일-사이클 명령은 5개의 상이한 샘플 농도를 주입한 후, 1200초간 해리 단계를 위해 사용하였다. 그런 다음, 상기 칩을 SA CAP 키트 매뉴얼에 규정된 바와 같이 재생하였다.
- [1031] 마지막으로, 획득한 곡선은 비아코어 T200 평가 소프트웨어 버전 3.0을 사용하여 평가하였다.
- [1032] **결과:** 0799 및 0927과는 별개로, 모든 샘플은 2개의 Lag3 결합 모이어티를 포함하고 따라서 친화성을 나타내기 때문에 상기 상호작용은 1:1 랭뮤어 결합 모델에 적합하지 않았다. 0799 및 0927이 작고 잘못된 쌍으로 된, 2가 샘플 집단을 함유하기 때문에, 0799 및 0927은 또한 약간의 친화성을 나타내었다.
- [1033] 따라서 상기 센서그램은 그 하락률에 따라 순위만 매겨졌다.
- [1034] 이것은 단일-사이클 역학 곡선의 육안 비교로 수행한 것이다. 이를 수행함으로써, 0416-Lag3 ECD 복합체가 이 샘플 세트에서 임의의 다른 복합체보다 더 안정함을 보였다. 1가 <Lag3> Crossmab 포맷(0799)은 이 실험에서 임의의 다른 포맷보다 여전히 더 느린 하락률을 보인다.
- [1035] 또한, 이 실험에서 관찰한 복합체 중 아핀 Lag3-0414/Lag3-0927 - Lag3 ECD 복합체가 가장 약한 것임을 알 수 있었다. 0414 및 0416의 아핀 결합 부분은 그 1가 Crossmab 상용 부분 0927 및 0799의 아핀 부분과 대략 비슷하다. 결과를 표 22에 나타낸다.

표 22

SPR 측정으로 결정된 PD1-LAG3 이중특이적 항체의 결합 품질

샘플	결합 품질
aLAG3(0414)	++
aLAG3(0416)	+++
PD1/LAG3 0927 (1+1)	+
PD1/LAG3 0799 (1+1)	+++
aLAG3(25F7)	++
aLAG3(MDX26H10)	++
aLAG3(BMS986016)	++
aLAG3(BAP050)	+

- [1036]
- [1037] 1+1 이중특이적 항체 0927 및 0799와 비교시 트랜스 포맷의 친화성 평가
- [1038] 이중특이적 분자(샘플) 및 그의 개별적 표적, 또한 PD1 및 LAG3(분석물)의 조합의 해리 상수들이 모든 원자가와 동시에 결합하는 결합력 이득을 평가하기 위해 측정되었다.
- [1039] 비아코어 8K 상에서 측정에 앞서, CM5 센서 칩을 GE 헬스케어에서 제공한 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 제조하였다. 그러므로, 본원에서 항-PGLALA 항체(이러한 항체는 WO 2017/072210호에 기술되어 있음)로 불리는, 샘플의 Fc 부분(즉, PGLALA 돌연변이를 지니는 Fc 부분)에서 특이적 돌연변이에 대한 사내 생산 항체를 pH 5.0의 아세트이트 완충액에서 50 µg/ml 농도로 희석하였다. 상기 항체는 1200초에 걸쳐 8 µl/분 유속으로 모든 유동 세포와 채널에 커플링하고, 약 19000 RU의 결합 반응을 획득하였다.
- [1040] HBS-EP⁺ 완충액(GE HC)을 센서 칩 제조와 그 주된 실행 자체를 위하여 실행 완충액으로 사용하였다. 분석은 3회

17초 동안 샘플 주입으로 구성되는 스타트업 후에 시작한 후, 10 mM NaOH 용액을 이용하는 재생 단계가 이어진다. 제1 단계에서, 17초간 10 μl/분 유속으로 주입함으로써 센서 칩 상에서, 개별 채널의 유동세포 2상으로, 항-PGLALA 항체를 사용하여, 상이한 샘플을 포획하였다. 제2 단계에서, 세 분석물(PD1, LAG3-Fc, 2+2 PD1/LAG3-Fc Fusion) 중 하나를 200초간 50 μl/분 유속으로 유동세포 모두에 주입한 후, 1000초간(LAG3-Fc의 경우 600초)의 해리 단계가 이어졌다. 마지막으로, 항-PGLALA 항체/샘플 복합체를 10 mM NaOH 용액을 30초간 2회 연속 주입하여 용해시켰다. 각 개별적 역학 측정은 상이한 분석물 농도(0 nM, 5 nM, 25 nM and 100 nM)의 네 개의 사이클로 구성된다.

[1041] 비아코어 8K 평가 소프트웨어를 사용하여 결과 데이터를 평가하였다. 1:1 해리 맞춤을 적용하여 결과적 kd 값을 몇 분 안에 복합체 반감기로 변환하였다. PD1/Lag3-Fc 융합 항원 결합 분자의 친화성 결합 및 그 주된 개별 기여자(PD1 또는 Lag3 중 어느 하나) 간의 상이점을 산출하여, 다가 및 이중특이적 결합에 의한 안정도를 기술하는 세 개 카테고리 중 하나로 정렬하였다(표 23).

표 23

SPR 측정으로 결정되고 PD1-LAG3 이중특이적 항체의 결합능에 의해 제공되는 복합 안정성의 증가

샘플	결합 품질
PD1/LAG3 0927 (1+1)	++
PD1/LAG3 0799 (1+1)	+++
PD1/LAG3 0725 (1+1 trans)	+
PD1/LAG3 0750 (1+2 trans)	++

[1042]

[1043] **11.3 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체를 통해 동시 참여 후 세포의 PD1 및 LAG3의 이량체화**

[1044] 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체를 실시예 10에서 기술된 다양한 포맷에서 생성한다. 이 세포 분석은 2개의 상이한 수용체의 이량체화 또는 결국 결합/상호작용을 입증하는 데 사용하였고, 2개 표적 모두에 대한 이중특이적 항체와의 결합 또는 교차-결합시에, 효소의 두 단편을 사용하여, 세포질적으로 융합한다. 이에 유일하게 하나의 수용체만이 아무런 효소 활성을 보이지 않았다. 이 특이적 상호작용에 관하여, 상기 두 수용체의 세포질내 C-말단 엔드는 수용체 효소의 이중 아단위에 개별적으로 융합된다. 단일 효소 아단위 단독으로는 보고자 활성을 보이지 않았다. 그러나, 두 수용체 모두에 대한 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체 작제물의 동시 결합이 두 수용체의 국소적인 세포질 축적, 2개의 이중 효소 아단위의 보상으로 이어지고, 결국 기질을 가수분해하는 특이적이고 기능적인 효소를 형성함으로써 화학발광 신호를 생성하게 되는 것으로 예상하였다.

[1045] 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 교차-결합 효과를 분석하기 위해, 10,000 PD1⁺ LAG3⁺ 인간 U2OS 세포/웰을 백색 평평 바닥 96-웰 플레이트(costar, cat.no. #3917) 속에 접종하여 분석 배지에서 밤새 배양하였다. 다음날 세포 배지를 폐기하였고 신선한 배지로 대체하였다. 항체 또는 리간드의 희석물을 제조하여 적정화 용량의 지시된(이중특이적) 항체를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 기질/완충액 혼합물(예를 들어, PathHunterFlash 검출 시약)을 첨가하여 다시 1시간 동안 배양하였다. 동시 결합 및 이량체화 시 유도되는 화학발광 측정을 위해 테칸 인피니트 판독기를 사용하였다.

[1046] 결과는 도 5a 및 5b에 도시되어 있다. 항체 농도에 대한 화학발광(RU로 측정됨)이 플랫폼되었다. 단일특이적(2가) 항-LAG3 항체는 화학발광 신호를 일으킬 수 없었던 반면, 모든 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체는 농도 의존성 방법으로 화학발광 신호를 유도하였다.

[1047] 동시 결합(및 발광 신호의 유도)의 특이성을 보이기 위해 경쟁 실험을 수행하였다: 전에 나타낸 바와 같이, 이중특이적 항체(1252)는 투여량-의존적 형태로 발광을 유도하였다(도 5c). 동일한 이중특이적 항체가 aLAG3 항체(0156, MDX25F7) 또는 항-PD1 항체(0376) 중 어느 하나의 존재 하에서 제공되었다면, 신호는 거의 저해되었거나(PD1 경쟁) 또는 적어도 유의하게 감소되었다(LAG3). 모 항체 두 가지 모두는 이중특이적 항체(1252, 2+1 LAG3/PD1-포맷)에 포함되는 동일한 바인더이다. 경쟁하는 항체를 각각 20 μg/ml의 일정한 농도에서 제공하였다.

[1048] 추가 실험의 결과는 도 5d에 도시되어 있다. 이전의 경쟁 실험과 유사하게, 모 aLAG3(0156) 또는 PD1 항체 (0376; 각 항체는 10 µg/ml로 일정함)는, 발광 신호에 의해 측정된 바와 같이, PD1 Lag3 이중-발현 세포에 대한 이중특이적 항체(1252, aLAG3-0156 및 PD1-0376의 2+1 포맷)의 결합 특성에 영향을 미친다. 항-PD1 항체 (0376) 및 또한 재조합 LAG3:Fc 단백질(0160)의 경쟁은 신호를 거의 없앴고, 반면 단일 aLAG3 바인더(0156)만 존재할 때, 부분적 저해를 일으켰다. 0156과 상이한 에피토프에 결합하고 있는 2개의 또 다른 항-LAG3 항체 0414 및 0416은 aLAG3 바인더(0156)를 포함하는 이중특이적 항체와의 결합을 위해 경쟁하지 않았는데, 그 이유는 이들 항체가 신호를 유의하게 변형하지 않았기 때문이다.

[1049] 또 다른 실험에서, 상이한 aLAG3 바인더(0414 대 0416) 및 상이한 포맷(1+1 대 2+1)을 포함하는 이중특이적 항-LAG3/항-PD1 항체들의 동시 결합을 비교하였다(도 6a 내지 도 6d). 전술한 바와 같이, 1+1 CrossMab 포맷(0799 및 0927) 또는 2+1포맷(2개의 Lag3 결합 팔 및 하나의 PD1 교차Fab 단편이 융합된 C-말단: 8311 및 8310) 중 하나에서 여러 개의 항-LAG3/항-PD1 이중특이적 항체를 검사하였다. 도 6a 및 6b에는, 바인더 aLAG3-0416이 있는 작제물에 대한 곡선(흡광도 대 농도) 및 도 6c 및 6d에는, aLAG4-0414가 있는 상응하는 작제물에 대한 곡선이 도시되어 있다. 검사한 모든 작제물은 세포에 결합할 수 있고 화학발광을 유도할 수 있었다. 결합 곡선에 대해 산출된 EC₅₀ 값을 하기 표 24에 나타낸다.

표 24

이량체화 결합 분석에서 측정된 EC₅₀ 값

이중특이적 항체	포맷	MW [kD]	EC ₅₀ [pM]
0927 (PD1-0376/LAG3-0414)	1+1	145	41
0799 (PD1-0376/LAG3-0416)	1+1	145	76
8310 (PD1-0376/LAG3-0414)	1+2	193	28
8311 (PD1-0376/LAG3-0416)	1+2	193	119

[1050]

[1051] 또 다른 실험에서, 상이한 aLAG3 바인더(0414 대 0416) 및 상이한 포맷(2+1 대 2+2)을 포함하는 이중특이적 항-LAG3/항-PD1 항체의 동시 결합을 비교하였다(도 7a 내지 도 7d), 전술한 바와 같이, 2+1포맷(2개의 LAG3 결합 팔 및 하나의 PD1 교차Fab 단편이 융합된 C-말단: 8311 및 8310) 또는 2+2 crossmab 포맷(2개의 LAG3 결합 팔 및 2개의 PD1 교차Fab 단편이 융합된 C-말단: 8970 및 8984)중 하나에서 여러 개의 항-LAG3/항-PD1 이중특이적 항체를 검사하였다. 도 7a 및 7b에는, 바인더 aLAG3-0414가 있는 작제물에 대한 곡선(흡광도 대 농도)이 도시되어 있고, 도 7c 및 7d에는, aLAG4-0416이 있는 상응하는 작제물에 대한 곡선이 도시되어 있다. 검사한 모든 작제물은 세포에 결합할 수 있고 화학발광을 유도할 수 있었다. 결합 곡선에 대해 산출된 EC₅₀ 값을 하기 표 25에 나타낸다.

표 25

이량체화 결합 분석에서 측정된 EC₅₀ 값

이중특이적 항체	포맷	MW [kD]	EC ₅₀ [pM]
8310 (PD1-0376/LAG3-0414)	2+1	193	114
8311 (PD1-0376/LAG3-0416)	2+1	193	124
8970 (PD1-376/LAG3-0414)	2+2	242	83
8984 (PD1-0376/LAG3-0416)	2+2	242	91

[1052]

- [1053] 또 다른 실험에서, 고전적인 1+1 *CrossMab*^{Vh-VL} 포맷의 이중특이적 항-LAG3/항-PD1 항체 PD1/LAG3 0927의 동시 결합을 1+1 트랜스 포맷(PD1/LAG3 0725) 및 2+1 트랜스 포맷(PD1/LAG3 0750)의 이중특이적 항-LAG3/항-PD1 항체와 비교하였다. 이 실험을 위해서, 다음의 방법에 대한 변화를 적용하였다. 상이한 항-PD1/항-LAG3 항체 포맷의 교차-결합 효과를 분석하기 위해, 7500 PD1⁺ LAG3⁺ 인간 U2OS 셀/웰을, 항체의 비-연속적 희석물(0.29 pM 내지 5484 pM의 최종 농도)과 함께, 백색 평평 바닥 96-웰 플레이트 속에 심어서 CO₂ 배양기에서 20시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그런 다음, 분석 플레이트를 실온으로 평형 상태화하고, 기질/완충액 혼합물(PathHunterFlash 검출 시약, Discoverx)을 첨가하여 다시 4시간 동안 배양하였다. 동시 결합 및 이량체화 시 유도되는 화학형광 측정을 위해 SpectraMax L 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하였다.
- [1054] 도 7e에는, PD1-LAG3 이중특이적 항체 1+1 CrossMab(0927), N-말단 aPD1 및 C-말단 aLAG3(0725)이 있는 1+1 트랜스 CrossMab, 또한 N-말단 aPD1 및 N-플러스 C-말단 aLAG3(0750)이 있는 2+1 트랜스 CrossMab의 투여량-반응 곡선(발광 대 농도)이 도시되어 있다. PD1/LAG3 0927과 비교할 때, PD1/LAG3 0725의 PD1 LAG3 수용체 교차결합 효과는 PD1/LAG3 0750에 대해 명확히 더 높은 반면, PD1/LAG3 0750에 대해서는 약간 낮다.
- [1055] 11.4 PD-1 & LAG-3 콤보 리포터 분석에서 이중특이적 항-LAG3/항-PD1 트랜스 CrossMab 변이체의 측정
- [1056] 시험관내에서 억제된 T 세포 반응의 복구시 상이한 항-PD1-LAG3 항체 포맷의 중화 효능을 검사하기 위해, 상업적으로 시판하는 리포터 시스템을 이용하였다. PD-1 & LAG-3 콤보 생물학적 분석은 PD1-, LAG3- 및 T 세포 수용체(TCR)-발현 리포터 세포, MHC-II- 및 PDL1-발현 중앙 세포 및 TCR-활성화-항원으로 이루어진다.
- [1057] 효과기 세포는 인간 PD1, 인간 LAG3, 인간 TCR 및 NFAT 반응 요소(NFAT-RE)에 의해 추진되는 루시퍼라제 리포터를 발현하는 Jurkat T 세포다. 표적 세포는 인간 PD-L1을 발현하는 A375 세포이다. 간략하게, 상기 리포터 시스템은 3 단계를 기반으로 한다: (1) TCR 활성화-항원-유도 NFAT 세포 활성화, (2) PD-L1(A375 세포) 및 PD1(Jurkat 세포)뿐 아니라 MHCII(A375 세포) 및 LAG3⁺(Jurkat 세포)사이의 상호작용에 의해 매개된 활성 신호의 저해, 및 (3) PD1 및 Lag3-길항성/중화 항체에 의한 NFAT 활성 신호의 회복.
- [1058] 이 실험을 위해, 96-웰 평평 바닥 분석 플레이트에서, 37°C에서 CO₂ 배양기에서 웰 당 1 x 10⁴ A375 표적 세포를, TCR 활성화 항원(Promega)과 함께 밤새 배양하였다. 그런 다음, 플레이트의 배지를 제거하고, 항-LAG3/항-PD1 항체의 계열 희석물(0.01 nM 내지 857 nM의 최종 분석 농도)과 또한 웰 당 5 x 10⁴의 Jurkat 효과기 세포를 첨가하였다. 37°C에서 CO₂ 배양기에서 6시간 배양 후, 분석 플레이트를 실온으로 평형화하였고 80 μl의 ONE-Glo Ex 기질(Promega)을 각각의 웰에 첨가하였다. 배양 10분 후, 발광을 SpectraMax L 플레이트 판독기(Molecular Devices)에서 측정하였다. 그러나, 상기 두 수용체에 대한 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체 작제물의 동시 결합이 두 수용체의 국소적인 세포질 축적, 2개의 이중 효소 아단위의 보상으로 이어지고, 결국 기질을 가수분해하는 특이적이고 기능적인 효소를 형성함으로써 화학발광 신호를 생성하게 되는 것으로 예상하였다. 도 7f에서는, 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체 1+1 CrossMab(0927), N-말단 aPD1 및 C-말단 aLAG3(0725)이 있는 1+1 트랜스 CrossMab, 또한 N-말단 aPD1 및 N-플러스 C-말단 aLAG3(0750)이 있는 2+1 트랜스 CrossMab의 투여량-반응 곡선(발광 대 농도)이 도시되어 있다. 각각의 리간드를 갖는 PD1 및 LAG3 상호작용을 차단함으로써 리포터 세포 활성화를 회복시키는 0927 및 0725의 능력은 비슷하지만 그 능력이 0750에 대해서는 더 높다. 이것은 또한 표 26에 열거한 EC₅₀ 값으로 나타난다.

표 26

PD1 & LAG-3 콤보 리포터 분석에서 측정된 EC₅₀ 값

이중특이적 항체	포맷	MW [kD]	EC ₅₀ [nM]
PD1/LAG3 0927	1+1 시스	145259	3.1
PD1/LAG3 0725	1+1 트랜스	145890	2.2
PD1/LAG3 0750	2+1 트랜스	192888	0.6

[1059]

[1060] 실시예 12

[1061] 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체의 기능적 특징규명

[1062] 12.1 T-세포 표면에 결합시 내재화 감소

[1063] 유동 세포 분석에 의한 수용체 내재화의 측정

[1064] 수용체 내재화는 표적화된 수용체가 TCR-신호를 저해하기 위한 준비가 되어 있는 세포-표면 상에 급속히 재발현을 하는 동안 수시간 내에 봉쇄될 수 있는 분자에 대한 중요한 싱크를 나타낸다. 따라서 본원은 유동 세포 분석에 의해 본원의 작제물의 결합시의 수용체 내재화를 평가하였고, 상이한 이중특이적 포맷과 함께 4°C에서 염색된 샘플을 4°C에서 염색한 후 37°C 에서 3시간 동안 배양한 샘플과의 비교를 위해 참조로서 사용하였다.

[1065] 1 µg/ml의 플레이트 결합 항-CD3 및 1 µg/ml의 가용성 항-CD28 항체로 사전에 배양한, 3일 다클론으로 활성화된 CD4 T 세포는 항-LAG3 또는 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체(2중) 중 하나의 존재 하에, 30분간 4°C에서 배양하였다. 그런 다음 상기 세포는 세척하고, 두 그룹으로 나누어, 제1 그룹은 37°C에서 3시간 더 배양하고, 다른 한 그룹은 BD Cell Fix 로 고정하기 전, 즉시 표지된 2차 항체(e마यो사이언스)로 염색하였다. 3시간 배양 후, 또한 제2 그룹의 세포도 고정 전 표지된 2차 항체와 함께 염색하였다. 염색 후, 세포를 수거 전에 PBS/2% FCS로 2회 세척하였다.

[1066] 세포는 LSRFortessa(BD 바이오사이언시즈)에서 수거하였고, 세포 표면 상의 측정 가능한 발현 수준은 상기 두 그룹끼리 비교하였다. 결과는 도 8b에 도시되어 있다. 3시간 후 모든 이중특이적 포맷 및 단일특이적 2가 aLAG-3 항체도 또한 내재화하였지만, 1+1포맷(PD1/LAG3 0799 및 PD1/LAG3 0927)에서 이중특이적 항-PD1/항-LAG3 항체는 최소로 내재화되었음을 관찰하였다.

[1067] 형광 공초점 현미경 검사에 의한 항체 국지화 및 내재화의 가시화

[1068] 활성화된 CD4-양성 세포를 CMFDA(인비트로젠)로 염색하였고 레트로넥틴(Retronectin)(타카라 바이오(Takara Bio))으로 처리된 둥근 커버슬립 상에 플레이트하였다. 형광-태그된 항체(1 µg/mL: a-LAG3 (1256), 1+1 PD1/LAG3 비스펙(Bispec)(0927), PD1-LAG3 1+2 비스펙(8310) 및 알렉사 647로 표지된 PD1-LAG3 2+2 비스펙(8970))를 상이한 유지시간 동안(15분, 1시간 및 3시간) 성장 배지에 직접 첨가하기 전에, 세포가 37°C에서 4시간 동안 부착되도록 하였다. 반응을 중단시키고 비결합 항체를 씻어내기 위해 차가운 PBS(Lonza)를 사용하였다. 그런 다음, 세포는 Cytifix(BD)로 20분간 4°C에서 고정하여 PBS(Lonza)로 2회 세척하였다. 그런 다음, 커버슬립을 옮겨서, 플루오로마운트(Fluoromount) G(e마यो사이언스)로 유리 슬라이드 상에 올렸고, 이미징하기 전에 암실에서 밤새 4°C로 보관하였다. 형광 이미지는 도 9a에 도시되어 있다. 백색 신호는 표지된 항체의 국지화를 보여준다. 고도로 표적화된, 세포막 ROI로부터의 형광 신호 강도는, 동일한 세포의 세포질 ROI로부터의 형광 신호 강도에 의해 나누어 졌고, 박스 차트에서 보여지는 비율이 산출되었다. 샘플을 비교하기 위해서, 일 방향 ANOVA 분석 미보정 Fisher의 LSD(One Way ANOVA analysis Uncorrected Fisher's LSD)를 사용한다(* = p<0.05; **=p <0.01). 결과는 도 9b에 도시되어 있다. 시간 경과에 따른 분석은, TIM3 항체(대조로 사용하는)의 세포내 클러스터링과 비교시 이중특이적 항체 및 Lag3 항체에서 보다 높은 막 국지화를 보여준다. 3시간 후 모든 이중특이적 포맷 및 단일특이적 2가 aLAG-3 항체도 1+1 PD1/LAG3 비스펙(0927)만을 예외로 하고서 내재화되었음을 관찰하였다(도 9a).

- [1069] 형광 공 초점 현미경은 60x 오일 대물 렌즈를 가진 Zeiss사의 역 LSM 700으로 수행되었다. 현미경에 연결된 Zen (Zen) 소프트웨어(Zeiss)를 이용하여 이미지를 수집하였다. 이마리스(Imaris) 소프트웨어(Bitplane; 옥스포드 인스트루먼트)로 이미지를 분석하였고 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)(그래프패드 소프트웨어)으로 통계적 분석을 수행하였다.
- [1070] **12.2 통상적인 T 세포 대 Treg에 대한 결합**
- [1071] Treg 상의 LAG3이 Treg의 억제 기능을 역방향으로 조절하는 것으로 보이기 때문에, 리드 PD1-LAG3 BsAb의 원하는 특성은 Treg 보다는 오히려 통상적인 T 세포에 우선적으로 결합하는 능력이다. 따라서, 항체를 차단하면서 Tregs 상의 LAG3을 표적화하는 것은 Tregs의 억제 기능을 증가시킴으로써 해로울 수 있고 결국에는 다른 T 세포에 대한 양성 차단 효과를 덮을 수 있다. 따라서, 함께 배양한 종래의 활성화된 T 세포와 조절 T 세포에 대한 상이한 항-PD1/항-LAG3 이중특이적 항체 포맷의 경쟁적 결합을 평가하였다.
- [1072] 건강한 공여자 PBMC(Miltenyi)의 조절 T 세포(Tregs) 및 통상적인 T 세포(Tconv)를 분류하였고, 5mM 세포 추적 바이올렛(CellTraceViolet) 또는 CFSE 막 염료로 각각 표지하여, 1:1 비율로 3일 동안 1 µg/ml의 플레이트 결합 항-CD3 및 1 µg/ml의 가용성 항-CD28 항체와 함께 배양하였다. 3일 후에, 직접 표지한 항-PD1, 항-LAG3 또는 이중특이적 항체 중 하나로 세포를 30분간 4°C에서 배양하였고, BD Cell Fix로 고정하여 LSRFortessa(BD 바이오사이언시스)에서 획득하였다.
- [1073] 단일특이적 항-LAG3 항체가 Tregs 및 통상적인 T 세포에 동등하게 잘 결합한 반면(도 10a), PD1의 더 높은 발현 수준으로 인하여 항-PD1의 상응 부분은 Tregs 상에서보다 효과기 T 세포 상에서 우선적으로 통상적인 T 세포에 결합한다(도 10b). 흥미롭게도, PD1/LAG3 이중특이적 항체 (0927)의 1+1포맷은 또한 Tregs보다 통상적인 T 세포에 우선적으로 결합하는 능력을 유지하였다(도 10c). 또한, 통상적인 T 세포에 대한 이러한 우선적인 결합은 통상적인 T 세포 상의 신호 대 Tregs 상의 신호의 상이점(델타)을 묘사함으로써 가시화될 수 있다(도 10d). 2+1 및 2+2 포맷은 효과기 T 세포에 대한 친화력 주도 선택성을 보여주지 않았고 단일특이적 항-LAG3 항체에 대한 이들의 결합에 비견할 만하였다.
- [1074] **12.3 방사능 조사된 동종이계의 PBMC와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B의 Treg 억제와 IFN-γ 방출에 대한 PD-1 및 LAG-3 차단의 효과**
- [1075] 또한, 이중특이적 항체 포맷의 결합 특성에서의 상이점이 Tregs보다 Tconv에 임의의 기능적 이점을 제공할 수 있는지의 여부를 검사하였다. 조절 T 세포(Treg)-억제 분석을 포함하는 기능의 연구에서, 동일한 공여자로부터의 PBMC는 2개의 샘플로 나누어졌는데: 두 개의 샘플 중 하나는 CD4 T 세포가 풍부하였고, 다른 하나는 마이크로비드 키트(Miltenyi Biotec)를 통해서 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T 세포로 정의된 Tregs가 풍부하였다. 일단 상기 두 집단을 정제하였으면, 나중에 FACS에서 하기 세포를 구별할 수 있도록 CD4 T 세포는 5 µM의 카르복시-플루오레세인-숙신아미드 에스테르(CFSE)로 표지하였고, 한편 Tregs는 5 µM 세포 추적 바이올렛(CTV)으로 표지하였다.
- [1076] 그런 다음, 항-LAG3 항체(리드 0414 및 백업 0416) 또는 경쟁자 항-LAG3 항체(BMS-986016 및 인간화 BAP050)의 존재 또는 부재 하에서, 관련 없는 공여자로부터 방사능 조사된 PBMC(10⁵)와 함께, 10 µg/ml의 농도에서 본원의 항-PD1 항체와 조합하여, CD4 T 세포(10⁵) 및 Tregs(10⁵) 둘 모두를 96 웰 플레이트에서 1:1 비율로 공배양하였다. Tregs로 CD4 T 세포 효과기 기능의 억제 정도를 추정하기 위한 대조군으로서, Tregs의 부재 하에서 방사능 조사된 PBMC(10⁵)와 CD4 T 세포(10⁵) 또한 공배양하였다.
- [1077] 5일 후에, 세포-배양 상청액을 수거하여, 나중에 ELISA(R&D systems)에 의해 IFN-γ 수준을 측정하는 데 사용하였고, 골지 플러그 (브레펠딘 A) 및 골지 스태프(모넨신)의 존재 하에서 추가 5시간 동안 세포를 37°C에서 더 방치하였다. 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸 정착성 염료 아쿠아(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄 완충액(BD 바이오사이언시스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언시스) 및 IFN-γ (e바이오사이언시스)에 대한 세포내 염색을 수행하였다. 결과는 도 11에 도시되어 있다.
- [1078] 본 발명의 PD1/LAG-3 이중특이적 항체(0927)는, Tconv보다 현저하게 많은 양의 그랜자임 B 분비에 의해 나타나듯이, 모 항-PD1 항체 또는 캄브롤리주맙 단독(*P*<0.05)의 존재 하에, 또는 체크포인트 억제제의 부재 시(*P*<0.001), 조절 T 세포의 엄격한 통제로부터 Tconv 회피를 이끌어내었다. 니볼루맙과 조합하여 경쟁자 항-LAG3 항체 BMS-986016은, Treg의 억제로부터 Tconv 효과기 기능을 유의하게 구제하지 못하였다.

- [1079] 12.4 B 세포-립프아세포양 세포주(ARH77)와 공배양된 인간 CD4 T 세포에 의한 세포독성 그랜자임 B 방출에 대한 PD-1/LAG-3 이중특이적 항체의 효과
- [1080] 종양 세포주(ARH77)와 공배양했을 때, 항-PD-1 및 항-LAG-3 모 항체의 조합과 치료의 표준에서 사용하는 항-PD1 항체와 비교하여, CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B 분비를 유도한 본원의 상이한 이중특이적 항체 포맷의 능력을 평가하였다.
- [1081] 총 여섯 개의 포맷을 검사하였는데, 3개는 항-PD1(0376) 및 항-LAG3 (hu 1256, chi 0414) 항체의 조합으로부터 생성되었고, 추가적인 3개 포맷은 항-PD1(0376) 및 항-LAG-3(hu1257, chi 0416) 항체의 조합으로부터 생성되었다.
- [1082] 도 13에서 볼 수 있듯이, 2개의 이중특이적 포맷, 항-LAG3(hu 1256, IgG1 PGLALA로서 항-LAG3 0414) 및 항-PD1(0376)으로부터 생성한 1+1(0927) 및 2+2(8970), 또한 모 항체의 조합은, 미처리 CD4 T 세포(각각 $P = 0.0005$, $P = 0.01$ 및 $P = 0.0001$)와 비교시, CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B 분비를 유의하게 증가시켰다. 상응하는 2+1포맷(8310)은 유사한 경향을 보였지만, 반면 이 포맷은 통계적 유의성($P=0.07$)에는 도달하지 못했다.
- [1083] 이중특이적 항체 항-LAG-3(hu 1257, IgG1 PGLALA로서 항-LAG3 0416)을 항-PD1(0376)과 조합하여 생성한 이중특이적 항체에 관해서, 1+1포맷(0799) 및 2+2(8984)는, 미처리 CD4 T 세포(각각 $P = 0.0032$ 및 $P = 0.0064$)와 비교시, 그랜자임 B 양성 CD4 T 세포의 빈도수를 유의하게 증가시켰다.
- [1084] 체크포인트 저해제의 존재 하에서 배양된 세포와 비교할 때, 니볼루맙 및 펠브롤리주맙 중 어느 것도 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B의 더 높은 분비를 유의하게 촉진하지 못하였다(도 13).

표 27

세포독성 그랜자임 B 방출에 대해 검사한 PD1-LAG3 이중특이적 항체의 효과

샘플	효과
PD1/LAG3 0927 (1+1)	+++
PD1/LAG3 8970 (2+2)	+
PD1/LAG3 8310 (1+2)	+/-
PD1/LAG3 0799 (1+1)	++
PD1/LAG3 8984 (2+2)	++
PD1/LAG3 8311 (1+2)	+/-
aLAG3(BMS986016)	++

- [1085]
- [1086] 12.5 면역원성 흑색종-항원 펩티드 풀로 기억된 후에 흑색종 환자 PBMC의 CD4 T 세포에 의한 그랜자임 B와 IFN- γ 분비에 대한 PD1과 LAG-3 차단 효과
- [1087] 흑색종 환자 PBMC가 검출가능한 빈도의 종양-항원 특이적 T-세포를 함유한다는 것은 이전에 기술되었다. 따라서, 개념의 증명 목적으로, 항-LAG-3 항체(0414) 플러스 항-PD-1(0376)의 조합 대 1+1(0927) 포맷의 유도 이중특이적 항체 또는 항-PD-1 단독을, 면역원성 흑색종 관련 항원 펩티드 풀을 사용하여 밤새 재-자극 받은 흑색종 환자 PBMC에 대해 검사하였다.
- [1088] 항-PD-1 단독(0376), 항-LAG-3(0414, 10 $\mu\text{g/ml}$) 항체와 조합으로, 또는 이중특이적 1+1포맷(0927, 20 $\mu\text{g/ml}$) 항체로서 포화 농도(10 $\mu\text{g/ml}$)의 존재 또는 부재 하에, 흑색종 환자로부터 10^5 내지 10^6 개의 PBMC를 실온에서 배양하였다. 그런 다음, 단백질 수송 저해제 골지 플러그(브레펠린 A) 및 골지 스타(모넨신)의 존재 하에 MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, Melan-A/MART-1, NYESO-1, 멜라닌세포 단백질 Pmel 17 gp100, 티로시나제, 티로신-관련 단백질 2와 같은 면역원성 종양 관련 항원의 풀을 이용하여 T-세포들을 밤새 재자극하였다.
- [1089] 그런 다음, 세포를 세척하고, 표면 상에서 항-인간 CD4 항체 및 생존/사멸 정착성 염료 아쿠아(인비트로젠)로 염색한 후에 픽스/펄 완충액(BD 바이오사이언스)으로 고정/투과시켰다. 그랜자임 B(BD 바이오사이언스) 및 IFN- γ (e바이오사이언스)에 대한 세포내 염색을 수행하였다.
- [1090] 항-LAG-3 및 항-PD-1 항체($P < 0.01$ 및 $P < 0.001$)의 조합과 이중특이적 항체 둘 다 유의하게($P < 0.01$ 및 $P < 0.0001$)

종양-항체 특이적 T 세포 효과기 기능(즉, 그랜자임 B 및 IFN- γ 분비)을 향상시켰지만, PD-1 차단 단독으로는 어떤 효과도 나타나지 않았다(도 12).

[1091] 실시예 13

[1092] PD1/LAG3 이중특이적 항체 및 생체 내 CEACAM5 CD3 TCB의 조합 요법에 의한 강력한 항-종양 효과

[1093] WO 2014/131712 A1호 또는 WO 2016/079076 A1호에 기술된 방법에 따라 TCB 분자를 제조하였다. 본 실험에서 사용한 항-CEA/항-CD3 이중특이적 항체(CEA CD3 TCB 또는 CEA TCB)의 제조가 WO 2014/131712 A1호의 실시예 3에 기술되어 있다. CEA CD3 TCB는 "2+1 IgG" 교차Fab" 항체 이고 2개의 상이한 중쇄와 2개의 상이한 경쇄를 포함한다. CH3 도메인("눈 인투 홀")에서의 점 돌연변이는 두 개의 상이한 중쇄의 조립을 촉진하도록 유도하였다. CD3 결합 Fab에서 VH 및 VL 도메인의 교환은 2개의 상이한 경쇄의 정확한 조립을 촉진하기 위해 만들었다. 2+1은 CEA에 특이적인 두 개의 항원 결합 도메인 및 CD3에 특이적인 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다는 것을 의미한다. CEA CD3 TCB는 서열번호 146, 서열번호 147, 서열번호 148 및 서열번호 149의 아미노산 서열을 포함한다. CEACAM5 CD3 TCB는 동일한 포맷을 가지지만, 다른 CEA 바인더를 포함하고, 경쇄의 정확한 페어링을 지원하기 위한 CD3 바인더의 CH 및 CL 도메인에서의 점 돌연변이를 포함한다. CEACAM5 CD TCB는 서열번호 150, 서열번호 151, 서열번호 152 및 서열번호 153의 아미노산 서열을 포함한다.

[1094] a) 예시적 물질과 방법

[1095] PD1/LAG3 이중특이적 항체 0927을 인간 체장 BXPC3 암 모델에서 인간 CEACAM5 CD3 TCB와 조합하여 1.5 mg/kg 또는 3 mg/kg의 농도로 검사하였다. BXPC3 세포는 NSG 인간화 마우스에서 마우스 섬유아세포주(3T3)를 사용하여 피하로 공동이식하였다.

[1096] BXPC3 세포주의 제조: BXPC3 세포(인간 체장암 세포)를 원래 ECACC(European Collection of Cell Culture)로부터 얻었고 확장 후에 글리카트 인터널 세포 은행(Glycart internal cell bank)에 위탁하였다. BXPC3 세포를 10% FCS(PAA Laboratories, 오스트리아), 1% 글루타맥스(Glutamax)를 함유하는 RPMI에서 배양하였다. 5% CO₂의 물-포화 대기에서 37°C에서 상기 세포를 배양하였다.

[1097] 완전히 인간화한 마우스의 생산: 실험 시작 시점에 생후 4~5 주인 암컷 NSG 마우스(Jackson Laboratory)를 명확한 가이드라인(GV-Solas; Felasa; TierschG)에 따라 12시간 햇빛/12시간 어두움의 일일 사이클로 특이적 병원체가 없는 조건 하에서 유지하였다. 실험적 연구 프로토콜을 검토하였고 지방 정부의 승인을 받았다(P 2011/128). 도착 후, 새로운 환경 적응과 관찰을 위해 동물을 1주간 관리하였다. 지속적인 건강 모니터링을 정기적으로 수행하였다. 15 mg/kg의 부술피판(Busulfan)으로 NSG 마우스에 복강내 주사하였고, 이어서 1일 후 제대혈에서 단리한 1x10⁵ 인간 조혈 줄기 세포를 정맥내 주사하였다. 줄기세포 주사 후 14~16주째에 마우스는 설하 출혈이 있었고, 성공적인 인간화를 위해서 유동 세포 분석에 의해 혈액을 분석하였다. 마우스에 나타난 인간 T 세포 빈도에 따라서, 효과적으로 이식된 마우스를 상이한 요법 군으로 랜덤화하였다.

[1098] 효능 실험: 1 x 10⁶ BXPC3 세포(CEACAM5를 발현하는 인간 체장 암종 세포주)를 사용하여, 0일째에 1:1 비율로 매트릭셀(matrigel)의 존재 하에 완전히 인간화된 HSC-NSG 마우스에게 피하 접종하여 검사하였다. 칼리퍼로 전체 실험기간에 매주 2 내지 3회 종양을 측정하였다. 15일째에 250 mm³의 평균 종양 크기로 마우스를 종양 크기에 대해 랜덤화하였고, 매주 정해진 치료(비히클(히스티딘 완충액), 항-PD1(0376), 니보루맵, 펨브롤리주맵 또는 항 PD1-LAG3 0927)를 시작하였고, 최대 400 μ l로 복강내로 주사하였다. 종양 성장은 칼리퍼를 이용하여 매주 2~3회 측정하였고 종양 부피는 다음과 같이 산출하였다.

[1099] $T_v: (W^2/2) \times L$ (W: 폭, L: 길이)

[1100] 상기 연구를 47일째에 종결하였다.

[1101] b) 결과

[1102] 47일이라는 시간에 걸쳐, 각 마우스 치료 그룹 내에서 평균 부피로서 종양 부피(mm³ +/- SEM)의 측정값이 도 14에 도시되어 있다. CEACAM5-TCB를 사용한 치료만 유일하게, 미처리 비히클 그룹과 동일한 질병 진행을 보여준다. 그러나, 역으로, 니보루맵 및 펨브롤리주맵은, 종양-성장 통제에 도달함이 없이, 종양 성장을 감소시켰다. 놀랍게도, 3 mg/Kg 농도에서 PD1/LAG3 이중특이적 항체 0927은, PD-1에 추가적인 LAG-3의 공동-차단의 상

승효과를 나타내는 치료된 동물 모두에서 종양 성장을 완전히 억제하였다.

[1103] 도 15a 내지 도 15f에는, 47일이라는 시간에 걸쳐서, 각 그룹에서 항-종양 반응의 동종성을 나타내는 각 개별 동물에 대한 종양 부피의 측정치(mm³ +/- SEM)가 도시되어 있다.

[1104] CEACAM5 CD3 TCB 단독 치료에 대한 던넛(Dunnett)의 방법을 사용하여 통계적 유의성을 산출하였다. 다중 비교를 목적으로 그룹 평균치에서의 유의미한 차이를 검사하기 위해, 던넛의 방법을 이용하여 분산 표준 분석(ANOVA)이 자동으로 얻어진다. 던넛의 방법은 평균값들이 대조군의 평균값과 상이한지 여부를 검사한다.

[1105] 얻어진 TGI 및 TCR 값을 표 28에 나타낸다(TGI는 종양 성장 억제를 의미하고, TGI > 100은 종양 퇴행을 의미하고, TGI = 100은 종양 정체로 정의되며, TCR은 치료 대 대조군 비율을 의미하고, TCR = 1은 효과 없음을 의미하며, TCR = 0은 완전 퇴행으로 정의된다).

표 28

46일째에 종양 성장 저해(TGI) 및 치료 대 대조군 비율(TCR)

군(46일째 참조 CEACAM5-TCB	TGI	TCR	p-값
CEACAM5 CD3 TCB 2.5 mg/kg + 항-PD1/LAG3 0927 1.5 mg/kg	93.06119	0.207878	0.0056
CEACAM5 CD3 TCB 2.5 mg/kg + 항-PD1/LAG3 0927 3 mg/kg	79.22326	0.006863	0.005
CEACAM5 CD3 TCB 2.5 mg/kg + Nivolumab 1.5 mg/kg	32.9787	0.668563	0.513
CEACAM5 CD3 TCB 2.5 mg/kg + Nivolumab 1.5 mg/kg	55.33328	0.437398	0.07

[1106]

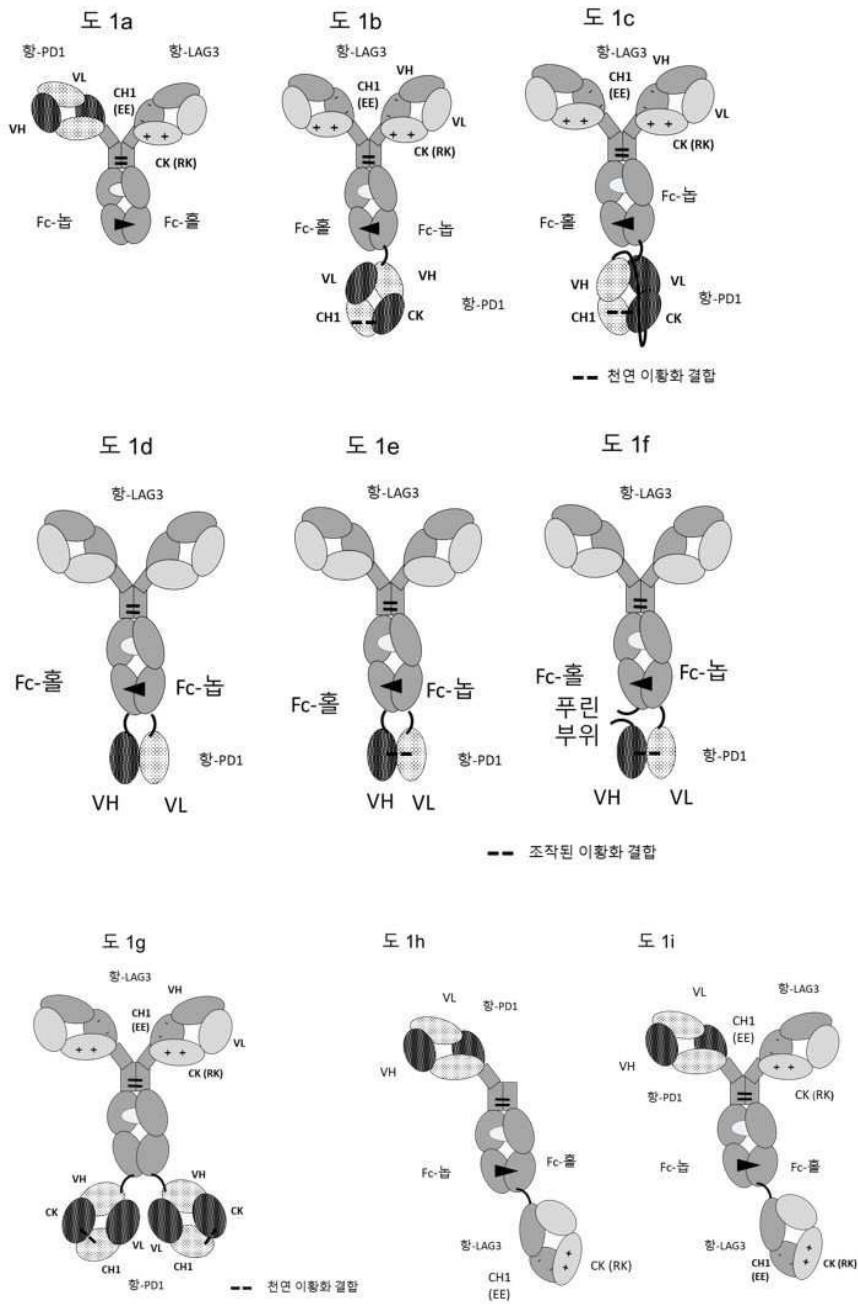
던넛의 방법을 사용하여 대조군과의 비교를 p-값으로서 추가로 나타낸다.

[1107]

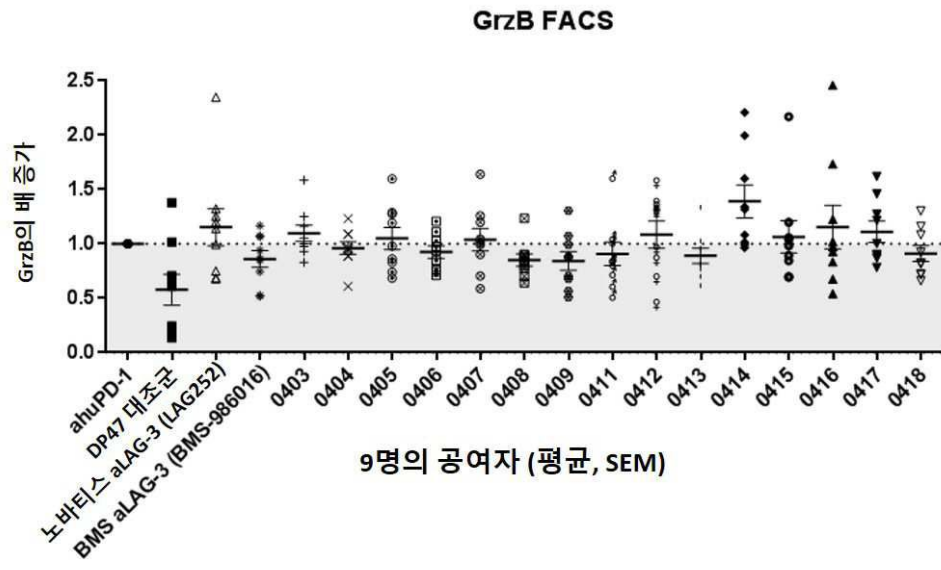
[1108] CEACAM5 CD3 TCB를 이용한 치료는 체장압과 관련하여 종양 성장을 통제할 수 없다. 그러나, 이중특이적 항체 항-PD1/LAG3 0927과 이의 조합은, 투여량 특이적 방법에서 종양 성장에 대해 강한 영향을 미치게 된다. 통계적 분석은, 항-PD1 항체 니볼루맙 및 펌브롤리주맙과의 조합이 아니라 항-PD1/LAG3 0927과의 조합이, 둘 모두의 농도에서 단독 치료와 비교할 때 종양 성장의 조절에서 통계적으로 유의한 상이점을 만들었고, PD1만의 저해보다 이 이중특이적 항-PD1/LAG3 항체의 우월함을 제시하였고, 종양 성장을 정체시켰음을 보여주었다.

도면

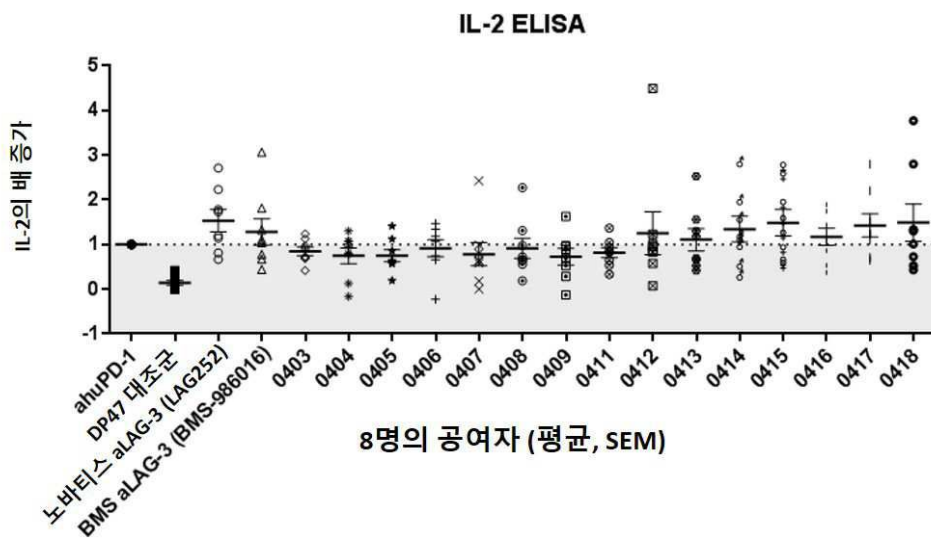
도면1



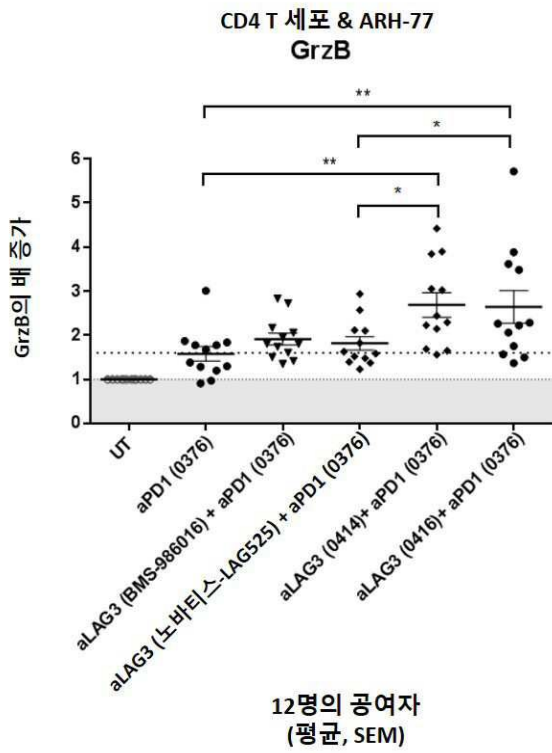
도면2a



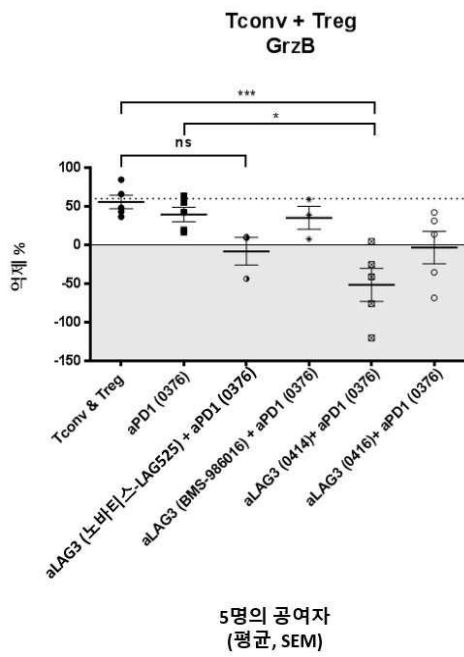
도면2b



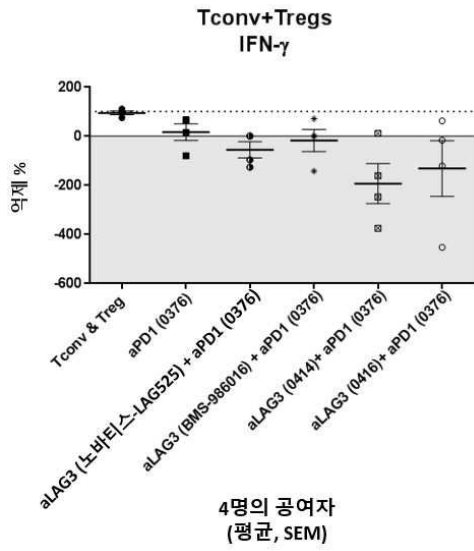
도면3



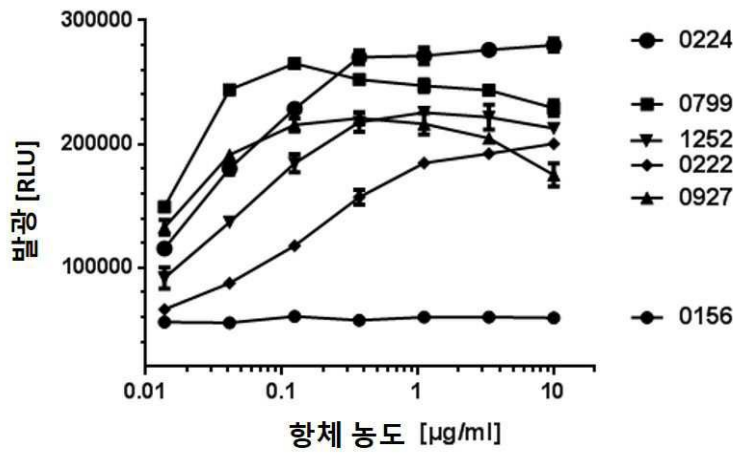
도면4a



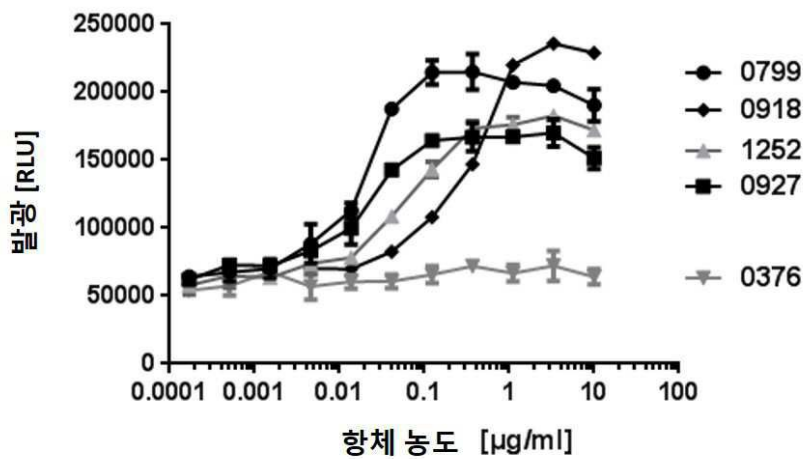
도면4b



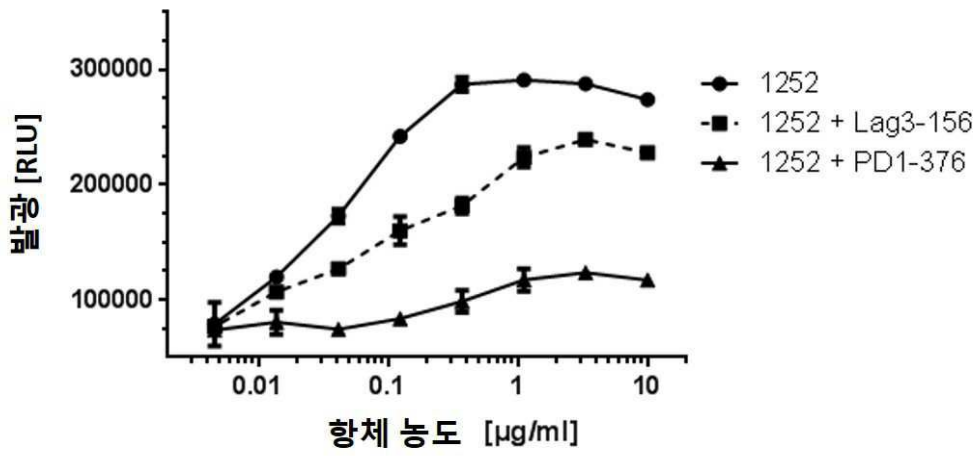
도면5a



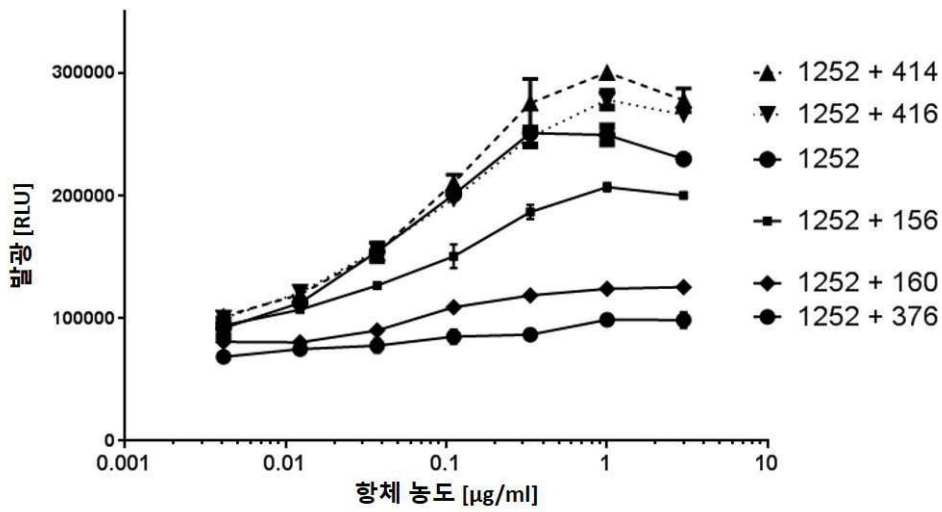
도면5b



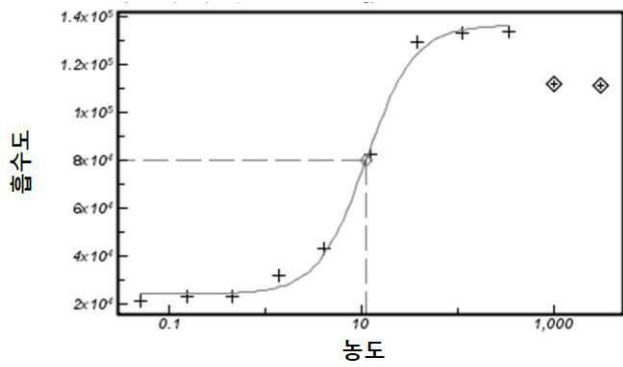
도면5c



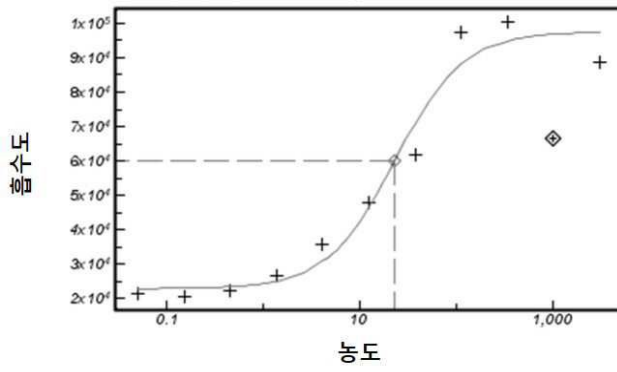
도면5d



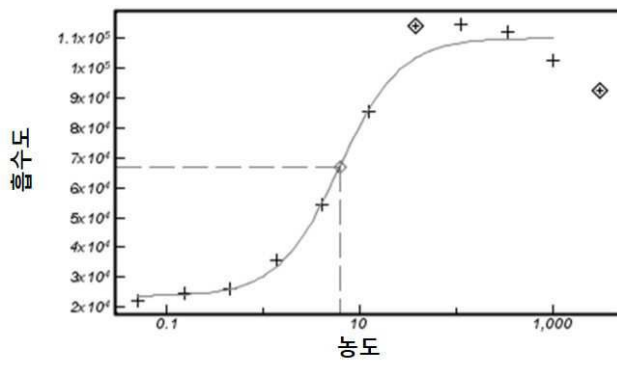
도면6a



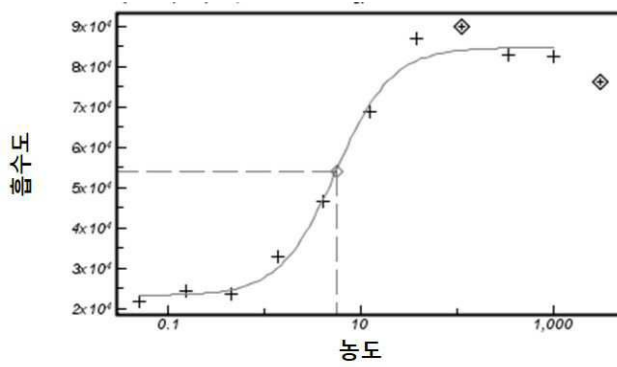
도면6b



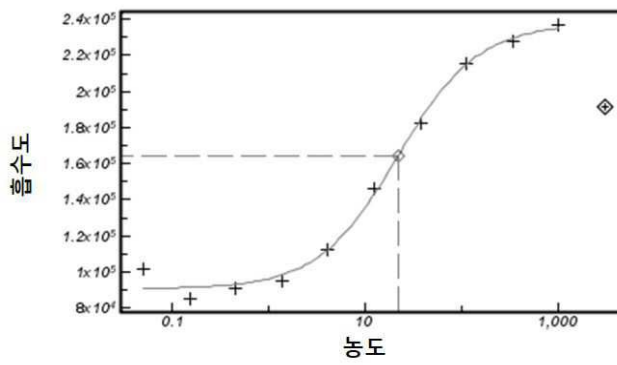
도면6c



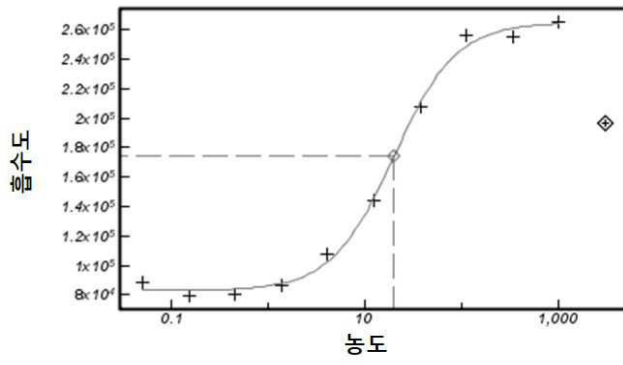
도면6d



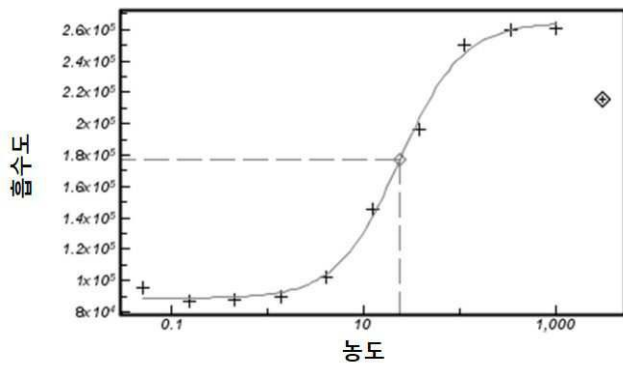
도면7a



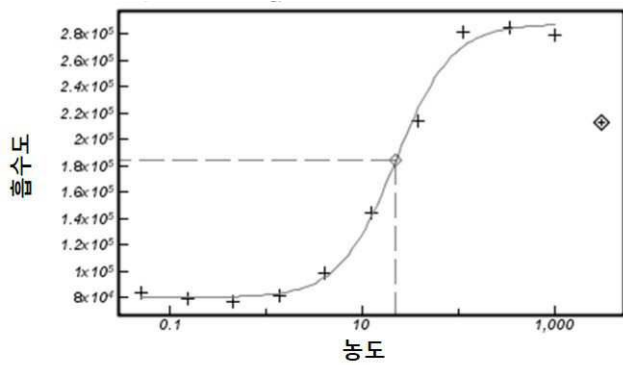
도면7b



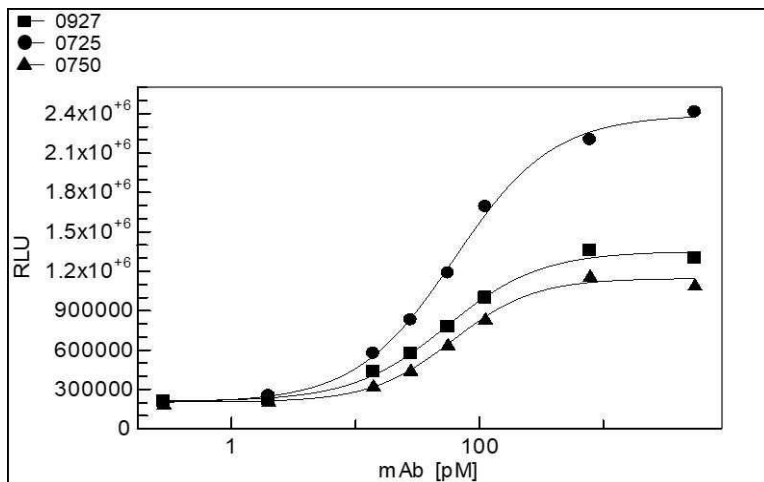
도면7c



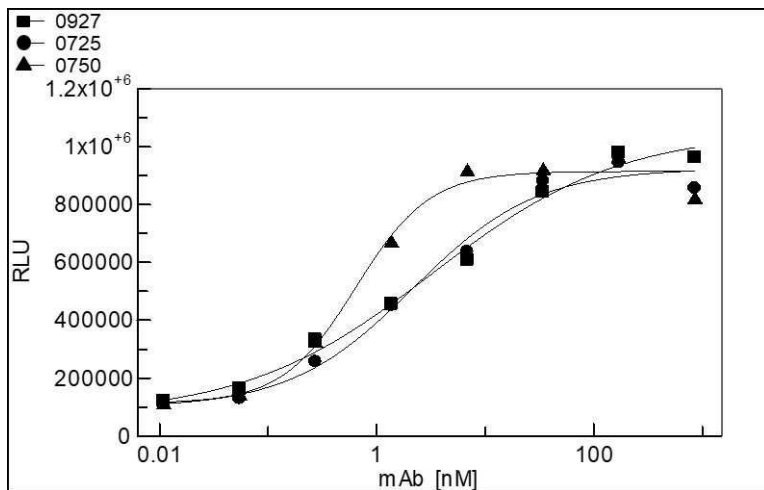
도면7d



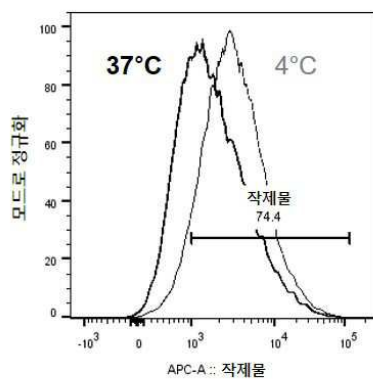
도면7e



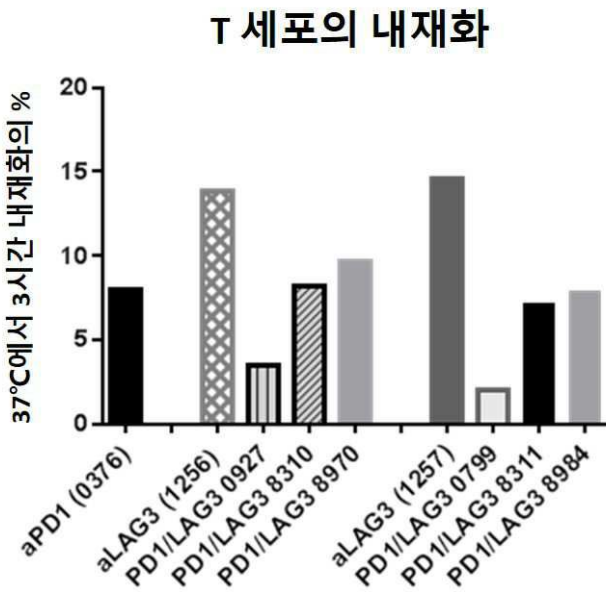
도면7f



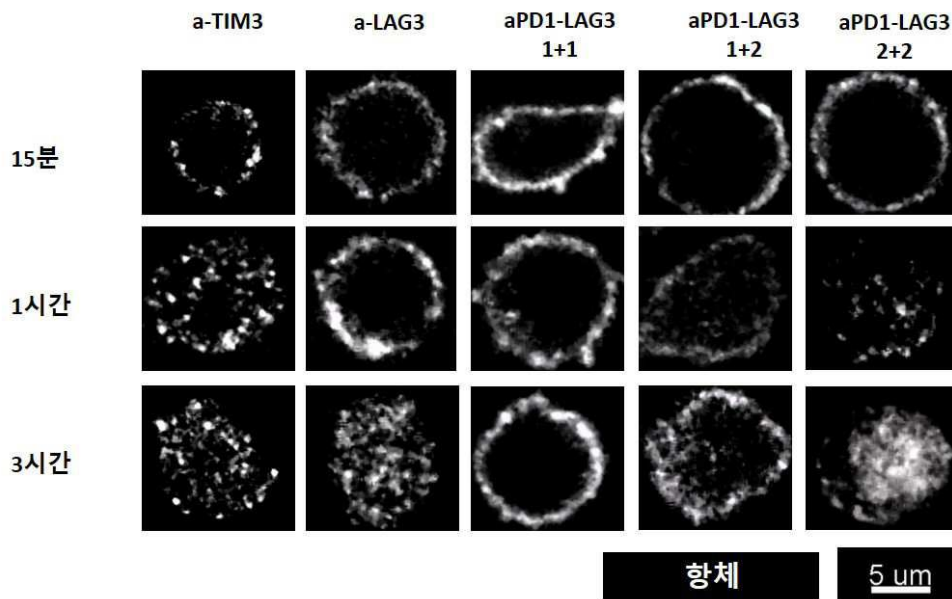
도면8a



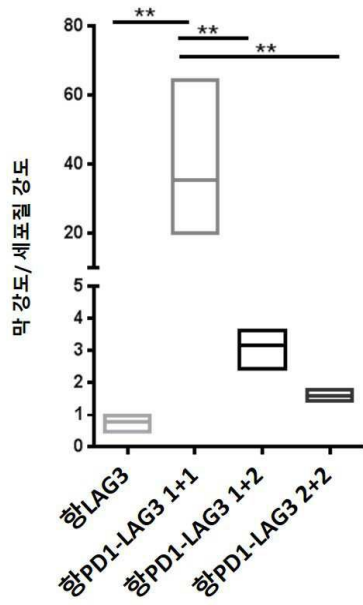
도면8b



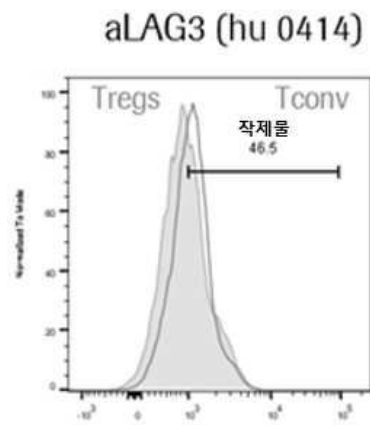
도면9a



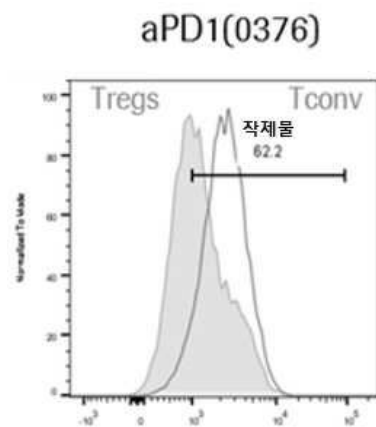
도면9b



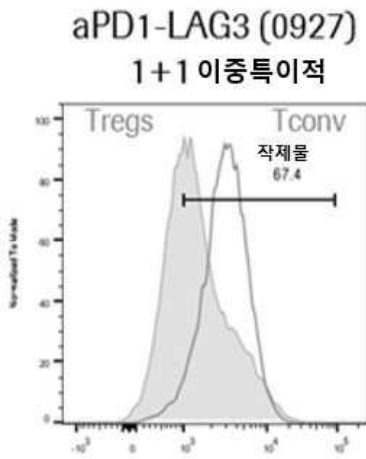
도면10a



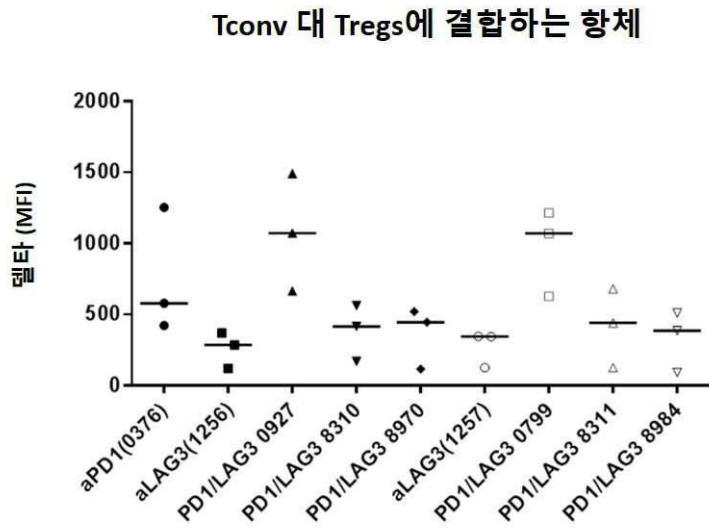
도면10b



도면10c

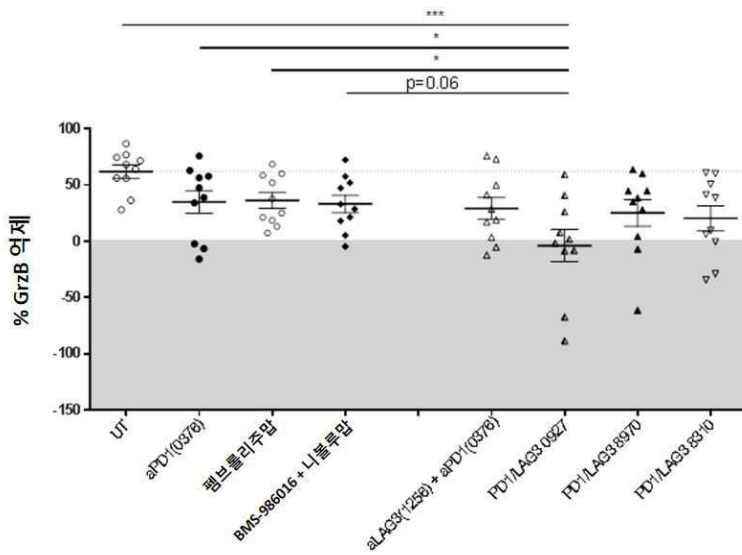


도면10d



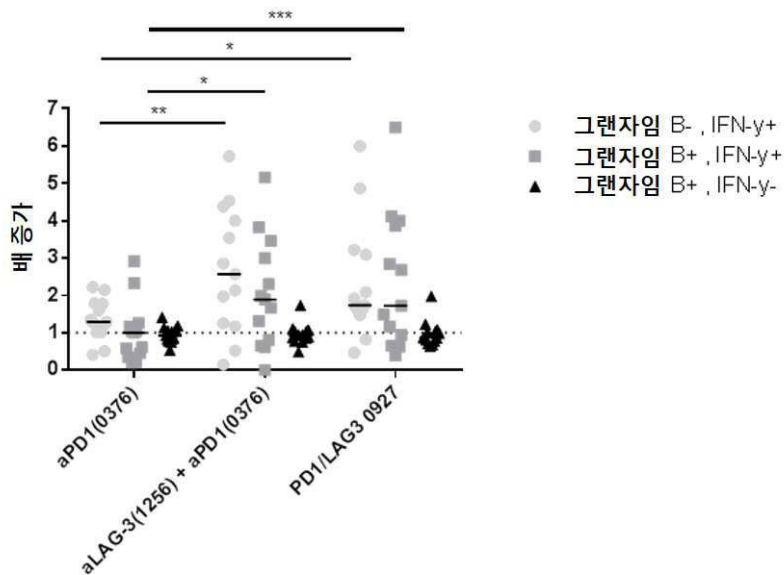
도면11

Treg 억제로부터 PD-1 및 Treg 공동 차단 구조 Tconv 효과기 기능



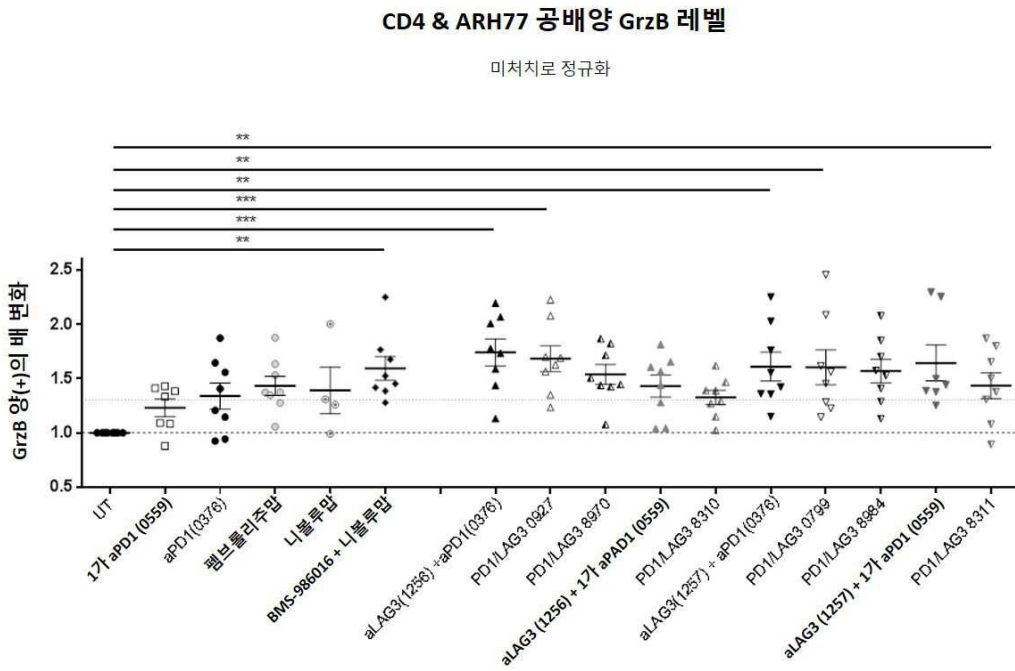
도면12

흑색종 환자에서 PD-1 및 LAG-3
공동 차단은 중앙 Ag-특이적 T 세포
효과기 기능을 향상시킨다

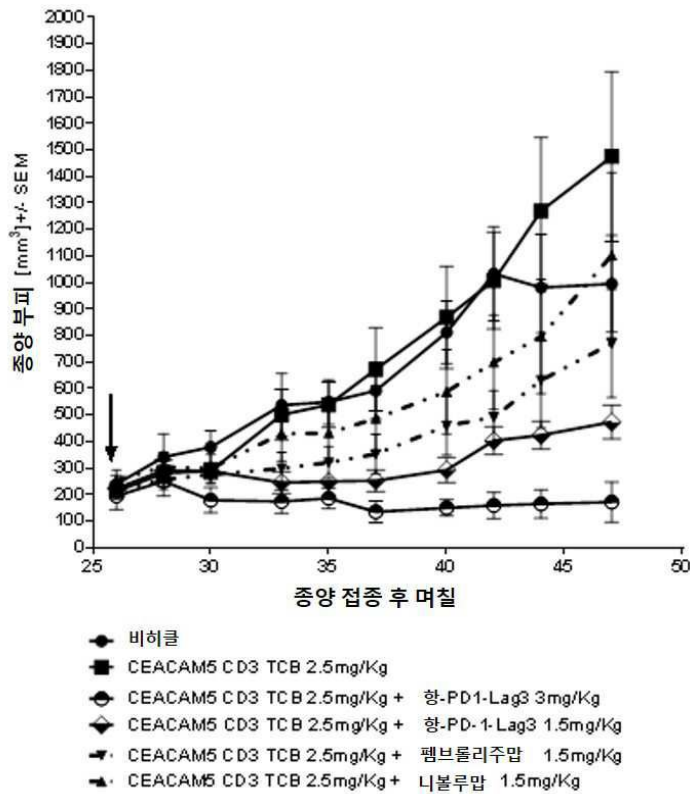


13명의 공여자
(평균, SEM)

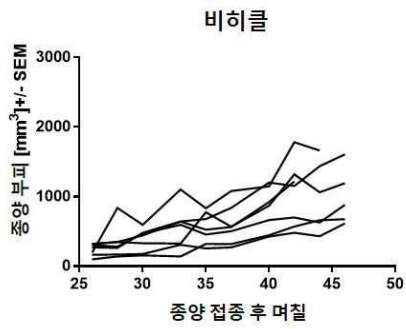
도면13



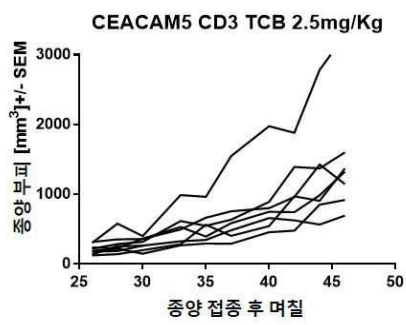
도면14



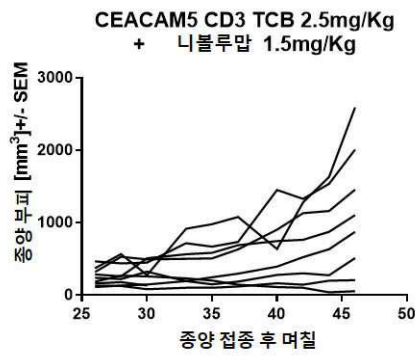
도면15a



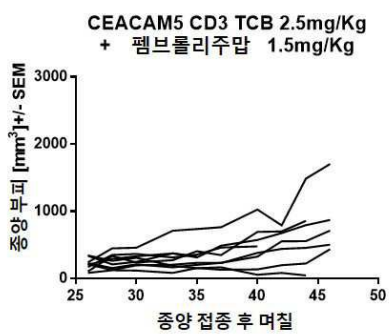
도면15b



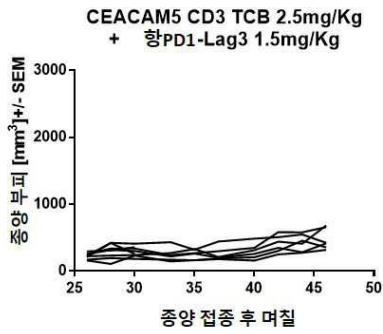
도면15c



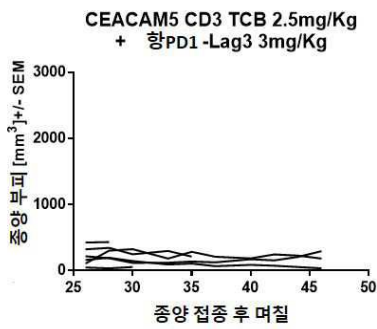
도면15d



도면15e



도면15f



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Bispecific Antibodies specifically binding to PD1 and LAG3

<130> P34215-WO

<140> PCT/EP2018/058382

<141> 2018-04-03

<150> EP17165125.0

<151> 2017-04-05

<160> 169

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, PD1-0103

<400> 1

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, PD1-0103

<400> 2

Gly Gly Arg

1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, PD1-0103

<400> 3

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, PD1-0103

<400> 4

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, PD1-0103

<400> 5

Arg Ser Ser

1

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, PD1-0103

<400> 6

Asn Tyr Asp Val Pro Trp

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, PD1-0103

<400> 7

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Ser Leu Met Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, PD1-0103

<400> 8

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

 20 25 30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro

 35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

 50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

 85 90 95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant -heavy chain variable domain VH of PD1-0103_01
(PD1 0376)

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant -light chain variable domain VL of PD1-0103_01

(PD1 0376)

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant -light chain variable domain VL of PD1-0103_02

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro

 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser

65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant -light chain variable domain VL of PD1-0103_03

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser

 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

<400> 14

Asp Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, aLAG3(0414)

<400> 15

Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, aLAG3(0414)

<400> 16

Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, aLAG3(0414)

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, aLAG3(0414)

<400> 18

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, aLAG3(0414)

<

400> 19

Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, aLAG3(0414)

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, aLAG3(0414)

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, aLAG3(0403)

<400> 22

Asp Tyr Thr Met His

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, aLAG3(0403)

<400> 23

Leu Val Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, aLAG3(0403)

<400> 24

Ala Ile Thr Asp Thr Ser Leu Tyr Gly Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, aLAG3(0403)

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, aLAG3(0403)

<400> 26

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, aLAG3(0403)

<400> 27

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 28

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, aLAG3(0403)

<400> 28

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Leu Val Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Ala Ile Thr Asp Thr Ser Leu Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, aLAG3(0403)

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, aLAG3(0411)

<400> 30

Asp Tyr Thr Met Asn
 1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, aLAG3(0411)

<400> 31

Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, aLAG3(0411)

<400> 32

Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, aLAG3(0411)

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Val Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, aLAG3(0411)

<400> 34

Ala Ser Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, aLAG3(0411)

<400> 35

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5
 <210> 36
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain variable domain VH, aLAG3(0411)
 <400> 36
 Glu Val His Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable domain VL, aLAG3(0411)
 <400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Val Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, aLAG3(0417)

<400> 38

Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, aLAG3(0417)

<400> 39

Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> heavy chain HVR-H3, aLAG3(0417)

<400> 40

Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, aLAG3(0417)

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, aLAG3(0417)

<400> 42

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, aLAG3(0417)

<400> 43

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 44

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, aLAG3(0417)

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95
 Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain variable domain VL, aLAG3(0417)
 <400> 45
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, aLAG3(0416)

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, aLAG3(0416)

<400> 50

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, aLAG3(0416)

<400> 51

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, aLAG3(0416)

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 53

<211> 107

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, aLAG3(0416)

<400> 53

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, BMS-986016

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL BMS-986016

<400> 55

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, MDX25F7 (25F7)

<400> 56

Asp Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, MDX25F7 (25F7)

<400> 57

Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, MDX25F7 (25F7)

<400> 58

Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, MDX25F7 (25F7)

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, MDX25F7 (25F7)

<400> 60

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, MDX25F7 (25F7)

<400> 61

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, MDX25F7 (25F7)

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, MDX25F7 (25F7)

<400> 63

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 64

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, humanized BAP050 (LAG525)

<400> 64

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr

20

25

30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser

65

70

75

80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asn Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asn Asn Ala Glu Ala Met

100

105

110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, humanized BAP050 (LAG525)

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

 20 25 30
 Leu Met Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Leu Pro Trp

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, MDX26H10 (26H10)

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, MDX26H10 (26H10)

<400> 67

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human kappa light chain constant region

<400> 68

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 69

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human lambda light chain constant region

<400> 69

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 70

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human heavy chain constant region derived from IgG1

<400> 70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

 195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 72

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human heavy chain constant region derived from IgG4

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45

 Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60
 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95
 Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110

 Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125
 Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
 130 135 140
 Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
 145 150 155 160
 Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175

 Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
 180 185 190
 Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
 195 200 205
 Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
 210 215 220
 Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
 225 230 235 240

 Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
 245 250 255
 Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro

<220><223> primer rbHC.up
 <400> 76
 aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc 37
 <210> 77
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer rbHCf.do
 <400> 77
 ccattggtga gggtgcccga g 21
 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer BcPCR_FHLC_leader.fw
 <400> 78
 atggacatga gggccccgc 20
 <210> 79
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer BcPCR_huCkappa.rev
 <400> 79
 gatttcaact gctcatcaga tggc 24
 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain HVR-H1, PD1-0098
 <400> 80
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5
 <210> 81
 <211> 3

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, PD1-0098

<400> 81

Tyr Ser Gly

1

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, PD1-0098

<400> 82

His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp

1 5

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, PD1-0098

<400> 83

Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 84

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, PD1-0098

<400> 84

Lys Val Ser

1

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, PD1-0098

<400> 85

Gly Ser His Phe Pro Leu

1 5

<210> 86

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, PD1-0098

<400> 86

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Ala Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, PD1-0098

<400> 87

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H1, PD1-0069

<400> 88

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 89

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H2, PD1-0069

<400> 89

Tyr Ser Gly

1

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain HVR-H3, PD1-0069

<400> 90

Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L1, PD1-0069

<400> 91

Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe

1 5 10

<210> 92

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L2, PD1-0069

<400> 92

Tyr Ala Ser

1

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain HVR-L3, PD1-0069

<400> 93

Ser Arg Glu Phe Pro Trp

1 5

<210> 94

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain variable domain VH, PD1-0069

<400> 94

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

 20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile

 35 40 45
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Glu Leu Ala Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg Leu Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala

 115

<210> 95

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain variable domain VL, PD1-0069

<400>

95

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

 Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 97
 <211> 452

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0799
 <400> 97
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95
 Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 98
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain 1 of 1+1 PD1/LAG3 0799
 <400> 98
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys
 225
 <210> 99
 <211> 214

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0799
 <400> 99
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 100

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0927

<400> 100

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 101
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0927

 <400> 101
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

305 310 315 320
 Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp

 340 345 350
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 103
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0222
 <400> 103
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 104

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain 1 of 1+1 PD1/LAG3 0222

<400> 104

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 106

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1 of 1+1 PD1/LAG3 0224

<400> 106

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Ala Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys

225

<210> 108

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0156) heavy chain (MDX25F7)

<400> 108

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val
 165 170 175

 Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr
 180 185 190
 Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr
 260 265 270

Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg
 275 280 285

Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile
 290 295 300

Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg
 325 330 335

Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu
 340 345 350

Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu
 370 375 380

Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly
 405 410 415

Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 109

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0156) light chain (MDX25F7)

<400> 109

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

 210

<210> 110

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0414) heavy chain

<400> 110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr

 20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser

 115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val

 130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160
Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser

 165 170 175
Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val

 180 185 190
Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu
 275 280 285
 Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro
 290 295 300
 Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala
 370 375 380
 Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg
 405 410 415
 Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 111
 <211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0414) light chain

<400> 111

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Thr Val Ala Ala

 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 112

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0416) heavy chain

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys

 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp

 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro

 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr

 130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro

 165 170 175

Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser

 180 185 190

Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aLAG3(0416) light chain

<400> 113

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 114

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain of 2+2 PD1/LAG3 8970

<400> 114

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr

 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 465 470 475 480
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
 485 490 495

 Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 500 505 510
 Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr
 515 520 525
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 530 535 540
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 545 550 555 560

 Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
 565 570 575
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala
 580 585 590
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 595 600 605
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 610 615 620

 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 625 630 635 640
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 645 650 655
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 660 665 670
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215

<210> 116
 <211> 696
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain of 2+2 PD1/LAG3 8984

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 660 665 670
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 675 680 685
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695
 <210> 117
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> heavy chain of 2+2 PD1/LAG3 9010
 <400> 117
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys

 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 660 665 670
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 675 680 685
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690

<210> 118

<211> 695

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1of 2+1 PD1/LAG3 8310

<400> 118

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
660 665 670

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
675 680 685

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 119
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> heavy chain 2 of 2+1 PD1/LAG3 8310
<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
 Pro Gly Lys

450

<210> 120

<211> 696

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1of 2+1 PD1/LAG3 8311

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys

85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser

 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu

 465 470 475 480
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 485 490 495
 Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 500 505 510
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
 515 520 525
 Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

 530 535 540
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu
 565 570 575
 Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 580 585 590
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

 595 600 605
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 610 615 620
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 625 630 635 640

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 645 650 655

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 660 665 670

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 675 680 685

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695

<210> 121
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain 2of 2+1 PD1/LAG3 8311
 <400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

450 455 460

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

465 470 475 480

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe

485 490 495

Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

500 505 510

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro

515 520 525

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

530 535 540

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

545 550 555 560

Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser

565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala

580 585 590

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

595 600 605

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

850 855 860
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 865 870 875 880

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 885 890 895

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 900 905 910

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 915 920 925

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 930 935 940

<210>

124

<211> 942

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1of 2+1 PD1/LAG3 8313

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 85 90 95

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300

 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

850 855 860
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 865 870 875 880

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 885 890 895
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 900 905 910
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 915 920 925
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 930 935 940

<210> 125

<211> 940

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1of 2+1 PD1/LAG3 1088

<400> 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 610 615 620

 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 625 630 635 640
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 645 650 655
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 660 665 670
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
 675 680 685

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 690 695 700
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 705 710 715 720
 Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 725 730 735
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
 740 745 750

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile
 755 760 765
 Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg
 770 775 780
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 785 790 795 800
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu
 805 810 815

 Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 820 825 830
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 835 840 845
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

850 855 860
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 865 870 875 880

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 885 890 895

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 900 905 910

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 915 920 925

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 930 935 940

<210> 126

<

211> 589

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 1of 2+1 PD1/LAG3 0918

<400> 126

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu

465 470 475 480

Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu

 485 490 495

Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys

 500 505 510

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu

 515 520 525

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

 530 535 540

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr

545 550 555 560

Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

 565 570 575

Val Glu Ile Lys

 580

<210> 128

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4S

<400> 129

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)2

<400> 130

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (SG4)2

<400> 131

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 132

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker G4(SG4)2

<400> 132

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 133

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)3

<400> 134

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker (G4S)4

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 136

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 137

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser

1 5
<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 138
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
<210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 139
Gly Gly Ser Gly Ser Gly

1 5
<210> 140
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 140
Gly Gly Ser Gly

1
<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Peptide linker
<400> 141
Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 142

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 143

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 143

Gly Gly Asn Gly Ser Gly

1 5

<210> 144

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain 2 of 1+1 PD1/LAG3 0725 (1+1 trans)

<400> 144

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 355 360 365
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 370 375 380
 Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

 385 390 395 400
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 405 410 415
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 420 425 430
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 435 440 445
 Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

 450 455 460
 <210> 145
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> heavy chain 2 of 2+1 PD1/LAG3 0750 (2+1 trans)
 <400> 145
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 580 585 590
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 610 615 620
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 625 630 635 640
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 645 650 655
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 660 665 670
 Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680 685
 <210> 146
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CEA (CEA TCB)
 <400> 146
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 147

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CD3 (CEA TCB)

<400> 147

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
 225 230 235 240
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 245 250 255
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val
 260 265 270
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser
 275 280 285

 Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 290 295 300

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 305 310 315 320
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
 325 330 335
 Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 340 345 350

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 355 360 365
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 370 375 380
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 385 390 395 400
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 405 410 415

 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 420 425 430
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 435 440 445
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 450 455 460
 Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 465 470 475 480

 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 485 490 495
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 500 505 510
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 515 520 525
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 530 535 540

 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

545 550 555 560
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 565 570 575
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 580 585 590
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 595 600 605

 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 610 615 620
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 625 630 635 640
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 645 650 655
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 660 665 670

 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 675 680 685
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690
 <210> 149
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEA VHCH1 Fc hole P329GLALA (CEA TCB)
 <400> 149
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 150
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)
 <400> 150
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 151
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-Fc (hole, P329G LALA)
 <400> 151

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro

<210> 152

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (knob, P329G LALA)

<400> 152

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 225 230 235 240
 Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr

	245		250		255
Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp					
	260		265		270
Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr					
	275		280		285
Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu					
	290		295		300
Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu					
305		310		315	320
Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly					
	325		330		335
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro					
	340		345		350
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr					
	355		360		365
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr					
	370		375		380
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro					
385		390		395	400
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr					
	405		410		415
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn					
	420		425		430
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser					
	435		440		445
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala					
	450		455		460
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu					
465		470		475	480
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser					
	485		490		495

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 500 505 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 580 585 590

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 660 665 670

Ser Pro

<210> 153

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 VL-CL(RK)

<400> 153

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
 20 25 30
 Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 154
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1

<400> 154

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 155

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2

<400> 155

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 156

<211> 12

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3

<400> 156

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1

<400> 157

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2

<400> 158

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg

1 5

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3

<400> 159

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 160

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH

<400> 160

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 161

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL

<400> 161

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR1 (CEACAM5)

<400> 162

Asp Thr Tyr Met His

1 5

<210> 163

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR2 (CEACAM5)

<400> 163

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 164

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-HCDR3 (CEACAM5)

<400> 164

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr

1 5 10

<210> 165

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR1 (CEACAM5)

<400> 165

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR2 (CEACAM5)

<400> 166

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA-LCDR3 (CEACAM5)

<400> 167

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 168

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH (CEACAM5)

<400> 168

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe

 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 169

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL (CEACAM5)

<400> 169

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110