



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0026185
(43) 공개일자 2024년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7001972
(22) 출원일자(국제) 2022년06월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/101780
(87) 국제공개번호 WO 2023/274201
국제공개일자 2023년01월05일
(30) 우선권주장
202110722124.0 2021년06월28일 중국(CN)

(71) 출원인
지양수 헨그루이 파마슈티컬스 컴퍼니 리미티드
중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드
상하이 쉹디 파마슈티컬 컴퍼니 리미티드
중국, 201210 상하이 푸둥 뉴 디스트릭트, 장지양 타
운, 하이커 로드 넘버 1288
(72) 발명자
런 위안
중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 장지양 타
운 하이커 로드 넘버 1288
수 루
중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 장지양 타
운 하이커 로드 넘버 1288
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

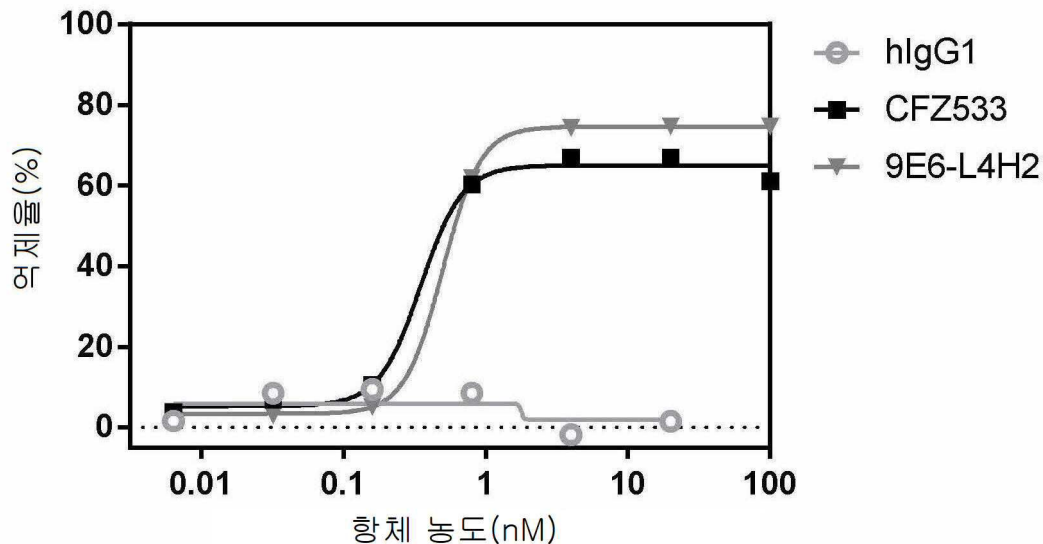
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 항-CD40 항체, 항원 결합 단편 및 이의 의학적 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD40 항체, 이의 항원 결합 단편 및 의학적 용도뿐만 아니라 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학 조성물, 및 질병을 치료 및 예방하는 방법, 특히 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 37/06 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

린 칸

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 장지양 타운
하이커 로드 넘버 1288

리아오 칭

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 장지양 타운
하이커 로드 넘버 1288

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

a-1) VH가 서열 번호 67 및 68 중 어느 하나에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 63 내지 66 중 어느 하나에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

a-2) VH가 서열 번호 1에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 2에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

a-3) VH가 서열 번호 3에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 4에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

a-4) VH가 서열 번호 5에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 6에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-1) VH가 서열 번호 81 및 82 중 어느 하나에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 77 내지 80 중 어느 하나에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-2) VH가 서열 번호 7에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 8에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-3) VH가 서열 번호 9에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 10에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-4) VH가 서열 번호 11에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 12에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-5) VH가 서열 번호 13에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 14에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-6) VH가 서열 번호 15에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 16에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

b-7) VH가 서열 번호 17에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 18에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;

c) VH가 서열 번호 19에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 20에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는

d) VH가 서열 번호 21에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL이 서열 번호 22에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;

이때, CDR이 카바트(Kabat), IMGT, 코티아(Chothia), AbM 또는 컨택트(Contact) 번호지정 체계, 바람직하게는 카바트 번호지정 체계에 따라 정의되는,

항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

1) 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 74, 75 및 76에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

2) 각각 서열 번호 88, 89 및 90에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 91, 37 및 92에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

3) 각각 서열 번호 51, 52 및 53에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 54, 55 및 56에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3; 또는

4) 각각 서열 번호 57, 58 및 59에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 60, 61 및 62에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 1)에서의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

1-1) 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 29, 30 및 73에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

1-2) 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 26, 27 및 28에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3; 또는

1-3) 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 29, 27 및 32에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하고;

바람직하게는, 2)에서의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

2-1) 각각 서열 번호 39, 47 및 49에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 87, 50 및 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

2-2) 각각 서열 번호 33, 34 및 35에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 36, 37 및 38에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

2-3) 각각 서열 번호 39, 40 및 41에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 42, 37 및 43에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

2-4) 각각 서열 번호 39, 44 및 35에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 45, 37 및 46에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3; 또는

2-5) 각각 서열 번호 39, 47 및 41에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및 각각 서열 번호 36, 37 및 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하고;

더욱 바람직하게는, 1-1)에서의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 서열 번호 29에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1; 서열 번호 30에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및 서열 번호 69 내지 72 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR3을 포함하고;

더욱 바람직하게는, 2-1)에서의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

각각 서열 번호 39, 47 및 49에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 서열 번호 83 내지 86 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1; 서열 번호 50에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및 서열 번호 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR3을 포함하는,

항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

제조합 항체, 토끼 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서,

인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 골격구조 영역이 IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02, IGHV4-4*08 및

IGHJ1*01로부터 유래되고/되거나 경쇄 골격구조 영역이 IGkV1-13*02, IGkV1-9*01, IGkV1-6*01 및 IGKJ4*01로부터 유래되고;

바람직하게는 중쇄 골격구조 영역 FR1 내지 FR3이 IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02 또는 IGHV4-4*08로부터 유래되고, 중쇄 골격구조 영역 FR4가 IGHJ1*01로부터 유래되고; 경쇄 골격구조 영역 FR1 내지 FR3이 IGkV1-13*02, IGkV1-9*01 또는 IGkV1-6*01로부터 유래되고, 경쇄 골격구조 영역 FR4가 IGKJ4*01로부터 유래되는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

A-1) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 67에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 63 내지 66 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

A-2) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 68에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 63 내지 66 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

A-3) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 1에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 2에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

A-4) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 3에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 4에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

A-5) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 5에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 6에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-1) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 81에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 77 내지 80 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-2) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 82에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 77 내지 80 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-3) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 7에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 8에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-4) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 9에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 10에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-5) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 11에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 12에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-6) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 13에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 14에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-7) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 15에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 16에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

B-8) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 17에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 18에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나;

C) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 19에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 20에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나; 또는

D) VH의 아미노산 서열이 서열 번호 21에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열이 서열 번호 22에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는,

항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

IgG 항체의 Fc 영역을 추가로 포함하고, 이때 바람직하게는 IgG 항체가 IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체이고; 보다 바람직하게는, Fc 영역이 돌연변이 N297A를 함유하는 IgG1의 Fc 영역, 또는 돌연변이 L234A, L235A, M252Y, S254T 및 T256E 중 임의의 돌연변이를 하나 이상 갖는 IgG1의 Fc 영역인, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 단편이 scFv, Fv, Fab 또는 Fab' 단편인, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

중쇄의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 93 또는 97에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, 경쇄의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 94에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖거나; 또는

중쇄의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 95 또는 98에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖고, 경쇄의 전장 아미노산 서열이 서열 번호 96에 제시되어 있거나 이에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는,

항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

i) 10nM 이하의 K_D 로 인간 CD40에 결합하는 특징; 및

ii) 유의미한 작용 활성이 없는 특징

중 하나 이상의 특징을 갖는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 12

제10항에 따른 폴리뉴클레오타이드 또는 제11항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 CD40 결합 분자.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

타크로리무스(tacrolimus)를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 16

치료 유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제14항에 따른 약학적 조성물을 자가면역 질환의 치료가 필요한 대상에게 투여함을 포함하되, 자가면역 질환이 바람직하게는 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 다발성 경화증 또는 홍반성 루푸스이고, 더욱 바람직하게는 전신 홍반성 루푸스인,

자가면역 질환을 치료하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의, 자가면역 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 용도로서, 자가면역 질환이 바람직하게는 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증 또는 홍반성 루푸스이고, 더욱 바람직하게는 전신 홍반성 루푸스인, 용도.

청구항 18

치료 유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제14항 또는 제15항에 따른 약학적 조성물을 이식편대숙주병의 치료 또는 이식편 거부반응의 완화가 필요한 대상에게 투여함을 포함하되, 이식편이 바람직하게는 고형 장기 이식편이고, 더욱 바람직하게는 간, 신장, 심장 또는 폐 이식편인,

이식편대숙주병을 치료하거나 이식편 거부반응을 완화하는 방법.

청구항 19

타크로리무스와 병용된 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의, 이식편대숙주병을 치료하거나 이식편 거부반응을 완화하기 위한 약제의 제조에서의 용도로서, 이식편이 바람직하게는 고형 장기 이식편이고, 더욱 바람직하게는 간, 신장, 심장 또는 폐 이식편인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2021년 6월 28일에 출원된 중국 특허출원 번호 제202110722124.0호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 개시내용은 생물약학 분야, 특히 CD40/CD40L 신호전달 경로와 연관된 질병을 치료하거나 방해하는 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 개시내용은 CD40 항체, 이의 항원 결합 단편 및 이의 약학적 조성물뿐만 아니라 자가면역 질환을 치료하는 방법 및 관련된 약학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 종양 괴사 인자 수용체(TNFR: tumor necrosis factor receptor) 상과에 속하는 CD40은 세포막 표면에 위치하는 I형 막형단 당단백질로, 분자량이 약 48kDa이고 면역 체계에서 중요한 역할을 한다. CD40은 혈소판뿐만 아니라 B 세포, 수지상 세포, 단핵구 및 대식세포와 같은 다양한 면역 세포에서 발현되며, 특정 조건에서는 호산구 및 실질(parenchymal) 세포에서도 발현될 수 있다. CD40에 대한 천연 리간드는 II형 막형단 단백질인 CD154 또는 CD40L이며, 이의 발현은 활성화된 CD4+ T 세포, NK 세포, 혈소판 및 B 세포를 비롯한 다양한 세포 유형에서 유도될 수 있다[푸시노(Pucino V) 등의 문헌(2020)].

[0004] CD40L은 CD40에 결합할 경우 TRAF를 모집하고 NF- κ B, JNK 및 MAPK 경로를 통해 하류 신호 전달을 중재하여, 다양한 세포 유형별 활성화 결과, 예컨대 면역 세포 활성화 및 증식, 염증 인자 및 케모카인 분비를 생성한다[폰더하이데(Vonderheide RH) 등의 문헌(2007)]. 예를 들어, 이러한 경로를 통한 신호 전달은 일차 T 세포 의존성 항체 반응(TDAR: T cell-dependent antibody response), B 세포 증식, 배종심(GC: germinal center) 형성, 면역글로불린(Ig) 이소형 전환, 체세포 돌연변이, 및 기억 B 세포와 형질 세포의 분화를 비롯한 적응 면역 체계의 몇몇 중요한 효과기 작용에 필수적이다[포이(Foy TM) 등의 문헌(1993); 포이 등의 문헌(1994)]. B 세포에 대한 효과 외에도, CD40 경로 활성화는 DC 성숙 및 기능뿐만 아니라 단핵구 및 대식세포의 생존 및 사이토카인 분비에 대한 중요한 신호를 제공한다[콕스(Caux, C) 등의 문헌(1994)].

[0005] CD40 신호 전달 경로의 조절 장애는 자가면역 질환으로 이어질 수 있다[카넬(Karnell JL) 등의 문헌(2018)]. CD40-CD40L 신호 전달 경로는 염증이 있는 조직에서 실질 세포의 기능에 관여하는 것으로 밝혀졌고; 케모카인을 분비할 수 있는 신장, 타액선 및 피부와 같은 부위의 활성화된 상피 세포는 CD40에 반응할 수 있다. 더욱이, CD40 또는 CD40L의 발현 수준은 죽상동맥경화증 환자의 병변 부위 및 죽상동맥경화증의 전임상 모델에서 상승된다. CD40은 기질 분해 효소의 발현을 자극하고 유도하여, 내피 세포, 평활근 세포 및 대식세포와 같은 죽상동맥경화증의 발병과 관련된 세포 유형에서 조직 인자의 발현을 촉진할 수 있다[미첼(Michel NA) 등의 문헌(2017)]. CD40 경로는 IL-1, IL-6 및 IL-8과 같은 염증 인자뿐만 아니라 세포간 접착 분자-1(ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1), E-셀렉틴(selectin) 및 혈관 세포 접착 분자(VCAM: vascular cell adhesion molecule)를 비롯한 접착 분자의 생성을 상향 조절한다. CD40/CD40L 상호작용은 또한 이식편 거부반응을 예방하는데도 사용되었다. 시노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 신장 동종이식 연구에서, 키메라 항-CD40 길항제 ch5D12의 사용은 CD40 길항작용이 병태를 개선하고 평균 생존 기간을 100일 이상으로 연장하기에 충분하다는 것을 입증하였다. ch5D12를 항-CD86 항체와 조합하여 동종이식 연구의 시작 시에만 제공한 후 사이클로스포린으로 연장 치료한 경우, 평균 생존 시간이 4년 이상 달성되었으며, 이는 이러한 조합이 잠재적으로 면역 관용을 유도할 수 있음을 시사한다[한스트라(Haanstra) 등의 문헌(2005)].

[0006] 수많은 전임상 연구는 T 세포 의존성 면역 반응을 촉진하는데 있어서 CD40/CD40L 상호작용의 주요 역할에 대한 증거를 제공한다. 따라서 CD40 신호 전달을 차단하는 것은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 및 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)과 같은 질병에서 병원성 자가면역 반응을 억제하는 데 적합하고 바람직한 치료 전략으로 간주된다. 현재 이러한 질병의 치료제로 승인된 항-CD40 항체는 없다. 따라서, CD40-CD40L 상호작용에 개입하고 CD40 신호전달을 차단할 수 있는 치료제에 대한 당업계의 긴급한 요구가 여전히 존재한다. 본 개시내용은 CD40에 특이적으로 결합하고, CD40 신호전달 경로와 관련된 질병, 특히 자가면역 질환에 개입하거나 치료하기에 유용한 우수한 항원-결합 특이성, 친화도 및 약동학적 및 약력학적 특성을 보유하는 치료용 인간화 항-CD40 항체를 제공한다. 또한, 이식편대숙주병을 치료하거나 이식편 거부반응을 완화하기 위해 치료용 인간화 항-CD40 항체와 타크로리무스(tacrolimus)의 병용이 제공된다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용은 항-CD40 항체 및 이의 항원 결합 단편, 이의 코딩 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 숙주 세포, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학적 조성물, 이를 사용하여 자가면역 질환(이식편대숙주병 및 이식편 거부반응 포함)을 치료하거나 이에 개입하는 방법, 및 관련된 약학적 용도를 제공한다.

[0008] 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편

[0009] 한 양태에서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은:

[0010] 서열 번호 23에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1;

[0011] 서열 번호 24에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR2;

[0012] 서열 번호 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR3;

[0013] 서열 QX₁SEDISSNLX₂(서열 번호 74)를 포함하는 경쇄 LCDR1(여기서 X₁은 A 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂는 A 및 S로 구성된 군으로부터 선택됨);

[0014] 서열 X₃ASNLAS(서열 번호 75)를 포함하는 경쇄 LCDR2(여기서 X₃은 A 및 P로 구성된 군으로부터 선택됨); 및

[0015] 서열 QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀(서열 번호 76)을 포함하는 경쇄 LCDR3(여기서 X₄는 A 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X₅는 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₆는 S 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X₇은 T 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X₈은 N 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₉는 N, S, T 및 Q로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₀은 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택됨)을 포함하는, 항-CD40 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0016] 일부 특정 실시양태에서:

[0017] 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각

서열 번호 26, 27 및 28에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;

- [0018] 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 서열 번호 29에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1; 서열 번호 30에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및 서열 QGGYWTSTSNFGX₉X₁₀(서열 번호 73)을 포함하는 경쇄 LCDR3(여기서 X₉는 N, S, T 및 Q로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₀은 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택됨); 또는
- [0019] 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 29, 27 및 32에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0020] 일부 특정 실시양태에서, 각각 서열 번호 23, 24 및 25에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 서열 번호 29에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1; 서열 번호 30에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및 서열 번호 69-72 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0021] 일부 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 전술된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 중 어느 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0022] 또 다른 양태에서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은:
- [0023] 서열 SYGVX₁₁(서열 번호 88)을 포함하는 중쇄 HCDR1(여기서 X₁₁은 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택됨);
- [0024] 서열 X₁₂IX₁₃SX₁₄GX₁₅X₁₆YYAX₁₇WAX₁₈S(서열 번호 89)를 포함하는 중쇄 HCDR2(여기서 X₁₂는 A 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₃은 G 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₄는 T, S 및 D로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₅는 T 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₆은 T 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₇은 S 및 N으로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₈은 K 및 R로 구성된 군으로부터 선택됨);
- [0025] 서열 GGITX₁₉YAX₂₀(서열 번호 90)을 포함하는 중쇄 HCDR3(여기서 X₁₉는 A 및 V로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₀은 I 및 M으로 구성된 군으로부터 선택됨);
- [0026] 서열 QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA(서열 번호 91)을 포함하는 경쇄 LCDR1(여기서 X₂₁은 Q 및 E로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₂는 S 및 D로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₃은 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₄는 N, Q, S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₅는 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택됨);
- [0027] 서열 번호 37에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및
- [0028] 서열 QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀(서열 번호 92)을 포함하는 경쇄 LCDR3(여기서 X₂₆은 F 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₇은 S, D 및 N으로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₈은 S 및 F로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₉는 S, T 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₃₀은 V 및 I로 구성된 군으로부터 선택됨)을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0029] 일부 특정 실시양태에서:
- [0030] 각각 서열 번호 33, 34 및 35에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 36, 37 및 38에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;
- [0031] 각각 서열 번호 39, 40 및 41에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 42, 37 및 43에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;
- [0032] 각각 서열 번호 39, 44 및 35에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 45, 37 및 46에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3;
- [0033] 각각 서열 번호 39, 47 및 41에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 36, 37 및 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3; 또는
- [0034] 각각 서열 번호 39, 47 및 49에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 서열

QASQSISX₂₄X₂₅LA(서열 번호 87)를 포함하는 경쇄 LCDR1(여기서 X₂₄는 N, Q, S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₅는 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택됨); 서열 번호 50에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2; 및 서열 번호 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.

- [0035] 일부 특정 실시양태에서, 각각 서열 번호 39, 47 및 49에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 서열 번호 83-86 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1; 각각 서열 번호 50 및 48에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0036] 일부 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 전술된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 중 어느 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 각각 서열 번호 51, 52 및 53에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 54, 55 및 56에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 각각 서열 번호 57, 58과 59에 제시된 서열을 포함하는 중쇄 HCDR1, 중쇄 HCDR2 및 중쇄 HCDR3; 및/또는 각각 서열 번호 60, 61 및 62에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 LCDR1, 경쇄 LCDR2 및 경쇄 LCDR3을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0039] 일부 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 전술된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 중 어느 하나, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서:
- [0041] a-1) VH는 서열 번호 1에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 2에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0042] a-2) VH는 서열 번호 3에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 4에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0043] a-3) VH는 서열 번호 5에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 6에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0044] a-4) VH는 서열 번호 67 및 68 중 어느 하나에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 63-66 중 어느 하나에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0045] b-1) VH는 서열 번호 7에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 8에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0046] b-2) VH는 서열 번호 9에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 10에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0047] b-3) VH는 서열 번호 11에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 12에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0048] b-4) VH는 서열 번호 13에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 14에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0049] b-5) VH는 서열 번호 15에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 16에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0050] b-6) VH는 서열 번호 17에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 18에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0051] b-7) VH는 서열 번호 81 및 82 중 어느 하나에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 77-80 중 어느 하나에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나;
- [0052] c) VH는 서열 번호 19에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 20에 제시된 VL

중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나; 또는

- [0053] d) VH는 서열 번호 21에 제시된 VH 중의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, VL은 서열 번호 22에 제시된 VL 중의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고; 여기서
- [0054] CDR은 카바트(Kabat), IMGT, 코티아(Chothia), AbM 또는 컨택트(Contact) 번호지정 체계에 따라 정의된다. 일부 특정 실시양태에서, CDR은 카바트 번호지정 체계에 따라 정의된다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 재조합 항체이다.
- [0056] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 토끼 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0057] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화 항체인 경우, 중쇄 골격구조 영역은 IGHV2-26^{*}01, IGHV4-30-4^{*}02, IGHV4-4^{*}08 및 IGHJ1^{*}01로부터 유래되고/되거나 경쇄 골격구조 영역은 IGKV1-13^{*}02, IGKV1-9^{*}01, IGKV1-6^{*}01 및 IGKJ4^{*}01로부터 유래된다. 예를 들어, 중쇄 골격구조 영역 FR1-FR3은 IGHV2-26^{*}01, IGHV4-30-4^{*}02 및 IGHV4-4^{*}08로부터 유래되고, 중쇄 골격구조 영역 FR4는 IGHJ1^{*}01로부터 유래되고; 경쇄 골격구조 영역 FR1-FR3은 IGKV1-13^{*}02, IGKV1-9^{*}01 및 IGKV1-6^{*}01로부터 유래되고, 경쇄 골격구조 영역 FR4는 IGKJ4^{*}01로부터 유래된다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 VH 및 VL을 포함하며, 여기서
- [0059] A-1) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 1에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 2에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0060] A-2) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 3에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 4에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0061] A-3) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 5에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 6에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0062] A-4) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 67에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 63-66 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0063] A-5) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 68에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 63-66 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0064] B-1) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 7에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 8에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0065] B-2) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 9에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 10에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0066] B-3) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 11에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 12에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0067] B-4) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 13에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 14에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0068] B-5) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 15에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 16에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0069] B-6) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 17에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 18에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0070] B-7) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 81에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 77-80 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;
- [0071] B-8) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 82에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 77-80 중 어느 하나에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나;

- [0072] C) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 19에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 20에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나; 또는
- [0073] D) VH의 아미노산 서열은 서열 번호 21에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 가지며, VL의 아미노산 서열은 서열 번호 22에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG2 또는 IgG4 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들어 돌연변이 N297A를 갖는 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들어 L234A, L235A, M252Y, S254T 및 T256E 중 하나를 갖는 IgG1 항체, 또는 이의 임의의 조합, 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0075] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체의 항원 결합 단편은 Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, 선형 항체, 단일 사슬 항체, scFv, sdAb, sdFv, 나노바디(nanobody), 펩티바디(peptibody), 도메인 항체 및 다중특이적 항체[이 중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 탠덤형(tandem) 디-scFv, 탠덤형 트리-scFv], 예를 들어 scFv, Fv, Fab 또는 Fab' 단편이다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 전술된 CD40 항체의 항원 결합 단편 중 중쇄의 전장 아미노산 서열은 서열 번호 93 또는 97에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, 경쇄의 전장은 서열 번호 94에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖거나; 또는 중쇄의 전장 아미노산 서열은 서열 번호 95 또는 98에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖고, 경쇄의 전장 아미노산 서열은 서열 번호 96에 제시되어 있거나 이에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는다.
- [0077] 상기 기재된 바와 같이, "적어도 90%의 동일성"은 예를 들어 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 및 적어도 99%의 동일성을 포함한다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 중쇄 가변 영역은 0 내지 10(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)개의 아미노산 변경을 갖고, 경쇄 가변 영역은 0 내지 10(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)개의 아미노산 변경을 갖는다. 일부 특정 실시양태에서, 아미노산 변경은 보존적 대체, 치환 또는 변형, 및/또는 기능에 영향을 주지 않는 결실 또는 추가이다.
- [0079] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에 결합하거나 결합하려고 경쟁하는 항-CD40 항체 또는 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0080] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 결합하는 것을 차단하는 항-CD40 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다.
- [0081] 일부 실시양태에서, CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 대한 결합이 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 차단되는 항-CD40 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다.
- [0082] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 항원 결합 단편은 다음 중 적어도 하나를 갖는다:
- [0083] (i) 10nM 이하의 K_D로 인간 CD40에 결합함; 및
- [0084] (ii) 유의미한 작용 활성이 없음.
- [0085] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 항원 결합 단편은 CD40 리간드와 CD40의 결합을 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 감소시킨다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 항원 결합 단편은 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹¹ M 이하의 K_D로 인간 CD40에 결합한다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 전술된 임의의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 CD40-결합 분자가 제공된다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 접합체(conjugate)가 제공된다. 예를 들어, 접합체는 항체-약물 접합체이다.
- [0089] 폴리뉴클레오타이드 및 벡터
- [0090] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를

제공한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 RNA, DNA 또는 cDNA일 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 단리된 폴리뉴클레오티드이다.

[0091] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 전술된 임의의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인코딩하는 DNA 분자를 제공한다.

[0092] 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드(cosmid), YAC 또는 바이러스 벡터의 형태일 수 있고, 이들 내에 존재할 수 있고/있거나 이들의 일부일 수 있다. 벡터는 특히 발현 벡터, 즉 시험관내 및/또는 생체내(즉, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 생체내 발현 시스템)에서 VEGF-결합 분자 또는 이의 접합체의 발현을 제공할 수 있는 벡터일 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 하나 이상의 적합한 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 종결자 등)에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 숙주에서 발현을 위한 요소 및 그 서열의 선택은 당업자의 지식 내에 있다. 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현하기에 유용하거나 필요한 조절 요소 및 기타 요소는 예를 들어 프로모터, 인핸서, 종결인자, 통합 인자, 선택 마커, 리더 서열 또는 리포터 유전자이다.

[0093] 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 본 개시내용의 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대한 정보를 기초로 공지된 수단(예를 들어, 자동 DNA 합성 및/또는 재조합 DNA 기술)에 의해 제조되거나 획득될 수 있고/있거나 적절한 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다.

[0094] 숙주 세포

[0095] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 접합체를 발현하거나 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 박테리아 세포, 진균 세포 또는 포유동물 세포이다.

[0096] 박테리아 세포에는 예를 들어 그람 음성 박테리아 균주[예를 들어 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 균주, 프로테우스(*Proteus*) 균주 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 균주] 및 그람 양성 박테리아 균주[예를 들어 바실러스(*Bacillus*) 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 균주, 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 균주 및 락토코커스(*Lactococcus*) 균주]의 세포가 포함된다.

[0097] 진균 세포에는 예를 들어 트리코테르마(*Trichoderma*), 뉴로스포라(*Neurospora*) 및 아스퍼길러스(*Aspergillus*) 종의 세포; 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)[예를 들어 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)], 쉬조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)[예를 들어 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)], 피키아(*Pichia*)[예를 들어 피키아 파스토리스(*Pichia Pastoris*) 및 피키아 메타놀리카(*Pichia methanolica*)] 및 한센울라(*Hansenula*) 종의 세포가 포함된다.

[0098] 포유류 세포에는 예를 들어 HEK293 세포, CHO 세포, BHK 세포, HeLa 세포, COS 세포 등이 포함된다.

[0099] 그러나, 양서류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 및 이중 단백질 발현을 위해 당업계에서 사용되는 임의의 다른 세포도 본 개시내용에 사용될 수 있다.

[0100] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 사용된 숙주 세포는 완전한 식물 또는 동물 개체로 발달할 수 없다.

[0101] 제조 방법

[0102] 본 개시내용은 또한:

[0103] - 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 본 개시내용의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0104] - 배양물로부터 숙주 세포에 의해 발현된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 수집하는 단계; 및

[0105] - 선택적으로, 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 정제 및/또는 변형시키는 단계를 포함하는, 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.

[0106] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물을 접합시키거나 변형시키는 것을 포함하는 접합체의 제조 방법을 제공한다.

[0107] 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기 기재된 바와 같이 세포 내에서(예를 들어, 세포질, 주변세포질 또는 봉입체에서) 생산된 후, 숙주 세포로부터 단리되고, 선택적으로 추가로 정제될 수 있거나; 또는 이는 세포외에서(예를 들어, 숙주 세포가 배양되는 배지에서) 생산된 후, 배지로부터 단리되고 선택적으로

추가로 정제될 수 있다. 예를 들어, 조정된 완충액이 함유된 A 또는 G 세파로즈(Sephrose) FF 컬럼을 사용하여 정제함으로써 비특이적으로 결합된 성분을 씻어낸 후, 결합된 항체를 pH 구배법으로 용출하고 SDS-PAGE로 검출하여 수집한다. 선택적으로, 항체 용액을 통상적인 방법으로 여과하고 농축할 수 있다. 가용성 혼합물과 중합체는 분자체 또는 이온 교환과 같은 통상적인 방법으로도 제거될 수 있다. 생성된 생성물은 즉시 냉동(예: -70℃)하거나 동결건조해야 한다.

[0108] 폴리펩티드의 재조합 생산을 위한 방법 및 시약, 예를 들어 특정한 적합한 발현 벡터, 형질전환 또는 형질감염 방법, 선택 표지, 단백질 발현 유도 방법, 배양 조건 등은 당업계에 공지되어 있다. 유사하게, 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 접합체를 제조하는 방법에 사용하기에 적합한 단백질 분리 및 정제 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0109] 조성물

[0110] 본 개시내용은 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 치료적 또는 완화적 유효량의 상기 기재된 바와 같은 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0111] 일부 특정 실시양태에서, 약학적 조성물의 단위 용량은 0.01 내지 99 중량%의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있거나, 약학적 조성물의 단위 용량은 0.1-2000mg을 포함할 수 있고, 몇몇 특정 실시양태에서는 1-1000mg의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 하나 이상의 추가 면역억제제의 조합물 또는 조성물이 제공된다. 조성물은 예를 들어 약학적 조성물이다. 선택적으로, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0113] 본 개시내용의 한 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 타크로리무스, 및 약학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제조품이 제공된다. 선택적으로, 제조품은 용기와 라벨을 포함한다. 용기의 예로는 병, 주사기, 및 시험관이 있다. 용기는 병태의 치료에 효과적인 조성물을 수용한다. 용기 위의 또는 용기와 관련된 라벨은 해당 조성물이 선택한 병태를 치료하는 데 사용된다는 것을 나타낸다. 조성물은 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 제조품은 병태 치료에 효과적인 타크로리무스를 수용하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0115] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 타크로리무스를 포함하는 제품이 제공된다.

[0116] 치료 방법 및 약학적 용도

[0117] 본 개시내용은 질병 또는 병태를 치료, 개입, 예방 또는 진단하기 위해 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하는 방법을 제공한다.

[0118] 구체적으로, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 자가면역 질환 또는 이식편대숙주병을 치료하거나 완화하거나, 이식편 거부반응을 완화하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.

[0119] 추가로, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 자가면역 질환 또는 이식편대숙주병을 치료하거나 완화하거나, 이식편 거부반응 완화하기 위한 약제의 제조에 있어서 하나 이상의 추가 면역억제제와 조합하여 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.

[0120] 본 개시내용의 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 추가 면역억제제와 별도로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0121] 본 개시내용의 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 추가 면역억제제의 투여 이전, 이후 또는 이와 동시에 투여될 수 있다.

[0122] 구체적으로, 본 개시내용은 자가면역 질환 또는 이식편대숙주병을 치료하거나 완화하거나, 또는 이식편 거부반응을 완화하기 위한 약제의 제조에서 타크로리무스와 조합된 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이식편대숙주병 및 장기 이식편 거부반응을 완화 또는 치료

하는 방법, 및 관련된 약학적 용도가 제공되며, 이 방법은 대상에게 완화 또는 치료 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 자가면역 질환 및 염증성 질환을 완화 또는 치료하는 방법, 및 관련된 약학적 용도가 제공되며, 상기 방법은 완화 또는 치료 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이의 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, CD40 관련된 질환 및 질병을 치료하는 방법, 및 관련된 약학적 용도가 제공되고; 일부 실시양태에서, CD40 관련된 질환의 세포의 성장 또는 분화를 억제하는 방법 및 관련된 약학적 용도가 제공되고; 일부 실시양태에서, 항원 인간 CD40을 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 방법 및 관련된 약학적 용도가 제공되고; 일부 실시양태에서, 대상에서 B 세포를 억제하는 항체를 생산하는 방법 및 관련된 약학적 용도가 제공되고; 일부 실시양태에서, 면역 질환 및 질병을 치료하는 방법, 및 관련된 약학적 용도가 제공된다. 상기 방법은 모두 대상 또는 세포에 치료적 또는 억제적 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0125] 일부 실시양태에서, 말초 B 세포 고갈을 유도하는 방법 및 관련된 약학적 용도가 제공되며, 이 방법은 유도 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0126] 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태를 치료하거나 완화하는 방법, 및 관련된 약학적 용도가 제공되며, 이 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 질환 또는 병태는 CD40과 관련되거나 관련되지 않을 수 있으며 다음을 포함한다: 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 자가면역 탈수초성 질환(예: 다발성 경화증 및 알레르기성 뇌척수염), 내분비 눈병증, 포도막염, 전신 홍반성 루푸스, 중증 근무력증, 그레이브병(Grave's disease), 사구체신염, 자가면역 간질환, 염증성 장질환[예: 크론병(Crohn's disease) 또는 궤양성 대장염], 아나필락시스, 알레르기 반응, 쇼그렌 증후군, 제I형 당뇨병, 원발성 담즙성 간경변증, 베게너(Wegener) 육아종증, 섬유근통, 다발근염, 피부근염, 염증성 근염, 다발내분비부전, 슈미트증후군(Schmidt's syndrome), 자가면역포도막염, 애디슨병(Addison's disease), 부신염, 갑상선염, 하시모토(Hashimoto)의 갑상선염, 자가면역 갑상선질환, 악성빈혈, 위위축증, 만성간염, 루포이드(lupoid) 간염, 죽상동맥경화증, 아급성 피부홍반성 루푸스, 부갑상선기능저하증, 드레슬러증후군(Dressler's syndrome), 자가면역 혈소판 감소증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 심상성 천포창, 천포창, 포진성 피부염, 아르카타 탈모증(alopecia arcata), 유천포창, 경피증, 진행성 전신 경화증, CREST 증후군[석회증, 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 식도 운동 장애, 경화증 및 모세혈관 확장증], 남성 및 여성 자가면역 불임, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 혼합 결합조직 질환, 네도다발동맥염(polyarteritis nodosa), 전신 괴사성 혈관염, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 굿파스처증후군(Goodpasture's syndrome), 샤가스병(Chagas' disease), 유육종증, 류마티스열, 천식, 재발성 유산, 항인지질 증후군, 농부 폐(farmer's lung), 홍반 다형, 심절개후 증후군, 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 자가면역 만성활동성 간염, 조류애호가 폐, 독성 표피괴사 용해, 알포트증후군(Alport's syndrome), 폐포염, 알레르기성 폐포염, 섬유화 폐포염, 간질 폐질환, 결절 홍반, 괴저 농피증, 수혈반응, 다카야스(Takayasu)의 동맥염, 다발 근육통 류마티스, 측두 동맥염, 주혈흡충증, 거대 세포 동맥염, 회충증, 누룩증, 삼프터 증후군(Sampter's syndrome), 습진, 림프종양 육종증, 베체트병(Behcet's disease), 캐플란 증후군(Caplan's syndrome), 가와사키병(Kawasaki's disease), 뎅기열, 뇌척수염, 심내막염, 심내막섬유증, 안내염, 지구성 용기성 홍반(erythema elevatum diutinum), 건선, 적혈구 모세포증 태아, 호산구성 근막염, 숄만 증후군(Shulman's syndrome), 펠티 증후군(Felty's syndrome), 필라리아증(filariasis), 모양체염, 만성 모양체염, 이중만성 모양체염, 푸흐(Fuch) 모양체염, IgA 신장병증, 헤노흐-숀라인(Henoch-Schonlein) 자반증, 이식편대숙주병, 이식편 거부반응, 심근병증, 이튼-람베르트 증후군(Eaton-Lambert syndrome), 재발 다연골염, 한랭글로불린혈증, 발덴스트롬(Waldenström)의 거대글로불린혈증, 에반 증후군(Evan's syndrome), 급성 호흡곤란 증후군, 폐 염증, 골다공증, 지연형 과민증 및 자가면역 성선 부전. 예를 들면 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스 등이 있다.

[0127] 일부 실시양태에서, B 림프구(예를 들어, 전신 홍반성 루푸스, 굿파스처 증후군, 류마티스 관절염 및 제I형 당뇨병), Th1-림프구(예를 들어, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선, 쇼그렌 증후군, 하시모토병, 그레이브병, 원발성 담즙성 간경변증, 베게너 육아종증, 결핵 또는 이식편대숙주병) 또는 Th2 림프구[예를 들면, 아토피성 피부염, 전신 홍반성 루푸스, 아토피성 천식, 비결막염, 알레르기성 비염, 옌 증후군(Omenn's syndrome), 전신 경화증 또는 만성 이식편대숙주병]과 관련된 질환을 치료하기 위한 방법 및 관련된 약학적 용

도가 제공되고, 이 방법은 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

- [0128] 일부 실시양태에서, 종양 또는 암을 치료하는 방법 및 관련된 약학적 용도가 제공되고, 이 방법은 유효량의 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 종양은 또는 암은 CD40 발현과 관련될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.
- [0129] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 타크로리무스를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이식편대숙주병 또는 이식편 거부반응을 치료하거나 완화하는 방법이 제공된다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 타크로리무스와 조합하여 사용하는 것을 포함하여, 이식편대숙주병 또는 이식편 거부반응을 치료하거나 완화하기 위한 약제를 제조하기 위한 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도가 제공된다. 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 조합하여 사용하는 것을 포함하여, 이식편대숙주병 또는 이식편 거부반응을 치료하거나 완화하기 위한 약제를 제조하기 위한 타크로리무스의 용도가 제공된다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 이식편대숙주병 또는 이식편 거부반응을 치료하거나 완화하기 위해 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 타크로리무스와 조합하여 사용하는 방법, 및 이식편대숙주병 또는 이식편대숙주병 또는 이식편대숙주병을 치료하거나 완화하기 위한 약제 제조를 위해 조합되는 용도가 제공된다.
- [0132] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 이식편은 신장 이식편, 간 이식편, 심장 이식편, 폐 이식편, 췌장 이식편, 소장 이식편 또는 복합 조직 이식편과 같은 고품 장기 이식편이다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 이식편은 동종 세포, 이종 세포, 동종 조직, 이종 조직, 동종 기관 및 이종 기관으로 구성된 군으로부터 선택된 하나를 이식하는 것을 지칭한다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 전술된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이식편 수여자에 의한 조직 이식편의 거부 반응을 억제 또는 역전시키거나, 이식편 수여자에 이식된 조직의 기능을 연장 또는 보존하거나, 이식편 수여자에서 손상된 이식편 조직의 기능을 회복시킨다.
- [0135] 검출
- [0136] 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 CD40 검출용 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 샘플을 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 처리하는 것을 포함하는 생체내 또는 시험관내에서 CD40을 검출하기 위한 방법, 시스템 또는 장치를 제공한다.
- [0137] 일부 실시양태에서, 시험관내 검출을 위한 방법, 시스템 또는 장치는 예를 들어:
- [0138] (1) 샘플을 항-CD4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;
- [0139] (2) 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 샘플 사이의 복합체 형성을 검출하는 단계; 및/또는
- [0140] (3) 참조 샘플(예: 대조 샘플)을 항체와 접촉시키는 단계; 및
- [0141] (4) 참조 샘플과 비교하여 복합체 형성 정도를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 대조 샘플 또는 대상과 비교하여 샘플 또는 대상에서 복합체 형성의 변화(예를 들어, 통계적으로 유의미한 변화)는 샘플에 CD40이 존재한다는 것을 나타낸다.
- [0142] 일부 다른 실시양태에서, 생체내 검출을 위한 방법, 시스템 또는 장치는:
- [0143] (1) 대상에게 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 단계; 및
- [0144] (2) 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 대상 사이의 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0145] 검출은 복합체가 형성되는 위치 또는 시간을 결정하는 것을 포함할 수 있다. CD40 항체는 검출 가능한 물질로 표시되며, 표지를 검출하여 CD40 항체에 결합하는 물질(예: CD40)을 검출한다. 적합한 검출 물질에는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 방사성 물질이 포함된다. CD40 결합 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 CD40 사이의 복합체 형성은 CD40에 결합하거나 결합하지 않는 항체를 결정하거나 시각화함으로써 검출할 수 있다. 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay), 방사면역분석(RIA: radioimmunoassay) 또는 조직 면역조직화학과 같은 기존의 검출 분석을 사용할 수 있다. 검출 목적을 위해, 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 단편은 형광단 발색단으로 표시될 수 있다.

- [0146] 일부 실시양태에서, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트가 또한 제공되며, 이는 진단용 사용 설명서도 포함할 수 있다. 키트는 또한 표지 또는 추가 진단제와 같은 적어도 하나의 추가 시약을 포함할 수 있다. 생체내 사용을 위해, 항체는 약학적 조성물로 제형화될 수 있다.
- [0147] 용어 정의
- [0148] 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 이하에서는 일부 기술 및 과학 용어를 구체적으로 정의한다. 본원에서 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 다른 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.
- [0149] 문맥상 명백히 다르게 요구되지 않는 한, 설명 및 청구범위 전반에 걸쳐 "포함하다", "갖다", "함유하다" 등의 단어는 배타적이거나 완전한 의미가 아닌 포괄적인 의미로 해석되어야 하고; 즉, "포함하지만 이에 국한되지는 않는다"는 의미이다.
- [0150] 본원에 사용된 아미노산에 대한 3문자 및 단일 문자 코드는 문헌[J. biol. chem, 243, p3558(1968)]에 기재된 바와 같다.
- [0151] "CD40" 및 "CD40 항원"은 정상 및 신생 B 세포의 표면에서 발현되는 대략 48kD 당단백질을 지칭하며, 이는 세포 증식 및 분화에 관여하는 신호에 대한 수용체 역할을 한다[레드베터(Ledbetter) 등의 문헌 "1987, J. Immunol. 138:788-785"]. CD40을 암호화하는 cDNA 분자는 버킷 림프종 세포주 Raji[스타멘코빅(Stamenkovic) 등의 문헌 "1989, EMBO J. 8:1403"]에서 제조된 라이브러리로부터 단리되었다. 서열 정보는 본 개시내용의 표 2에서 확인할 수 있다. CD40을 내인성으로 발현하는 세포는 CD40의 표면 발현을 특징으로 하는 모든 세포이며, 여기에는 정상 및 신생 B 세포, 지상감입 세포(interdigitating cell), 기저 상피 세포, 암종 세포, 대식세포, 내피 세포, 여포 수지상 세포, 편도선 세포 및 골수 유래 형질 세포가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.
- [0152] "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 단일클론 항체, 다중클론 항체; 단일특이적 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체); 및 전장 항체 및 항체 단편(또는 항원 결합 단편 또는 항원 결합 부분)을 포함한다. 항체는 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄를 사슬 간 이황화 결합으로 연결하여 형성된 테트라펩타이드 사슬 구조인 면역글로불린을 지칭할 수 있다. 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 아미노산 조성 및 배열이 다르므로 항원성이 다르다. 따라서, 면역글로불린은 면역글로불린의 5가지 부류 또는 이소형, 즉 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 나눌 수 있으며, 이의 상응하는 중쇄는 각각 μ 사슬, δ 사슬, γ 사슬, α 사슬 및 ϵ 사슬이다. 동일한 부류의 Ig는 힌지 영역의 아미노산 조성 및 중쇄의 이황화 결합 수와 위치의 차이에 따라 서로 다른 하위 부류로 나눌 수 있고; 예를 들어 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 나눌 수 있다. 경쇄는 불변영역의 차이에 따라 κ 사슬과 λ 사슬로 나누어진다. Ig의 5개 부류 각각은 κ 사슬 또는 λ 사슬을 가질 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄에서 N-말단 근처의 약 110개 아미노산의 서열은 상당히 다양하므로 가변 영역(V 영역)이라고 칭하고; C-말단 근처에 남아 있는 아미노산 서열은 상대적으로 안정하므로 불변 영역(C 영역)이라고 칭한다. 가변 영역은 상대적으로 보존적인 서열을 갖는 3개의 초가변 영역(CDR)과 4개의 골격구조 영역(FR)으로 구성된다. 3개의 초가변 영역은 항체의 특이성을 결정하므로 상보성 결정 영역(CDR)으로도 알려져 있다. 각각의 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 가변 영역(VH)은 각각 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노 말단부터 카복실 말단으로 배열된 3개의 CDR 영역과 4개의 FR 영역으로 구성된다. 경쇄의 3개 CDR 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 지칭하고; 중쇄의 3개 CDR 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 지칭한다.
- [0153] "CDR"의 결정 또는 정의를 위해, CDR의 결정론적 묘사 및 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 잔기의 확인은 항체의 구조를 분석하고/하거나 항체-리간드 복합체의 구조를 분석함으로써 달성될 수 있다. 이는 X-선 결정학과 같이 당업자에게 공지된 다양한 기술 중 임의의 기술에 의해 달성될 수 있다. CDR을 식별하기 위해 카밧(Kabat) 번호지정 체계, 코티아(Chothia) 번호지정 체계, AbM 번호지정 체계, IMGT 번호지정 체계, 컨택트(Contact) 정의 및 입체배좌적 정의를 포함하지만 이에 국한되지 않는 다양한 분석 방법을 사용할 수 있다.
- [0154] 카밧 번호지정 체계는 항체의 잔기 번호지정을 위한 표준이며 일반적으로 CDR 영역을 식별하는 데 사용된다[예를 들어 존슨(Johnson) 및 우(Wu)의 문헌 "2000, Nucleic Acids Res., 28:214-8" 참조]. 코티아 번호지정 체계는 특정 구조적 루프 영역의 위치를 고려한다는 점을 제외하면 카밧 번호지정 체계와 유사하다[예를 들어, 코티아 등의 문헌 "1986, J. Mol. Biol., 196:901-17"; 코티아 등의 문헌 "1989, Nature, 342:877-83" 참조]. AbM 번호지정 체계는 옥스포드 분자 그룹(Oxford Molecular Group)에서 제조한 항체 구조를 모델링하기 위한 컴퓨터 프로그램 통합 모음을 채택한다[예를 들어 마틴(Martin) 등의 문헌 "1989, Proc Natl Acad Sci(USA),

86:9268-9272; "AbMTM, 항체의 가변 영역 모델링을 위한 컴퓨터 프로그램 (AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies)", Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd." 참조]. AbM 번호지정 체계는 염기 서열로부터 항체의 3차 구조를 모델링하기 위해 지식 데이터베이스와 드노보(de-novo) 방법의 조합을 채택한다[사무드랄라((Samudrala) 등의 문헌 "1999, '결합된 계층적 접근 방식을 사용한 Ab Initio 단백질 구조 예측(Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach)', PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3:194-198" 참조]. 컨택트 정의는 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다[예를 들어 맥칼럼(MacCallum) 등의 문헌 "1996, J. Mol. Biol., 5:732-45" 참조]. 입체배좌적 정의에서, CDR의 위치는 항원 결합에 대한 엔탈피에 기여하는 잔기로서 식별될 수 있다[예를 들어, 마카베(Makabe) 등의 문헌 "2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166" 참조]. 또한, 다른 CDR 경계 정의는 위의 방법 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있으나, 여전히 카뎀 CDR의 적어도 일부와 중복될 수 있지만, 이는 특정 잔기 또는 특정 잔기 그룹이 항원 결합에 크게 영향을 미치지 않는다는 예측이나 실험 결과에 기초하여 단축되거나 길어질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, CDR은 방법들의 조합을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다. 다양한 번호지정 체계 간의 대응 관계는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예가 아래 표 1에 제시되어 있다.

[표 1]

CDR 번호지정 체계 간의 관계

CDR	IMGT	카뎀	AbM	코티아	컨택트
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편의 VL 및 VH 영역의 CDR 아미노산 잔기는 수 및 위치에 있어서 공지된 카뎀 번호지정 체계와 일치한다.

"단일클론 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻은 항체를 지칭하고, 즉, 집단에 포함된 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론항체는 단일 항원 부위에 대해 매우 특이적인 항체이다. 또한, 일반적으로 다양한 결정인자(에피토프)에 대한 다양한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제제와 달리, 각 단일클론 항체는 항원의 단일 결정인자에 대한 것이다. 수식어 "단일클론성"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다.

본원에서 용어 "토끼 항체"는 당업자의 지식과 기술에 따라 제조된 인간 CD40 또는 이의 에피토프에 대한 단일클론 항체를 지칭한다. 제조시, 시험 토끼에 CD40 항원을 주사한 후 원하는 서열이나 기능적 특성을 가지고 발현된 항체를 분리한다. 본 개시내용의 한 특정 실시양태에서, 토끼 항-인간 CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 토끼 κ 또는 λ 사슬의 경쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함할 수 있거나, 토끼 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체를 추가로 포함할 수 있다.

"완전 인간 항체"라는 용어는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 개시내용의 완전 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나 "완전 인간 항체"라는 용어에는 다른 포유동물 종(예: 토끼)의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 골격구조 서열에 이식된 항체(즉, "인간화 항체")가 포함되지 않는다.

CDR 이식 항체라고도 알려진 용어 "인간화 항체"는 인간 항체의 가변 영역의 골격구조에 비인간 CDR 서열을 그래프팅하여 생산된 항체를 지칭한다. 이러한 항체는 비인간 단백질 성분을 다량 함유하고 있기 때문에 키메라 항체에 의해 유도되는 강력한 면역반응을 극복할 수 있다. 면역원성 감소로 인한 활성 감소를 방지하기 위해 완전 인간 항체의 가변 영역에 최소한의 역돌연변이를 적용하여 활성을 유지할 수 있다.

"키메라 항체"라는 용어는 제1종 항체의 가변 영역을 제2종 항체의 불변 영역에 융합시켜 수득되는 항체를 지칭

하고, 이는 제1종 항체에 의해 유도되는 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 일례로서, 키메라 항체는 먼저 토끼 특이적 단일클론성 항체를 분비하는 토끼를 확립하고 항체를 단리한 다음 필요에 따라 완전 인간 항체의 불변 영역 유전자를 클로닝하고, 토끼 가변 영역 유전자와 인간 불변 영역 유전자를 키메라 유전자에 연결하고, 인간 벡터에 키메라 유전자를 삽입하고, 최종적으로 산업용 진핵 시스템 또는 산업용 원핵 시스템에서 키메라 항체 분자를 발현시킴으로써 확립된다. 완전 인간 항체의 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 중쇄 불변 영역 또는 이의 변이체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 항체 의존성 세포매개 세포독성 (ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 독성이 없는 인간 IgG1 또는 IgG4 중쇄 불변 영역, 또는 아미노산에서 돌연변이된 IgG1을 포함한다.

[0164] "항원 결합 단편"이라는 용어에는 단일 사슬 항체(즉, 전장 중쇄 및 경쇄); Fab, 변형된 Fab, Fab', 변형된 Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, 단일 도메인 항체(예: VH 또는 VL 또는 VHH), scFv, 2가 또는 3가 또는 4가 항체, 비스-scFv, 디아바디(diabody), 트리바디(tribody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody) 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편이 포함된다[예를 들어, 홀리거(Holliger) 및 허드슨(Hudson)의 문헌 ":2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136"; 아데어(Adair) 및 라우슨(Lawson)의 문헌 "2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217" 참조]. 이러한 항체 단편을 생산하고 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다[예를 들어, 베르마(Verma) 등의 문헌 "1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181" 참조]. Fab-Fv는 국제 특허출원 공개공보 제W02009/040562호에 처음 공개되었으며, 이항화물 안정화 형태 Fab-dsFv는 국제 특허출원 공개공보 제W02010/035012호에 처음 공개되었다. 본 개시내용의 항원 결합 단편은 또한 국제 특허출원 공개공보 제W02005/003169호, 제W02005/003170호 및 제W02005/003171호에 기재된 Fab 및 Fab' 단편을 포함한다. 다가 항체는 다중 특이성(예를 들어, 이중특이성)을 포함할 수 있거나 단일특이적일 수 있고(예를 들어, 국제 특허출원 공개공보 제W092/22583호 및 제W005/113605호 참조), 후자의 예는 국제 특허출원 공개공보 제W092/22583호에 기재된 트리-Fab(또는 TFM)이다.

[0165] 용어 "CD40에 결합하다"는 CD40 또는 이의 에피토프와 상호작용할 수 있음을 의미하며, 여기서 CD40 또는 이의 에피토프는 인간으로부터 유래될 수 있다. 본원에서 용어 "항원 결합 부위"는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편이 인식하는 항원 상의 불연속적인 3차원 공간 부위를 지칭한다.

[0166] 용어 "항원"은 항원을 인식하는 항체를 생성하거나 발현 라이브러리(예를 들어, 특히 파지, 효모 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝하기 위해 면역 능력이 있는 척추동물의 면역화에 사용되는 분자를 지칭한다. 본원에서, 항원은 보다 넓은 의미로 정의되며, 항체가 특이적으로 인식하는 표적 분자, 항체를 생산하기 위한 면역 과정 또는 항체를 선택하기 위한 라이브러리 스크리닝에 사용되는 분자의 일부 또는 모방체를 포함한다. 인간 CD40에 결합하는 본 개시내용의 항체의 경우, 인간 CD40의 단량체 및 중합체(예를 들어, 이량체, 삼량체 등), 인간 CD40의 절단된 변이체 및 기타 변이체는 모두 항원으로 지칭된다.

[0167] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 항체가 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 인접한 아미노산, 또는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 비연속 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매에 노출된 후에도 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매 처리 후에 손실된다. 에피토프는 일반적으로 독특한 공간 입체배좌로 예를 들어 적어도 3-15개의 아미노산을 포함한다. 주어진 항체에 의해 어떤 에피토프가 결합되어 있는지를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 면역블로팅 분석, 면역침전 분석 등을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체배좌를 결정하는 방법에는 X선 결정학 및 2차원 핵자기 공명과 같은 당업계의 기술과 본원에 기재된 기술이 포함된다.

[0168] 용어 "특이적 결합" 또는 "선택적 결합"은 항체가 미리 결정된 항원 상의 에피토프에 결합하는 것을 지칭한다. 일반적으로, 분석물로서 인간 CD40 또는 이의 에피토프를 사용하고 리간드로서 항체를 사용하는 기기에서 표면 플라즈몬 공명(SPR: surface plasmon resonance) 기술에 의해 결정될 때, 항체는 약 10^{-7} M 미만의 평형 해리 상수(K_D)로, 예정된 항원 또는 그 에피토프 이외의 비특이적 항원(또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원, 예를 들어 BSA 등)에 대한 결합에 대한 친화도보다 적어도 2배 높은 친화도로 예정된 항원 또는 이의 에피토프에 결합한다. 용어 "항원 인식 항체"는 본원에서 "특이적으로 결합된 항체"라는 용어와 상호교환적으로 사용된다.

[0169] "결합 친화도" 또는 "친화도"는 두 분자(예를 들어, 항체 또는 이의 일부와 항원) 사이의 비공유 상호작용 강도의 척도로서 본원에서 사용된다. 두 분자 사이의 결합 친화도는 해리 상수(K_D)를 결정하여 정량화할 수 있다. K_D 는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 방법[비아코어(Biacore)]을 사용하여 복합체 형성 및 해리의 동역학을

측정함으로써 결정될 수 있다. 1가 착체의 결합 및 해리에 해당하는 속도 상수는 각각 결합 속도 상수 k_a (또는 k_{on}) 및 해리 속도 상수 k_d (또는 k_{off})로 지칭된다. K_D 는 $K_D = k_d/k_a$ 방정식으로 k_a 및 k_d 와 관련된다. 해리상수의 값은 잘 알려진 방법에 의해 직접적으로 결정될 수 있으며, 복잡체 혼합물에 대해서도 카세시(Caceci) 등(1984, Byte 9:340-362)에 의해 기재된 방법과 같은 방법으로 계산될 수 있다. 예를 들어, K_D 는 웡(Wong) 및 로만(Lohman)의 문헌[1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432]에 개시된 것과 같은 이중 여과 니트로셀룰로오스 필터 결합 분석을 사용하여 결정될 수 있다. 표적 항원에 대한 항체의 결합 능력을 평가하기 위한 다른 표준 분석은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯(Western blot), RIA 및 유세포분석뿐만 아니라 본원의 다른 곳에 예시된 다른 분석을 포함한다. 항체의 결합 동역학 및 결합 친화도는 또한 예를 들어 비아코어(상표명) 시스템 또는 KinExA를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)과 같은 당업계에 공지된 표준 분석에 의해 평가될 수 있다. 다양한 분자 상호작용과 관련된 결합 친화도(예를 들어, 주어진 항원에 대한 다양한 항체의 결합 친화도)는 항체/항원 복합체의 K_D 값을 비교함으로써 비교될 수 있다. 유사하게, 상호작용의 특이성은 관심있는 상호작용(예: 항체와 항원 사이의 특정 상호작용)에 대한 K_D 값을 결정하고 관심이 없는 상호작용(예: CD40에 결합하지 않는 것으로 알려진 대조 항체)에 대한 K_D 값과 비교하여 평가할 수 있다.

[0170] "보존적 대체"라는 용어는 원래의 아미노산 잔기와 유사한 성질을 갖는 다른 아미노산 잔기로 대체되는 것을 의미한다. 예를 들어, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘은 염기성 측쇄를 갖는다는 점에서 유사한 성질을 가지며, 아스파르트산과 글루탐산은 산성 측쇄를 갖는다는 점에서 유사한 성질을 갖는다. 또한, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 및 트립토판은 전하를 띠지 않은 극성 측쇄를 갖는다는 점에서 유사한 성질을 가지며, 알라닌, 발린, 류신, 트레오닌, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌 및 메티오닌은 비극성 측쇄를 갖는다는 점에서 유사한 성질을 갖는다. 또한 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 및 히스티딘은 방향족 측쇄를 갖는다는 점에서 유사한 성질을 갖고 있다. 따라서, 상기 기재된 바와 같이 유사한 성질을 나타내는 그룹 내의 아미노산 잔기를 교체하더라도 특별한 성질의 변화를 나타내지 않을 것임은 당업자에게 자명할 것이다.

[0171] "억제" 및 "차단"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며 부분적 및 완전한 억제/차단을 모두 포함한다. CD40의 억제/차단은 바람직하게는 CD40 결합이 억제 또는 차단 없이 발생할 때 일어나는 정상적인 수준 또는 활성 유형을 감소시키거나 변경시킨다. 억제 및 차단은 또한 항-CD40 항체와 접촉하지 않은 CD40과 비교하여 항-CD40 항체와 접촉할 때 CD40 결합 친화도의 임의의 측정 가능한 감소를 포함하고자 한다.

[0172] "성장 억제"(예를 들어, 세포 관련 성장 억제)는 세포 성장의 측정 가능한 임의의 감소를 포함하고자 한다.

[0173] "작용제의 활성", "작용제 활성" 또는 "작용 능력"은 작용제로서의 기능을 지칭한다. 세포 수용체에 대한 작용제의 결합은 수용체의 천연 리간드에 의해 개시되는 것과 유사하거나 동일한 반응 또는 활성을 개시한다. 예를 들어, CD40 작용제는 다음 반응 중 임의의 반응 또는 전부를 유도할 수 있다: 세포 증식 및/또는 분화; ICAM-1, E-셀렉틴(selectin) 및 VCAM과 같은 분자를 통한 세포간 접착의 상향 조절; IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 및 TNF와 같은 전염증성 사이토카인의 분비; TRAF(예: TRAF2 및/또는 TRAF3), NIK와 같은 MAP 키나제(NF- κ B 유도 키나제), 1- κ B 키나제(IKK α/β), 전사 인자 NF- κ B와 같은 경로, Ras 및 MEK/ERK 경로, PI3K/Akt 경로 및 P38 MAPK 경로에 의한 CD40 수용체를 통한 신호 전달; XIAP, Mcl-1 및 BCLx와 같은 분자에 의한 항-세포사멸 신호의 전달; B 및/또는 T 세포 기억 생성; B 세포 항체 생산; B 세포 이소형 전환; MHC 부류 II 및 CD80/86 등의 세포 표면 발현 상향 조절. "길항제의 활성", "길항제 활성" 또는 "길항 능력"은 길항제로서의 물질의 기능을 지칭한다. 예를 들어, CD40의 길항제는 CD40 수용체와 작용제 리간드, 특히 CD40L의 결합에 의해 유도되는 임의의 반응을 예방하거나 감소시킬 수 있다. 길항제는 작용제 결합에 의해 유도된 반응 중 하나 이상을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 바람직하게는 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 보다 바람직하게는 70%, 80%, 85%, 가장 바람직하게는 90%, 95%, 99% 또는 100%만큼 감소시킬 수 있다. 항-CD40 항체 및 CD40-리간드 결합 특이성 및 길항제 활성을 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 표준 경쟁 결합 분석, B 세포에 의한 면역글로불린 분비를 모니터링하기 위한 분석, B 세포 증식 분석, 반체로(Banchereau) 유사 B 세포 증식 분석, 항체 생산을 위한 T 세포 헬퍼 분석, B 세포 증식 분석의 공동 자극 및 B 세포 활성화 마커의 상향 조절에 대한 분석을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다.

[0174] 항체 및 항원 결합 단편을 생산하고 정제하는 방법은 선행 기술에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌["Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press](5 내지 8장 및 15장)에서 찾아볼 수 있다. 예를 들면, 마우스나 토끼를 인간 CD40 또는 이의 단편으로 면역화하여 생성된 항체를 재생 및 정제하고, 아미노산 서열 분석을 통상적인 방법으로 수행할 수 있다. 마찬가지로, 항원 결합 단편은 통상적인 방법으로 제조

될 수 있다. 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 비인간 CDR 영역에 하나 이상의 인간 FR 영역을 함유하도록 유전적으로 조작된다. 인간 FR 생식계열 서열은 ImMunoGeneTics(IMG)T 웹사이트에서 이용 가능하다.

[0175] 항체는 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁적으로 스크리닝 될 수 있다. 예를 들어, 경쟁 및 교차 경쟁 연구를 수행하여 항원으로서의 결합에 대해 서로 경쟁하거나 교차 경쟁하는 항체를 획득할 수 있다. 교차 경쟁을 기반으로 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 획득하기 위한 고처리량 방법이 국제 특허출원 공개공보 제W003/48731호에 기재되어 있다. 따라서, 본 개시내용의 항체 분자와 CD40 상의 동일한 에피토프로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 및 이의 항원-결합 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술에 의해 획득될 수 있다.

[0176] "질환"이라는 용어는 본 개시내용의 인간화 항-CD40 항체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 병태이다. 여기에는 만성 및 급성 질환 또는 질병이 포함된다. 본 개시내용에 의해 치료되는 질환의 비제한적인 예에는 암, 혈액학적 악성종양, 양성 및 악성 종양, 백혈병 및 림프성 악성종양, 및 염증성, 혈관신생, 자가면역 및 면역학적 질환이 포함된다.

[0177] 용어 "CD40 관련된 질환" 또는 "CD40 관련된 질병"은 CD40을 발현하는 세포의 변형 또는 제거가 지시되는 병태를 지칭한다. 이러한 세포에는 비정상적인 증식을 나타내는 CD40 발현 세포, 또는 암성 또는 악성 성장과 관련된 CD40 발현 세포가 포함된다. CD40 항원의 비정상적 발현을 나타내는 암의 보다 구체적인 예에는 B 림프모구 양 세포, 버킷(Burkitt) 림프종, 다발성 골수종, T 세포 림프종, 카포시(kaposi) 육종, 골육종, 표피 및 내피 종양, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암, 대장암, 전립선암, 두경부암, 피부암(흑색종), 방광암, 및 신장암이 포함된다. 이러한 질환에는 백혈병, 림프종(B 세포 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 다발성 골수종, 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증; 육종, 예컨대 골육종, 유잉(Ewing) 육종, 악성 흑색종, 선암종(난소 선암종 포함), 카포시 육종/카포시 종양 및 편평 세포 암종을 비롯한 고형 종양이 포함된다. "CD40 관련된 질환"에는 자가면역 질환 및 염증성 질환과 같은 면역체계 질환 및 질병도 포함된다. 이러한 병태에는 류마티스 관절염(RA: rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루푸스(SLE: systemic lupus erythematosus), 경피증, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 건선, 염증성 장 질환(예: 궤양성 대장염 및 크론병), 폐 염증, 천식 및 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura)이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

[0178] "~의 성장을 저지한다" 또는 "성장 억제"라는 용어는 세포, 특히 CD40 항원을 발현하는 신생 세포 유형의 성장 또는 증식을 억제하는 것을 지칭한다. 따라서, 예를 들어 성장 억제는 S기의 신생 세포 비율을 크게 감소시킨다.

[0179] 동물, 인간, 실험 대상, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 체액에 적용될 경우 "제공하는", "투여하는" 및 "치료하는"은 외인성 약물, 치료제, 진단제 또는 조성물과 동물, 인간, 대상, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 체액의 접촉을 지칭한다. "제공하는", "투여하는" 및 "치료하는"은 예를 들어 치료, 약동학, 진단, 연구 및 실험 방법을 지칭할 수 있다. 세포의 치료는 시약을 세포와 접촉시키는 것 및 시약을 유체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 유체는 세포와 접촉된다. "제공하는", "투여하는" 및 "치료하는"은 또한 예를 들어 시약, 진단, 결합 조성물에 의해, 또는 시험관내 및 생체외에서 다른 세포에 의해 세포를 치료하는 것을 지칭한다. 인간, 수의학 또는 연구 대상에 적용될 때 "치료"는 치료적, 예방적 또는 방지적 조치, 연구 및 진단 적용을 지칭한다.

[0180] "치료"는 본 개시내용의 임의의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이를 포함하는 조성물과 같은 치료제를, 치료제가 치료 효과를 갖는 것으로 알려진 하나 이상의 질병 또는 증상을 앓았거나, 앓은 것으로 의심되거나, 앓기 쉬운 대상에게 내부적으로 또는 외부적으로 투여하는 것을 지칭한다. 일반적으로, 치료제는 치료 대상 또는 집단에서 질병의 증상의 퇴행을 유도하거나 임상적으로 측정 가능한 정도로 이러한 증상의 발생을 억제함으로써 이러한 질병의 하나 이상의 증상을 완화하기에 효과적인 양으로 투여된다. 질병의 임의의 특정 증상을 완화하는 데 효과적인 치료제의 양("치료 유효량"이라고도 함)은 질병 상태, 대상의 연령 및 체중, 대상에게 원하는 치료 효과를 생성하는 약물의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 질병의 증상이 완화되었는지 여부는 증상의 중증도나 진행을 평가하기 위해 의사나 기타 의료 전문가가 흔히 사용하는 임의의 임상 시험 방법을 통해 평가될 수 있다. 본 개시내용의 실시양태(예를 들어, 치료 방법 또는 제조품)는 특정 대상에서 관심 질병의 증상을 완화하는 데 효과적이지 않을 수 있지만, 스튜던트(Student)의 t-테스트, 카이-제곱(Chi-square) 테스트, 만(Mann) 및 휘트니(Whitney)의 U-테스트, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 테스트(H-테스트), 존커어-터프스트라(Jonckheere-Terpstra) 테스트 및 윌콕슨(Wilcoxon) 테스트와 같은 당업계에 알려진 임의의 통계적 테스트 방법에 의해 결정될 경우, 통계적으로 유의미한 수의 대상에서 관심 질병의 증상을 완화할 것이다.

- [0181] "유효량"은 의학적 병태의 증상 또는 징후를 개선하거나 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 유효량은 또한 진단을 허용하거나 용이하게 하기에 충분한 양을 지칭한다. 특정 대상 또는 수의학적 대상에 대한 유효량은 치료할 병태, 대상의 일반적인 건강 상태, 투여 방법 및 경로와 투여량, 부작용의 심각도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 심각한 부작용이나 독성 효과를 피하기 위한 최대 용량 또는 투여 계획될 수 있다.
- [0182] "상동성" 또는 "동일성"은 2개의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 또는 2개의 폴리펩티드 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 비교된 두 서열의 위치가 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체 하위 단위로 채워지는 경우, 예를 들어 두 DNA 분자 각각의 위치가 동일한 뉴클레오티드로 채워지면 분자는 해당 위치에서 상동성이다. 두 서열 사이의 상동성 백분율은 두 서열이 공유하는 일치 또는 상동 위치 수를 비교된 위치 수로 나누고 100%를 곱한 함수이다. 예를 들어, 두 서열이 최적으로 정렬되었을 때 위치 10개 중 6개가 일치하거나 상동성인 경우 두 서열은 60% 상동성이다. 일반적으로 두 서열이 정렬되면 최대 상동성 백분율을 얻기 위해 비교가 수행된다.
- [0183] "세포", "세포주" 및 "세포 배양액"은 상호교환적으로 사용되며 이러한 모든 명칭에는 자손이 포함된다. 또한 의도적 또는 비의도적 돌연변이로 인해 모든 자손의 DNA 함량이 정확히 동일하지 않을 수도 있다는 점을 이해해야 한다. 원래의 형질전환된 세포에서 선별된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 포함된다.
- [0184] "선택적" 또는 "선택적으로"는 이후 설명되는 사건 또는 상황이 발생할 수 있지만 필수적이지는 않고, 이러한 설명에는 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않는 경우가 포함됨을 의미한다. 예를 들어, "선택적으로 1-3개의 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다"는 것은 특정 서열의 항체 중쇄 가변 영역이 존재할 수는 있지만 반드시 존재할 필요는 없음을 의미한다.
- [0185] 본 개시내용의 "CD40-결합 단백질"은 최대화된 의미로 해석되며, 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, CD40과 결합할 수 있는 임의의 단백질이 용어의 범주에 속한다. 예를 들어, CD40-결합 단백질은 예를 들어 접합체 형태로 하나 이상의 효과기 분자를 포함할 수 있다. "효과기 분자"는 단독으로 치료 활성(예를 들어, 항종양 활성 또는 면역 활성화 또는 억제 활성을 가짐)이거나 검출 기능을 가질 수 있으며, 생물학적 활성 단백질(예: 효소), 기타 항체 또는 항체 단편, 합성 또는 자연 발생 중합체, 폴리뉴클레오티드 및 이의 단편(DNA 및 RNA 및 이의 단편), 방사성 핵종(특히 방사성요오드), 방사성 동위원소, 킬레이트 금속, 나노입자 및 리포터 그룹(예: 형광 화합물), 또는 NMR 또는 ESR 분광법으로 검출될 수 있는 화합물과 같은 임의의 형태일 수 있다. 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 대한 효과기 분자의 접합은 통상적인 방법에 의해 달성될 수 있다.
- [0186] "항체-약물 접합체"는 약물(예: 항종양제 또는 독소)을 항체에 연결함으로써 형성된 접합체를 지칭하며, 이는 절단성 또는 비절단성 연결기와 같은 통상적인 방법에 의해 달성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0187] 도 1a 및 1b: 리포터 유전자 시스템에서의 CD40 길항 항체의 활성. 도 1a 및 1b는 각각 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 대한 관련된 결과를 보여준다. 도 1a 및 1b는 모두 인간 IgG1 이소형을 음성 대조군으로 사용하고 CFZ533을 양성 대조군으로 사용한다.
- 도 2a 및 2b: B 세포 활성화 분석 시스템에서 CD40 길항 항체의 억제 활성. 도 2a는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 CD19+CD69+ 세포의 억제율(%)을 보여준다. 도 2g는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 CD19+CD69+ 세포의 MFI 억제를 보여준다. 도 2a 및 2b는 모두 인간 IgG1 이소형을 음성 대조군으로 사용하고 CFZ533을 양성 대조군으로 사용한다.
- 도 3a 내지 3d: DC 세포 활성화 분석 시스템에서 CD40 길항 항체의 억제 활성. 도 3a는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 CD11C+CD80+ 세포의 MFI 억제를 보여준다. 도 3b는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 CD11C+CD86+ 세포의 MFI 억제를 보여준다. 도 3c는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 IL-12/23 p40의 억제를 보여준다. 도 3d는 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2에 의한 TNF α 의 억제를 보여준다. 도 3a 내지 3d는 모두 인간 IgG1 이소형을 음성 대조군으로 사용하고 CFZ533을 양성 대조군으로 사용한다.
- 도 4: B 세포 활성화 분석 시스템에서 CD40 길항 항체 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2의 내인성 작용 활성(대조군으로서 인간 IgG1 이소형, CFZ533 및 작용 항-CD40 항체 9E5-SELFNS 포함).
- 도 5a 및 5b: 마우스 T 세포 의존성 체액성 면역 반응 모델에서 CD40 길항 항체의 활성. 도 5a는 흐름도이다.

도 5b는 7일, 14일, 21일 및 28일차 시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6a 및 6b: 마우스 피부 이식편 거부반응 모델에서 CD40 길항 항체의 활성. 도 6a는 흐름도이다. 도 6b는 피부 이식편 생존율(%) 및 피부 이식편 점수를 보여준다.

도 7: 마우스 피부 이식편 거부반응 모델에서 타크로리무스(FK506)와 CD40 길항 항체의 병용 활성. 도 7의 A는 9E6-L4H2(10mpk) 및 타크로리무스(FK506)와의 병용에 대한 피부 이식편 생존율(%)을 보여준다. 도 7의 B는 2F12-L4H2(10mpk) 및 타크로리무스(FK506)와의 병용에 대한 피부 이식편 생존율(%)을 보여준다. 도 7의 C는 9E6-L4H2(10mpk) 및 타크로리무스(FK506)와의 병용에 대한 피부 이식편 점수를 보여준다. 도 7의 D는 2F12-L4H2(10mpk) 및 타크로리무스(FK506)와의 병용에 대한 피부 이식편 점수를 보여준다.

도 8: 인간 CD40 형질전환 마우스에서의 CD40 길항 항체 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2의 PK 결과(대조군으로서 CFZ533을 사용함).

도 9a 및 9b: B 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc-돌연변이 CD40 길항 항체의 억제 활성. 도 9a는 9E6-L4H2 및 9E6-L4H2-AAYTE에 의한 CD19+CD69+ 세포의 MFI 억제를 보여준다. 도 9b는 2F12-L4H2 및 2F12-L4H2-AAYTE에 의한 CD19+CD69+ 세포의 MFI 억제를 보여준다.

도 10a 내지 10d: DC 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc-돌연변이 CD40 길항제의 억제 활성. 도 10a는 9E6-L4H2 및 9E6-L4H2-AAYTE에 의한 IL-12/23 p40의 억제를 보여준다. 도 10b는 9E6-L4H2 및 9E6-L4H2-AAYTE에 의한 TNF α 의 억제를 보여준다. 도 10c는 2F12-L4H2 및 2F12-L4H2-AAYTE에 의한 IL-12/23 p40의 억제를 보여준다. 도 10d는 2F12-L4H2 및 2F12-L4H2-AAYTE에 의한 TNF α 의 억제를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0188] 본 개시내용은 실시예를 참조하여 아래에서 추가로 설명되지만, 이들 실시예는 본 개시내용의 범주를 제한하려는 의도는 아니다.

[0189] 실시예 또는 시험예에 지시된 특정 조건이 없는 실험 과정은 일반적으로 통상적인 조건에 따라 수행되거나, 출발물질 또는 시판품의 제조사가 권장하는 조건에 따라 수행된다. 샘브룩(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press]; 및 어수벨(Ausubel) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY]을 참조한다. 특정 출처가 명시되지 않은 시약은 시중에서 판매되는 기존 시약이다.

[0190] 실시예 1. CD40 면역화 항원, 항원 스크리닝 및 제조를 위한 서열

[0191] his 태그가 붙은 인간 CD40(h-CD40-his) 재조합 단백질(카탈로그 번호 CD0-H5228), 마우스 Fc 태그가 붙은 인간 CD40(h-CD40-mFc) 재조합 단백질(카탈로그 번호 CD0-H525a), his 및 비오틴 태그가 붙은 인간 CD40(hCD40-his-avi) 재조합 단백질(카탈로그 번호 CD0-H82E8) 및 his 태그가 붙은 시노몰구스 원숭이 CD40(cyno-CD40-his) 재조합 단백질(카탈로그 번호 CD0-C52H6)은 모두 아크로바이오시스템스 인크.(Acrobiosystems Inc.)에서 구입된 정제된 시판용 단백질 시약이고, 각각의 서열의 출처는 표 2에 제시되어 있다. 단백질 시약은 하기 실시예의 실험에 사용될 수 있다.

[0192] [표 2]

[0193] 재조합 단백질의 아미노산 서열 출처

명칭	아미노산 서열의 시작 및 종결	유전자은행 수탁 번호
h-CD40-his	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-mFc	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-his-avi	Glu21-Arg193	P25942-1
cyno-CD40-his	Glu21-Arg193	G7PG38

[0194]

[0195] 실시예 2. 항-CD40 토끼 단일클론 항체의 스크리닝 및 인간-토끼 키메라 항체의 제조

[0196] 항-인간 CD40 단일클론 항체는 2마리의 뉴질랜드 흰 토끼를 면역화하여 생산되었다. 면역화 항원은 His 태그가 붙은 인간 CD40 재조합 단백질(h-CD40-his, 인산염 완충액과 함께 1 μ g/ μ l로 제조됨)이었다.

[0197] 프로인트(Freund) 보조제를 이용한 유화: 1차 면역화에는 완전 프로인트 보조제(CFA: complete Freund's adjuvant)를 사용하고, 추가 면역화에서는 불완전 프로인트 보조제(IFA: incomplete Freund's adjuvant)를 사용하였다. 각 면역화의 경우, 400 μ g 항원의 다중 부위 피하 주사를 사용하였다. 면역화를 위한 주사는 0일, 7일, 20일 및 41일차에 수행되었다. 혈액을 27일 및 48일차에 수집하여 시험하였으며, 토끼 혈청의 항체 역가는 ELISA 및 FACS에 의해 결정되었다. 혈청 내 항체 역가가 높고 안정화 경향이 있는 토끼를 선별하고, 추가 면역화를 위해 63일차에 인산염 완충액으로 제조한 항원 용액 400 μ g을 정맥주사하였다. 67일차에 이들 토끼의 비장을 수집하고 비오틴 태그가 붙은 CD40 항원을 첨가하였다. 표지된 단일클론 B 세포를 유세포분석기를 사용하여 96웰 플레이트에서 분류하였다. 14일의 배양 후, 상청액을 수집하고 ELISA 및 FACS를 통해 인간 CD40, 시노물구스 원숭이 CD40 및 Raji 세포(인간 CD40을 발현하는 종양 세포주) 및 총 28종의 B 세포 계통에 결합할 수 있는 클론을 스크리닝하여 단일클론을 수득하였다. 이들 단일클론 세포의 RNA를 추출하여 역전사하였고, PCR 증폭 후 산물을 서열분석 업체에 보내서 서열분석을 진행하였다. 최종적으로, 28종의 토끼 항체의 서열을 수득하였다. 이들 항체를 친화도 및 활성 분석(실시예 2-3 참조)으로 스크리닝하여 11개의 단일클론 항체를 수득하였다. 이들의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 표 3에 제시되어 있고, 이들의 CDR 서열은 표 4에 제시되어 있다.

[0198] [표 3]

[0199]

항-CD40 토끼 단일클론 항체의 가변 영역 서열

번호	중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열	
5A9	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTASRFSLSYDMSWVRQAPNGLEWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTLTLMKMTSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGTLTVSS (서열 번호 1)
	VL	ADIVLTQTASPVSAGVGGTVTINCQSSSEDISSNLWYQQKPGOPPGLLIYAASN LASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATAATYQCQGGYWSGISNFGNGFGGG TEVVVK (서열 번호 2)
9E6	VH	QSVRESEGGLVKPTDTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPNGLEWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGTLTVSS (서열 번호 3)
	VL	ADIVLTQTTPSPVSGAVGGTVTIKCQASEDISSNLAWYQQKPGOPPGLLIFPASNL ASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATAATYQCQGGYWTSTSNFGNGFGGGT EVVVK (서열 번호 4)
9F10	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPNGLEWIGAIGGA GGTYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGWTRLDLWG QGTLTVSS (서열 번호 5)
	VL	ADIVLTQTSPSPVSGPVGGTVTINCQASEDISSNLAWYQQKPGOPPGLLIYAASN LASGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATAATYQCQAYWSSTSYFGNGFGGG TQVVVK (서열 번호 6)
4F6	VH	QSVKESEGGLFKPADTLTCTVSRFSLSYGVTVVRQAPNGLEWIGAIGST GSAYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITAYAIWGP GTLTVSS (서열 번호 7)
	VL	AFELTQTTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQISNGLAWYQQKPGOPPGLLIAGASNL ASGVSSRFKSGSGIEFILTISDLECAATAATYQCQSYYSSTTFVGGGTEVVVK (서열 번호 8)
5B8	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTVSGFSLNSYGVSWVRQAPNGLEWIGAIGSS GSAYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITVYAIWGP GTLTVSS (서열 번호 9)
	VL	AFELTQTTPSPVSAAVGGTVTINCQASEDITNGIAWYQQKPGOPPGLLIAGASNL ASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECDATAATYQCQSYSSSTVFVGGGTEVVVK (서열 번호 10)
8G10	VH	QSVKESEGGLFKPTATLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGSGLEWIGGIASGT TTYANWAKSRSTITRDTNLKTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGITAYAIWGP GTLTVSS (서열 번호 11)
	VL	AFELTQTTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQISNGLAWYQQKPGOPPGLLIAGASNL ASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECAATAATYQCQSYDSSSTVFVGGGTEVVV K (서열 번호 12)
8C12	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPNGLEWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTVADTATYFCARGGITVYAIWGP GTLTVSS (서열 번호 13)
	VL	AFELTQTTPSPVSAAVGGTVTIKCQASQISNGLAWYQQKPGOPPGLVIVGASNL ASGVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYQCQSYFSSSTVFVGGGTEVVVK (서열 번호 14)
4D4	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPNGLEWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARGGITVYAIWGP GTLTVSS (서열 번호 15)
	VL	AFELTQTTPSPVSAAVGGTVTIKCQASQISNGLAWYQQKPGOPPGLVIVGASNL ASGVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYQCQSYFSSSTVFVGGGTEVVVK (서열 번호 16)
2F12	VH	QSVKESEGGLFKPKDTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPNGLEWIGGIGSD GSAYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARGGITVYAMWG PGTLTVSS (서열 번호 17)
	VL	AFELTQTTPASVEAAMGGTVTIKCQASQISNGLAWYQQKPGOPPGLLIVGASN LASGVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYQCQSYFSSSTVFVGGGTEVVV K (서열 번호 18)

[0200]

3F6	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTCTVSGFSLSSYAISWVRQAPNGLEWIGAIDRYG TTYATWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARGPWYYGGDVA WTGSFDPWGPGLTVSS (서열 번호 19)
	VL	AQVLTQTASPVSAAVGGTVTISCQSSQSVANNDFLSWYQQKPGOPPGLLIYGA STLASGVPSRFGRNGSGTQFTLTITGMQCDDAATYFCTGGYAGPIYIFGGGTEV VVK (서열 번호 20)
10A4	VH	QSLSESGGLRVLTPGGLTLTCTVSGIDLNRNLSWVRQSPNGLEWIGGIGSSGS AYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARDGYAGSSWGIYY GMDPWGPGLTVSS (서열 번호 21)
	VL	AIEMTQSPPLSASVGETVRIKCLASEDIYRGISWYQQKPGKPPTLLIYGASTLQ SGVPPRFSGSGSDYTLTIGGVQAEDAATYCLGGHSYSSAGLTFGAGTKVEI K (서열 번호 22)
참고: 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 CDR 영역은 밑줄이 그어져 있으며 카바트 번호지정 체계를 사용하여 결정된다.		

[0201]

[0202]

[표 4]

[0203] 항-CD40 토끼 단일클론 항체의 CDR 영역(카바트 번호지정 체계 사용)

번호	중쇄 CDR		경쇄 CDR	
5A9	HCDR1	SYDMS (서열 번호 23)	LCDR1	QSSEDISSNLS (서열 번호 26)
	HCDR2	AIGGAGGTYASWAKS (서열 번호 24)	LCDR2	AASNLAS (서열 번호 27)
	HCDR3	GWTRLDL (서열 번호 25)	LCDR3	QGGYWSGISNFGNG (서열 번호 28)
9E6	HCDR1	SYDMS (서열 번호 23)	LCDR1	QASEDISSNLA (서열 번호 29)
	HCDR2	AIGGAGGTYASWAKS (서열 번호 24)	LCDR2	PASNLAS (서열 번호 30)
	HCDR3	GWTRLDL (서열 번호 25)	LCDR3	QGGYWTSTSNFGNG (서열 번호 31)
9F10	HCDR1	SYDMS (서열 번호 23)	LCDR1	QASEDISSNLA (서열 번호 29)
	HCDR2	AIGGAGGTYASWAKS (서열 번호 24)	LCDR2	AASNLAS (서열 번호 27)
	HCDR3	GWTRLDL (서열 번호 25)	LCDR3	QGAYWSSTSYFGNG (서열 번호 32)
4F6	HCDR1	SYGVT (서열 번호 33)	LCDR1	QASQISNGLA (서열 번호 36)
	HCDR2	AIGSTGSAYYASWAKS (서열 번호 34)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 37)
	HCDR3	GGITAYAI (서열 번호 35)	LCDR3	QSYYSSTTV (서열 번호 38)
5B8	HCDR1	SYGVS (서열 번호 39)	LCDR1	QASEDITNGIA (서열 번호 42)
	HCDR2	AIGSSGSAYYASWARS (서열 번호 40)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 37)
	HCDR3	GGITVYAI (서열 번호 41)	LCDR3	QSYYSSTYTI (서열 번호 43)
8G10	HCDR1	SYGVS (서열 번호 39)	LCDR1	QASQSITNGLA (서열 번호 45)
	HCDR2	GIASGTTTYANWAKS (서열 번호 44)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 37)
	HCDR3	GGITAYAI (서열 번호 35)	LCDR3	QSYDSSSTV (서열 번호 46)
8C12	HCDR1	SYGVS (서열 번호 39)	LCDR1	QASQISNGLA (서열 번호 36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (서열 번호 47)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 37)
	HCDR3	GGITVYAI (서열 번호 41)	LCDR3	QSYFSSSTV (서열 번호 48)
4D4	HCDR1	SYGVS (서열 번호 39)	LCDR1	QASQISNGLA (서열 번호 36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (서열 번호 47)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 37)
	HCDR3	GGITVYAI (서열 번호 41)	LCDR3	QSYFSSSTV (서열 번호 48)

[0204]

2F12	HCDR1	SYGVS (서열 번호 39)	LCDR1	QASQISNGLA (서열 번호 36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (서열 번호 47)	LCDR2	GASNLAS (서열 번호 50)
	HCDR3	GGITVYAM (서열 번호 49)	LCDR3	QSYFSSSTV (서열 번호 48)
3F6	HCDR1	SYAIS (서열 번호 51)	LCDR1	QSSQSVANNDFLS (서열 번호 54)
	HCDR2	AIDRYGTTYATWAKS (서열 번호 52)	LCDR2	GASTLAS (서열 번호 55)
	HCDR3	GPWYYGGDVAVTGSFDP (서열 번호 53)	LCDR3	TGGYAGPIYI (서열 번호 56)
10A4	HCDR1	RNAIS (서열 번호 57)	LCDR1	LASEDIYRGIS (서열 번호 60)
	HCDR2	GIGSSGSAYYASWAKS (서열 번호 58)	LCDR2	GASTLQS (서열 번호 61)
	HCDR3	DGYAGSSWGIYYGMDP (서열 번호 59)	LCDR3	LGGHSYSSAGLT (서열 번호 62)

[0205]

[0206] 수득된 가변 영역 서열을 인간 항체 IgG1 불변 영역(Eu 번호지정 체계에 따른 돌연변이 N297A 포함) 서열 및 인간 카파 사슬 불변 영역 서열에 각각 연결하여 인간-토끼 키메라 항체 서열을 수득하였다. 키메라 항체의 서열을 분자 클로닝에 의해 발현 벡터에 삽입하였고, HEK293 세포 발현 시스템을 사용하여 인간-토끼 키메라 항체를 수득하였다.

[0207] **실시예 3. Raji 세포에 대한 인간-토끼 키메라 항-CD40 항체의 결합**

[0208] Raji 세포는 인간 CD40을 과발현하는 종양 세포주이다. 2E5 Raji 세포를 96웰 플레이트에 접종하였다. 100 μ l의 시험 항체를 첨가했으며, 가장 높은 최종 농도는 100nM이었다. 항체를 8가지 농도로 5배 희석하였다. 플레이트를 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 1회 세척하고, AF647-접합 항-인간 IgG 항체[잭슨 이뮤노리서치 래보레이토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories), 카탈로그 번호 205-609-088]를 1:500의 희석 비율로 첨가하였다. 플레이트를 4℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 1회 세척한 후 유세포분석기를 이용하여 형광 강도를 측정하였다. CD40에 대한 항-CD40 항체의 결합 EC₅₀ 값을 계산하였다. 항-CD40 길항 항체 CFZ533[즉, 이스칼리맵(iscalimab), 노바(Nova)]을 양성 대조군으로 사용하였고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 각각 미국 특허 공고공보 제8277810B호의 서열 5 및 서열 2로부터 유래되었다.

[0209] 표 5의 결과는 2F12, 3F6, 4F6, 5A9, 5B8, 9E6 및 10A4가 모두 CFZ533보다 더 강한 결합 EC₅₀을 갖는 반면, 다른 항체(예를 들어 8E1 사용, 서열은 표시되지 않음)가 CFZ533보다 더 약한 EC₅₀을 갖는다는 것을 보여준다.

[0210] [표 5]

[0211] Raji 세포에 대한 인간-토끼 키메라 항-CD40 항체의 FACS 결합 EC₅₀(nM)

번호	결합 EC ₅₀ (nM)
2F12	0.412
3F6	1.506
4F6	0.258
5A9	0.671
5B8	0.435
8E1	2.511
9E6	0.608
10A4	0.467
CFZ533	2.410

[0212]

[0213] **실시예 4. 인간-토끼 키메라 항-CD40 항체의 리포터 유전자 세포 활성**

[0214] HEK-블루(Blue) CD40L 세포는 인비보젠(Invivogen)(카탈로그 번호 hkb-cd40)에서 구입하였다. 세포를 인간 CD40 유전자 및 NF-kB 매개 SEAP 계놈으로 안정적으로 형질감염시켰다. CD40 신호전달 경로의 활성화 수준은 SEAP의 기질인 퀀티-블루(QUANTI-Blue)를 사용하여 상청액에서 분비된 SEAP를 검출함으로써 특성화될 수 있다. 본 실험에서, CD40L에 의한 HEK-블루 CD40L 세포의 활성화를 검출함으로써 IC₅₀에 따라 항-CD40 항체의 시험관 내 길항제 활성을 평가하였다. HEK-블루 CD40L 세포를 10% FBS, 100 μ g/ml의 제오신(Zeocin) 및 30 μ g/ml의 블라스티시딘(Blasticidin)이 함유된 DMEM 배지에서 배양하고, 1:5 또는 1:10의 비율로 일주일에 2 내지 3회 계대 배양하였다. 계대배양하는 동안 배지를 피펫으로 제거하고 세포 층을 0.25% 판크레아틴 5ml로 행구었다. 그런 다음 판크레아틴을 피펫으로 제거하고, 세포를 인큐베이터에서 3 내지 5분 동안 분해한 후, 새로운 배지를 첨가하여 세포를 재현탁시켰다. 100 μ l의 세포 현탁액을 5×10^{-5} 세포/ml의 밀도로 96웰 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 배지는 10% FBS, 100 μ g/ml의 제오신 및 30 μ g/ml의 블라스티시딘을 포함하는 DMEM이었다. 96웰 플레이트 주변에 멸균수 100 μ l만 추가하였다. 플레이트를 인큐베이터에서 24시간 동안 항온처리하였다(37℃, 5% CO₂). 세포 접착 후, 연속적으로 희석된 시험 항체를 100 μ l/웰로 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 25ng/ml의 CD40L(R&D, 카탈로그 번호 2706-CL) 및 2 μ g/ml의 항-His 항체(R&D, 카탈로그 번호 MAB050)를 첨가하고 플레이트를 인큐베이터에서 20-24시간 동안 항온처리하였다(37℃, 5% CO₂). 각 웰에서 20

μ l의 세포 상청액을 새로운 96웰 편평 바닥 플레이트로 채취해 넣고, 180 μ l의 퀀티-블루 기질 용액을 첨가하였다. 플레이트를 암실에서 인큐베이터 내에서 1-3시간 동안 항온처리하였다. 630nm에서의 흡광도는 마이크로플레이트 판독기[썬도 멀티스칸에프시(Thermo MultiSkanFc)]를 사용하여 측정하였고, IC₅₀ 값을 계산하여 항-CD40 항체의 시험관내 세포 활성을 평가하는 데 사용하였다. 표 6을 참조한다. 결과는 2F12, 3F6, 4D4, 4F6, 5A9, 5B8, 8C12, 8G10, 9E6, 9F10 및 10A4가 모두 CFZ533과 유사하거나 약간 더 강한 리포터 세포 억제 활성 IC₅₀을 갖는 반면, 다른 항체(예를 들어 2F1 사용, 서열은 표시되지 않음)는 CFZ533보다 IC₅₀이 더 약함을 보여준다.

[표 6]

항-CD40 항체의 리포터 유전자 세포 활성 IC₅₀(nM)

번호	IC ₅₀ (nM)
2F12	0.1717
3F6	0.3778
4D4	0.197
4F6	0.1823
5A9	0.3173
5B8	0.2033
8C12	0.1729
8G10	0.1556
9E6	0.2206
9F10	0.2171
10A4	0.2172
2F1	0.6849
CFZ533	0.2715

실시예 5. 항-CD40 항체의 인간화

토끼 항체 2F12, 3F6, 9E6 및 10A4의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 항체의 생식계열 데이터베이스와 비교하여 상동성이 높은 인간 생식계열 주형을 획득하였다. 최종 항체의 인간화를 위한 인간 생식계열 주형이 표 7에 제시되어 있다.

[표 7]

항체의 인간화를 위한 인간 생식세포 주형

번호	중쇄 가변 영역		경쇄 가변 영역	
	FR1-FR3	FR4	FR1-FR3	FR4
2F12	IGHV2-26*01	IGHJ1*01	IGkV1-13*02	IGKJ4*01
3F6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-13*02	
9E6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-9*01	
10A4	IGHV4-4*08		IGkV1-6*01	

토끼 항체의 CDR 영역을 선택된 인간 생식계열 주형에 그래프팅하여 인간 생식계열 가변 영역을 대체하고 상응하는 인간 IgG 불변 영역과 재조합하였다(바람직하게는 중쇄는 돌연변이 N297A를 갖는 IgG1이고 경쇄는 κ 였다). 그런 다음 토끼 항체의 3차원 구조를 바탕으로 매립된 잔기, CDR 영역과 직접적으로 상호작용하는 잔기, 및 VL과 VH의 입체배치에 큰 영향을 미치는 잔기에 대해 역돌연변이(back mutation)를 수행하였고, 잠재적인 변역 후 변형 위험 부위에서 돌연변이를 수행하여 최종 인간화 분자를 획득하였다. 예로서, 2F12 및 9E6에 상응하는 인간화 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열이 제시되어 있으며(표 8 및 표 9 참조), 여기서 L은 경쇄를 나타내고, H는 중쇄를 나타내고, L 및 H 다음의 숫자는 서로 다른 역돌연변이를 포함하는 서로 다른 버전의 인간화 서열을 나타낸다.

[0224] [표 8]

[0225] 인간화 9E6의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열		서열 번호
9E6-L1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASEDISSNLAWYQOKPGKPPK LLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGG YWTSTSNFGNVFGGGTKVEIK	서열 번호 63
9E6-L2	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASEDISSNLAWYQOKPGKPPK LLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGG YWTSTSNFGSGFGGGTKVEIK	서열 번호 64
9E6-L3	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASEDISSNLAWYQOKPGKPPK LLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGG YWTSTSNFGTGFGGGTKVEIK	서열 번호 65
9E6-L4	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASEDISSNLAWYQOKPGKPPK LLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGG YWTSTSNFGQGFGGGTKVEIK	서열 번호 66
9E6-H1	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKG LEWIGAIGGAGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARGWTRLDLWGQGLTVSS	서열 번호 67
9E6-H2	QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKG LEWIGAIGGAGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARGWTRLDLWGQGLTVSS	서열 번호 68
카바트 번호지정 체계에 의해 정의된 CDR은 밑줄이 그어져 있다.		

[0226]

[0227] 9E6의 인간화 과정에서 다음과 같은 LCDR3이 수득되었다:

[0228] >9E6-L1의 LCDR3

[0229] QGGYWTSTSNFGNV(서열 번호 69)

[0230] >9E6-L2의 LCDR3

[0231] QGGYWTSTSNFGSG(서열 번호 70)

[0232] >9E6-L3의 LCDR3

[0233] QGGYWTSTSNFGTG(서열 번호 71)

[0234] >9E6-L4의 LCDR3

[0235] QGGYWTSTSNFGQG(서열 번호 72)

[0236] >9E6-L의 LCDR3에 대한 일반식

[0237] QGGYWTSTSNFGX₉X₁₀(서열 번호 73), 여기서 X₉는 N, S, T 및 Q로 구성된 군으로부터 선택되고, X₁₀은 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0238] 5A9, 9E6 및 9F10은 다음과 같은 일반식 구조를 갖는다:

[0239] HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 SYDMS(서열 번호 23), AIGGAGGTYIASWAKS(서열 번호 24) 및 GWTRLDL(서열 번호 25)로 표시되고;

[0240] LCDR1은 QX₁SEDISSNLX₂(서열 번호 74)로 표시되고, 여기서 X₁은 A 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂는 A 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0241] LCDR2는 X₃ASNLAS(서열 번호 75)로 표시되고, 여기서 X₃은 A 및 P로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0242] LCDR3은 QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀(서열 번호 76)으로 표시되고, 여기서 X₄는 A 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X₅는 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₆은 S 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X₇은 T 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X₈은 N 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₉는 N, S, T 및 Q로 구성된 군으로부터 선택

되고, X_{10} 은 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택된다.

[표 9]

인간화 2F12의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열		서열 번호
2F12-L1	AFQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSSISNVLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSSTVFSGGKVEIK	서열 번호 77
2F12-L2	AFQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSSISQGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSSTVFSGGKVEIK	서열 번호 78
2F12-L3	AFQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSSISGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSSTVFSGGKVEIK	서열 번호 79
2F12-L4	AFQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSSISTGLAWYQQKPGKPP KLLIVGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ SYFSSSSTVFSGGKVEIK	서열 번호 80
2F12-H1	EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKAL EWLAGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPV DTATYYCARGGITVYAMWGQGLVTVSS	서열 번호 81
2F12-H2	EVTVKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKAL EWLGGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPV DTATYYCARGGITVYAMWGQGLVTVSS	서열 번호 82
카뎀 번호지정 체계에 의해 정의된 CDR은 밑줄이 그어져 있다.		

2F12의 인간화 과정에서 다음과 같은 LCDR1이 수득되었다.

>2F12-L1의 LCDR1

QASQSSISNVLA(서열 번호 83)

>2F12-L2의 LCDR1

QASQSSISQGLA(서열 번호 84)

>2F12-L3의 LCDR1

QASQSSISGLA(서열 번호 85)

>2F12-L4의 LCDR1

QASQSSISTGLA(서열 번호 86)

>2F12-L의 LCDR1에 대한 일반식

QASQSSIS X_{24} X_{25} LA(서열 번호 87), 여기서 X_{24} 는 N, Q, S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{25} 는 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택된다.

4F6, 5B8, 8G10, 8C12, 4D4 및 2F12는 다음과 같은 일반식 구조를 갖는다:

HCDR1은 SYGV X_{11} (서열 번호 88)로 표시되고, 여기서 X_{11} 은 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고;

HCDR2는 X_{12} IX X_{13} SX X_{14} GX X_{15} X X_{16} YYAX X_{17} WAX X_{18} S(서열 번호 89)로 표시되고, 여기서 X_{12} 는 A 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{13} 은 G 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{14} 는 T, S, 및 D로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{15} 는 T 및 S로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{16} 은 T 및 A로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{17} 은 S 및 N으로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{18} 은 K 및 R로 구성된 군으로부터 선택되고;

HCDR3은 GGITX X_{19} YAX X_{20} (서열 번호 90)으로 표시되고, 여기서 X_{19} 는 A 및 V로 구성된 군으로부터 선택되고, X_{20} 은 I 및 M으로 구성된 군으로부터 선택되고;

- [0261] LCDR1은 QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA(서열 번호 91)로 표시되고, 여기서 X₂₁은 Q 및 E로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₂는 S 및 D로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₃은 S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₄는 N, Q, S 및 T로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₅는 V 및 G로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0262] LCDR2는 GASNLAS(서열 번호 37)로 표시되고;
- [0263] LCDR3은 QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀(서열 번호 92)로 표시되고, 여기서 X₂₆은 F 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₇은 S, D 및 N으로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₈은 S 및 F로 구성된 군으로부터 선택되고, X₂₉는 S, T 및 Y로 구성된 군으로부터 선택되고, X₃₀은 V 및 I로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0264] 각 토끼 항체의 다양한 버전의 경쇄와 중쇄를 쌍으로 조합하고 발현시키고 정제하였다. 명칭은 중쇄 가변 영역 번호와 경쇄 가변 영역 번호의 조합이다. 예를 들어, "2F12-L1H1"은 VH가 서열 번호 63이고 VL이 서열 번호 67인 항체를 지칭한다. 경쇄 및 중쇄 불변 영역은 각각 인간 IgG1 불변 영역(Eu 번호지정 체계에 따른 돌연변이 N297A 포함) 서열 및 인간 카파 사슬 불변 영역 서열을 사용하였다.
- [0265] 예를 들어, 인간화 분자 2F12-L4H2(2F12-L4 경쇄 및 2F12-H2 중쇄 사용) 및 9E6-L4H2(9E6-L4 경쇄 및 9E6-H2 중쇄 사용)의 서열은 아래에 제시되고, 여기서 경쇄 및 중쇄 불변 영역은 각각 인간 IgG1 불변 영역(Eu 번호지정 체계에 따른 돌연변이 N297A 포함) 서열 및 인간 카파 사슬 불변 영역 서열을 사용하였다.
- [0266] >9E6-L4H2 HC:
- [0267] QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKLEWIGAIGGAGGTYASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSVTAADTAVYYCARGWTRL
DLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQQDLWGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
LTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
- [0268] 서열 번호 93
- [0269] >9E6-L4H2 LC:
- [0270] DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPKLLIFPASNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQG
FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
- [0271] 서열 번호 94
- [0272] >2F12-L4H2 HC:
- [0273] EVTVKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVLTMTNMDPVDATYYCARGGITV
YAMWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQQDLWGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSPGK
- [0274] 서열 번호 95
- [0275] >2F12-L4H2 LC:
- [0276] AFQLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSI STGLAWYQQKPGKPKLLIVGASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYFSSSTVFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC
- [0277] 서열 번호 96
- [0278] 상기 항체의 중쇄 불변 영역을 조작하였다. 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 사용했으며 5개의 점 돌연변이 L234A, L235A, M252Y, S254T 및 T256E(Eu 번호지정 체계에 따름)를 포함하였으며, 경쇄 불변 영역과 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 변경되지 않았다. 새로 생산된 항체는 2F12-L4H2-AAYTE 및 9E6-L4H2-AAYTE였으며, 이들의 완전한 중쇄 서열은 다음과 같다:

- [0279] >9E6-L4H2-AAYTE HC:
- [0280] QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKLEWIGAIGGAGGTYASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSVTAADTAVYYCARGWTRL
DLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0281] 서열 번호 97
- [0282] >2F12-L4H2-AAYTE HC:
- [0283] EVTVKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGIGSDGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITV
YAMWQGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0284] 서열 번호 98
- [0285] 중쇄 및 경쇄 불변 영역은 밑줄이 그어져 있다.
- [0286] 예시적인 IgG Fc는 다음과 같다:
- [0287] >IgG1-Fc(N297A)
- [0288] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0289] 서열 번호 99
- [0290] >IgG1-Fc(AAYTE)
- [0291] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0292] 서열 번호 100
- [0293] **실시예 6. Raji 세포에 대한 인간화 항-CD40 항체의 결합**
- [0294] Raji 세포는 세포 표면에 인간 CD40을 고도로 발현하므로 세포 표면 인간 CD40에 대한 CD40 길항 항체의 결합을 검출하는 데 사용할 수 있다.
- [0295] Raji 세포를 1.5E5/웰로 플레이트팅하고, 다양한 농도의 CD40 길항 항체를 첨가하였다. 플레이트를 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. FACS 완충액(PBS + 2% FBS)으로 2회 세척한 후, 2차 항체[알렉사 플루오어(Alexa Fluor)488 접합 항-인간 IgG(H+L) 항체]를 첨가하고 플레이트를 4℃에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 세포 표면의 형광 강도를 유세포분석기[BD FACS 셀레스타(Celesta)]로 측정하였다.
- [0296] 표 10에 제시된 결과에 따르면, 2F12-L4H2, 9E6-L4H2 및 CFZ533은 Raji 세포 표면 인간 CD40에 결합하는 유사한 능력을 가지고 있다.
- [0297] [표 10]

[0298] Raji 세포에 대한 인간화 항-CD40 항체의 FACS 결합에 대한 EC₅₀ 결과

항체 번호	결합 EC ₅₀ (nM)	항체 번호	결합 EC ₅₀ (nM)
2F12	0.479	9E6	0.895
2F12-L1H1	0.549	9E6-L1H1	1.083
2F12-L1H2	0.469	9E6-L1H2	1.048
2F12-L2H1	0.516	9E6-L2H1	1.993
2F12-L2H2	0.516	9E6-L2H2	1.660
2F12-L3H1	0.456	9E6-L3H1	1.065
2F12-L3H2	0.762	9E6-L3H2	1.148
2F12-L4H1	0.508	9E6-L4H1	0.928
2F12-L4H2	0.589	9E6-L4H2	0.870
CFZ533	1.009		

[0299]

[0300] 실시예 7. 인간 CD40 및 시노물구스 원숭이 CD40에 대한 항-CD40 항체의 친화도 분석

[0301] 시험 항체를 항-인간 Fc 칩에 친화성 포획하고, 일련의 농도의 His-태그된 인간 또는 시노물구스 원숭이 CD40 항원을 칩 표면 위로 흐르게 하였다. 비아코어 기기를 사용하여 반응 신호를 실시간으로 검출하여 결합 및 해리 곡선을 획득하였다. 실험에 사용된 완충액은 탈이온수로 1×(pH 7.4)로 희석한 HBS-EP + 10× 완충 용액(카탈로그 번호 BR-1006-69, GE)을 사용하였다. 실험을 통해 획득된 데이터에 대해 (1:1) 결합 모델을 이용하여 정합을 수행하여 친화도 값을 구하였다. 표 11을 참조한다.

[0302] 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 인간 CD40에 대해 CFZ533과 유사한 결합 상수를 갖고, 9E6-L4H2는 시노물구스 원숭이 CD40에 대해 더 강한 결합 친화도를 갖고, 2F12-L4H2는 시노물구스 원숭이 CD40에 대해 약간 더 약한 결합 친화도를 갖는다.

[0303] [표 11]

[0304] 다양한 종의 CD40에 대한 CD40 길항 항체의 SPR 친화도

이동상	고정상	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)
인간 CD40	2F12-L4H2	7.58E+05	2.06E-03	2.71E-09
	9E6-L4H2	4.13E+05	2.21E-04	5.36E-10
	CFZ533	6.88E+05	1.41E-04	2.05E-10
시노물구스 원숭이 CD40	2F12-L4H2	1.17E+07	4.14E-01	3.53E-08
	9E6-L4H2	5.14E+05	6.23E-05	1.21E-10

[0305]

[0306] 실시예 8. 항-CD40 항체의 리포터 유전자 세포 활성

[0307] HEK-블루 CD40L 세포를 인비보젠(카탈로그 번호 hkb-cd40)에서 구입하였다. 세포를 인간 CD40 유전자 및 NF-κB 매개 SEAP 계통으로 안정적으로 형질감염시켰다. CD40 신호전달 경로의 활성화 수준은 SEAP의 기질인 퀴티-블루를 사용하여 상청액에서 분비된 SEAP의 양을 측정함으로써 특성화될 수 있다. 분석에서는 CD40L에 의해 유도된 HEK-블루 CD40L 세포 활성화에 대한 CD40 길항 항체의 억제 효과를 측정하고, CD40 길항 항체의 시험관내 세포 활성을 IC₅₀에 기초하여 평가하였다.

[0308] HEK-블루 CD40L 세포를 10% FBS, 100μg/ml의 노르모신(Normocin), 100μg/ml의 제오신 및 30pg/ml의 블라스티시딘이 함유된 DMEM 배지에서 일주일에 2-3회 계대배양하면서 배양하였다. HEK-블루 CD40L 세포를 96웰 세포 배양 플레이트에 5E4/웰로 플레이트팅하고(배지는 10% FBS 및 100μg/ml의 노르모신이 함유된 DMEM임) 밤새 항온처리하였다. 세포 접착 후, 연속적으로 희석된 시험 항체를 100μl/웰로 첨가하고 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. CD40L-his(R&D, 2706-CL-025) 및 항-His 항체(R&D, MAB050-500)를 첨가하고, 플레이트를 밤

새 항온처리하였다. 세포 원심분리 후, 세포 상청액 20 μ l를 새로운 96-웰 백색 플레이트에 옮기고, 퀀티-블루 기질 용액 180 μ l를 첨가하였다. 플레이트를 암실에서 15분 동안 항온처리하였다. 620nm에서의 흡광도를 인비전(Envision) 마이크로플레이트 판독기로 측정하였고 IC₅₀ 값을 계산하여 CD40 길항 항체의 시험관내 세포 활성을 평가하는 데 사용하였다.

표 12 및 도 1a 및 1b에 제시된 결과에 따르면, 9E6-L4H2 및 CFZ533은 리포터 유전자 시스템에 대해 유사한 억제 활성을 갖고, 2F12-L4H2는 CFZ533보다 더 우수한 억제 활성을 갖는다.

[표 12]

항-CD40 항체에 의한 CD40 리포터 유전자 세포 활성의 억제에 대한 IC₅₀

	항체 번호	IC ₅₀ (nM)
분석 1	2F12-L4H2	0.18
	CFZ533	0.36
분석 2	9E6-L4H2	0.50
	CFZ533	0.35

실시예 9. B 세포 활성화 분석 시스템에서 항-CD40 항체의 억제 활성

CD40은 B 세포에서 고도로 발현되고, CD40L은 CD40에 결합할 경우 B 세포 활성화를 유도하고 일련의 활성화 마커의 발현을 상향 조절할 수 있다. CD40 길항 항체는 CD40L과 CD40의 결합을 차단하여 B 세포의 면역 활성화 과정을 제거한다.

인간 PBMC를 96웰 세포 배양 플레이트에 2E5/웰, 50 μ l/웰로 플레이팅하였다(배지는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 RPMI-1640이었다). 연속적으로 희석된 시험 항체를 50 μ l/웰로 첨가하고 세포를 37°C, 5% CO₂에서 0.5시간 동안 함께 항온처리하였다. 밤새 자극을 위해 CD40L-his 및 항-His 항체를 각 웰에 첨가하였다. 다음날, 플레이트를 원심분리하고 상청액을 제거한 후 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 1:1000으로 희석된 100 μ l의 고정가능한 생존력 염료(Fixable viability dye) EF780[인비트로젠(Invitrogen), 65086514]으로 실온에서 15분 동안 염색하였다. 세포를 2회 세척한 후 1:200으로 희석된 인간 Fc 차단제(BD, 564220) 100 μ l를 사용하여 실온에서 10분 동안 차단하였다. 원심분리 후, 세포를 1:200으로 희석된 유세포분석 항체[PerCP/시아닌(Cyanine)5.5 항-인간 CD19(바이올레전드(Biolegend), 302230) 및 APC 항-인간 CD69(바이올레전드, 310910)]와 함께 4°C에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. 원심분리 후 상청액을 제거하고 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후 200 μ l의 PBS에 재현탁시키고 유세포분석기(BD FACS 셀레스타)를 이용하여 세포 표면의 형광 강도를 측정하였다.

표 13 및 도 2a 및 2b에 제시된 결과에 따르면, 9E6-L4H2는 CFZ533과 유사한 B 세포 활성화 억제 활성을 갖는다. 2F12-L4H2는 CFZ533보다 B 세포 억제 활성이 더 크다.

[표 13]

B 세포 활성화 분석 시스템에서 인간화 항-CD40 항체의 억제 활성

	CD19+CD69+%		CD19+CD69+ MFI	
항체 번호	IC ₅₀ (nM)	최대 억제율	IC ₅₀ (nM)	최대 억제율
CFZ533	0.14	95%	0.07	110%
9E6-L4H2	0.14	98%	0.07	110%
2F12-L4H2	0.04	93%	0.03	111%

항체 첨가 후, CD19+CD69+ 신호는 배경보다 낮았는데, 이는 아마도 CD40L 유도 신호의 억제에 더하여 B 세포의 배경 활성화가 어느 정도 억제되었기 때문일 것이다.

실시예 10. DC 세포 활성화 분석 시스템에서 항-CD40 항체의 억제 활성

CD40은 수지상 세포(DC: dendritic cell)에서 고도로 발현되며, CD40L은 CD40에 결합할 경우 DC 활성화를 유도하고 DC 세포 표면의 다중 활성화 마커의 발현을 상향 조절하고 DC에서 다중 염증 인자의 분비를 촉진하고, 면

역 반응을 더욱 증폭시킨다. CD40 길항 항체는 CD40L과 CD40의 결합을 차단하여 DC 세포의 면역 활성화 과정을 제거한다.

[0323] EssaySep(상표명) 인간 CD14 분류 키트[스템셀(Stemcell), 19359]를 사용하여 신선한 일차 인간 말초 혈액 PBMC로부터 단핵구를 분류 및 농축하였고, RPMI-1640 배지(10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신), 50ng/ml의 IL-4[페프로텍(PeproTech), 200-04] 및 50ng/ml의 GM-CSF(페프로텍, 300-03)에 의해 6일 동안 분화시켰다. 7일차에, 분화된 DC 세포를 1E5/웰로 96웰 세포 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 연속적으로 희석된 시험 항체를 웰에 첨가하고, 세포를 37℃, 5% CO₂에서 0.5시간 동안 함께 항온처리하였다. 이어서, CD40L-his 및 항-His 항체를 최종 농도로 각 웰에 첨가하였다. 48시간 배양 후 DC 세포 활성화 수준을 유세포분석법으로 측정하였고; 원심분리 후 상청액을 제거하고 세포를 FACS 완충액(PBS + 2% FBS)으로 2회 세척한 후, 1:1000으로 희석된 고정 가능한 생존력 염료 EF780(인비트로젠, 65086514) 100μl로 실온에서 15분 동안 염색하였다. 세포를 2회 세척한 후 1:200으로 희석된 인간 Fc 차단제(BD, 564220) 100μl를 사용하여 실온에서 10분 동안 차단하였다. 원심분리 후, 세포를 1:200으로 희석된 유세포분석 항체[알렉사 플루오어(등록상표) 700 항-인간 CD11c(바이오레전드, 337220), 브릴리언트 바이올렛(Brilliant Violet) 421(상표명) 항-인간 CD80(바이오레전드, 305221) 및 APC 항-인간 CD86(바이오레전드, 305412)]와 함께 4℃에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. 원심분리 후 상청액을 제거하고 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후 200μl의 PBS에 재현탁시키고 유세포분석기(BD FACS 셀레스타)를 이용하여 세포 표면의 형광 강도를 측정하였다.

[0324] 또한, 배양 24시간[TNF α, 시스바이오(Cisbio), 62HTNFAPEG] 및 48시간[IL-12/23 p40, 노부스(Novus), VAL121] 후에 상청액 중 사이토카인 분비 수준을 측정하였다.

[0325] 표 14 및 도 3a 내지 3d에 제시된 결과에 따르면, 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 대조 항체 CFZ533과 유사한 DC 세포 억제 활성을 갖는다.

[0326] [표 14]

[0327] DC 세포 활성화 분석 시스템에서 인간화 항-CD40 항체의 억제 활성

항체 번호	DC 세포 활성화 분석 시스템에서의 IC ₅₀ (nM)			
	CD80 MFI	CD86 MFI	IL-12/23 p40	TNFα
CFZ533	1.19	1.93	0.68	0.35
9E6-L4H2	3.44	3.72	1.85	0.7
2F12-L4H2	0.78	0.52	0.68	0.30

[0328]

[0329] 실시예 11. B 세포 활성화 분석 시스템에서 인간화 항-CD40 항체의 작용 활성

[0330] TNF 수용체 상과에 속하는 CD40은 리간드 CD40L에 결합하거나 항체에 의해 가교될 때 하류 신호 전달 경로의 특이적 활성화 및 비특이적인 활성화를 매개한다. 따라서 B 세포에 대한 CD40 길항 항체의 배경 작용제 활성화는 CD40L을 첨가하지 않고도 측정할 수 있다.

[0331] 인간 PBMC를 96웰 세포 배양 플레이트에 2E5/웰, 100μl/웰로 플레이팅하였다(배지는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 RPMI-1640이었다). 연속적으로 희석된 시험 항체를 100μl/웰로 첨가하고 세포를 5% CO₂, 37℃에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 플레이트를 원심분리하고 상청액을 제거한 후 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 1:1000으로 희석된 고정 가능한 생존력 염료 EF780 100μl로 실온에서 15분 동안 염색하였다. 세포를 2회 세척한 후 1:200으로 희석된 인간 Fc 차단제 100μl를 사용하여 실온에서 10분 동안 차단하였다. 원심분리 후, 세포를 1:200으로 희석된 유세포분석 항체[PerCP/시아닌5.5 항-인간 CD19(바이오레전드, 302230) 및 APC 항-인간 CD69(바이오레전드, 310910)]와 함께 4℃에서 0.5시간 동안 항온처리하였다. 원심분리 후 상청액을 제거하고 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후 200μl의 PBS에 재현탁시키고 유세포분석기(BD FACS 셀레스타)를 이용하여 세포 표면의 형광 강도를 측정하였다.

[0332] 도 4에 제시된 결과에 따르면, CD40 작용 항체 9E5-SELFNS(국제 특허출원 공개공보 제W02020108611A1호)는 용량 의존적 방식으로 B 세포를 활성화한 반면, 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 2.5nM에서 여전히 유의한 B 세포 작용제 활성을 나타내지 않았다.

[0333] 실시예 12. 마우스 T 세포 의존성 체액성 면역 반응(TDAR) 모델

[0334] 6-7주령의 암컷 인간 CD40 형질전환 마우스를 바이오사이토젠 장쑤 컴퍼니 리미티드(Biocytogen Jiangsu Co., Ltd.)에서 구입하였다. 사육 환경: SPF; 생산 라이선스: SCXK(장쑤)-2016-0004; 인간 CD40 형질전환 마우스 인증 번호: 320726200100167773. 도착 후, 동물을 7일 동안 순응시키고 무작위로 그룹화하였다. 실험 0일차에 각 그룹의 마우스 중 한 마리에서 혈액을 수집한 후 복강내 주사하였다. 1일차에 각 마우스에게 면역화를 위해 KLH(KLH:완전 프로인트 보조제(CFA) = 1:1 유화된 면역 복합체) 50 μ g을 복강내 주사하였다. 실험 15일차에 각 마우스에게 2차 면역화를 위해 KLH(KLH:불완전 프로인트 보조제(IFA) = 1:1 유화된 면역 복합체) 50 μ g을 복강내 주사하였다. 각 그룹에게 주 2회 복강내 주사하였고, 7, 14, 21 및 28일차에 안와 정맥총에서 약 150 μ l의 혈액 샘플을 채취하였다. 전혈을 실온에서 1 내지 4시간 방치한 후 7000rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 혈청을 사용 전에 -80℃에서 보관하였다. 구체적인 실험 과정은 도 5a에 제시되어 있다.

[0335] 구체적인 투여 계획은 표 15에 제시되어 있다. 마우스 혈청을 매주 분리하고 항-KLH 특이적 IgG 수준에 대해 ELISA로 분석하였다.

[0336] [표 15]

[0337] 마우스 TDAR 모델에 대한 실험적 투여 계획

	그룹	약물	N	용량	빈도
hCD40 유전자이식 마우스	1	IgG1	5	1 mg/kg	BIW
	2	CFZ533	5	1 mg/kg	BIW
	3	CFZ533	5	0.3 mg/kg	BIW
	4	9E6-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	5	9E6-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW
	6	2F12-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	7	2F12-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW

[0338]

[0339] 도 5b 및 표 16에 제시된 결과에 따르면, 1mg/kg의 CD40 길항 항체는 2회 면역화 후 항-KLH 특이적 IgG 생산을 유의하게 억제하였다. 2회 면역화 후 저용량(0.3mg/kg)의 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 동일한 용량의 CFZ533보다 항-KLH IgG 생산을 더 잘 억제하였다.

[0340] [표 16]

[0341] 면역화 후 항-CD40 항체에 의한 IgG 생산의 억제(0.3mpk)

	7일	14일	21일	28일
투여전	0	0	0	0
IgG1	1.5 $\pm$ 0.4	247.4 $\pm$ 33.1	2187 $\pm$ 1248	4773 $\pm$ 2280
CFZ533 (0.3 mpk)	0.04 $\pm$ 0.01	30.9 $\pm$ 10.8	845 $\pm$ 423	3043 $\pm$ 1600
9E6-L4H2 (0.3 mpk)	0.002 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.01	0	18.25 $\pm$ 8.9
2F12-L4H2 (0.3 mpk)	0.22 $\pm$ 0.14	33.4 $\pm$ 25.8	175.5 $\pm$ 103	805.7 $\pm$ 415.6

[0342]

[0343] 실시예 13. 마우스 피부 이식편 거부반응 모델

[0344] 6주령의 수컷 Balb/c 마우스는 상하이 가족 계획 연구소 실험 동물 관리부(Laboratory Animal Management Department, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research)에서 구입하였다. 사육 환경: SPF; 인증 번호: 20180006023393.

[0345] 6-7주령의 암컷 인간 CD40 형질전환 마우스를 바이오사이토젠 장쑤 컴퍼니 리미티드에서 구입하였다. 사육 환경: SPF; 인증번호: 320726200100179778.

[0346] 도착 후, 동물을 7일 동안 순응시키고 무작위로 그룹화하였다. 실험 2일차에, 마우스에게 타크로리무스 FK506 또는 CD40 길항 항체를 복강내 주사하였다. 실험 0일차에 공여자 Balb/c 마우스와 C57BL6/J 마우스를 4% 염소 수화물로 마취시켰다. 공여자 마우스의 꼬리를 제거하고 꼬리에서 길이 1cm의 완전한 원형 피부를 단리하였다.

수여자 마우스의 등에 있는 털을 제거하고 피부층을 따라 절개를 하였다. 등 지방과 결합조직을 보존하면서 동일한 면적의 피부를 제거하였다. 공여자 피부를 수여자 마우스의 절개 부위에 놓고 절개 부위를 접착제로 봉합하였다. 그런 다음 마우스를 다시 우리에 넣어 회복시켰다. 구체적인 실험 과정은 도 6a에 제시되어 있다.

마우스에게 표 17의 투여 계획에 따라 투여하였다. 회복 7일 후, 마우스 피부 생존을 매일 관찰하고 거부반응 점수를 기록하였다. 채점 시스템은 다음과 같다: 3 - 피부가 붉게 변하지 않고 매끄럽다. 2 - 피부의 일부가 붉게 변하고 윤기를 잃고 건조해진다. 1 - 대부분의 피부가 붉게 변하고 주름이 생기지 않으며 수축된다. 0 - 이식편 거부반응으로 인해 피부의 80%가 괴사된다.

[표 17]

마우스 피부 이식편 거부반응 모델에 대한 투여 계획

	그룹	약물	N	용량	투여 경로
공여자: Balb/c 수여자: hCD40 유전자이식 마우스 C57BL6/1	1	대조군 (동종이식편)	2	IgG1 10 mg/kg	ip
	2	모델군 (이종이식편)	7	IgG1 10 mg/kg	ip
	3	CFZ533	7	3 mg/kg	ip
	4	CFZ533	7	10 mg/kg	ip
	5	9E6-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	6	9E6-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	7	2F12-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	8	2F12-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	9	타크로리무스	6	3 mg/kg	ip
	10	9E6-L4H2 + 타크로리무스	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip
	11	2F12-L4H2 + 타크로리무스	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip

도 6b 및 표 18-20에 제시된 결과에 따르면, CD40 길항 항체 둘 다는 모델 그룹에 비해 마우스 피부 이식편 점수를 유의하게 개선하고 피부 이식편 생존 시간을 연장시켰다. 거부반응이 일어나기 전에는 판단할 수 없었기 때문에, 8일차부터 피부 이식편 채점을 시작하였다. 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 대조 항체 CFZ533보다 우수한 항-이식편 거부반응 활성을 보였다.

[표 18]

항-CD40 항체에 대한 15일차 피부 이식편 생존율(%)

	피부 이식편 생존율(%)		피부 이식편 생존율(%)
대조군	100%	대조군	100%
모델군	0%	모델군	0%
CFZ533(3mpk)	0%	CFZ533(10mpk)	0%
9E6-L4H2(3mpk)	28.5%	9E6-L4H2(10mpk)	14.3%
2F12-L4H2(3mpk)	28.5%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%

[표 19]

[0356] 항-CD40 항체에 대한 피부 이식편 점수(3mpk)

	8일	10일	15일	20일
대조군	3	3	3	3
모델군	0.7	0	0	0
CFZ533(3mpk)	2.7	2.1	0	0
9E6-L4H2(3mpk)	3	2.7	0.6	0
2F12-L4H2(3mpk)	2.9	2.4	0.6	0.1

[0357]

[0358] [표 20]

[0359] 항-CD40 항체에 대한 피부 이식편 점수(10mpk)

	8일	10일	15일	20일
대조군	3	3	3	3
모델군	0.7	0	0	0
CFZ533(10mpk)	2.9	2.1	0	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4

[0360]

[0361] 또한, 도 7 및 표 21-23에 제시된 바와 같이, 9E6-L4H2 및 2F12-L4H2는 타크로리무스와 조합하여 사용한 후 마우스 피부 이식편 거부반응에 대한 저항성을 더욱 향상시켰다.

[0362] [표 21]

[0363] 타크로리무스와 병용된 항-CD40 항체에 대한 15일차 피부 이식편 생존율

	피부 이식편 생존율(%)		피부 이식편 생존율 (%)
대조군	100%	대조군	100%
모델군	0%	모델군	0%
FK506(3mpk)	16.7%	FK506(3mpk)	16.7%
9E6-L4H2(10mpk)	14.3%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%
9E6-L4H2(10mpk) +FK506	33.3%	2F12-L4H2(10mpk) +FK506	83.3%

[0364]

[0365] [표 22]

[0366] 타크로리무스와 병용된 항-CD40 항체에 대한 피부 이식편 점수

	8일	10일	15일	20일
대조군	3	3	3	3
모델군	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
9E6-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.3	1.5	0.7	0.7

[0367]

[0368] [표 23]

[0369] 타크로리무스와 병용된 항-CD40 항체에 대한 피부 이식편 접수

	8일	10일	15일	20일
대조군	3	3	3	3
모델군	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4
2f12-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.7	2.3	1.5	0.8

[0370]

[0371] 실시예 14. 인간 CD40 형질전환 마우스에서의 인간화된 항-CD40 항체의 PK 분석

[0372] 6-7주령의 암컷 인간 CD40 형질전환 마우스를 바이오사이토킨 장쭈 컴퍼니 리미티드에서 구입하였다. 사육 환경: SPF; 생산 라이선스: SCXK(장쭈)-2016-0004; 인간 CD40 형질전환 마우스 인증 번호: 320726200100154632. 도착 후, 동물을 7일 동안 순응시키고 무작위로 그룹화하였다. 실험 0일차에, 각 마우스 그룹에 항-CD40 항체를 10mg/kg으로 복강내 주사하였다. 투여 후 15분, 4시간 및 8시간에 100-150 μ l의 혈액 샘플을 수집하고, 투여 후 1, 2, 4, 7, 10 및 14일차에 10 μ l의 EDTA-K2(0.1M)로 항응고시키고, 얼음에서 보관하였다. 여러 시점에서 항체 농도에 대해 마우스 혈장을 ELISA로 분석하였다. 분석은 구체적으로 다음과 같다: 염소 항-인간 IgG Fc 항체[락랜드(Rockland), 카탈로그 번호 609-101-017]를 PBS로 2.5 μ g/ml로 희석하고 96웰 플레이트에 50 μ l/웰로 첨가하였고, 플레이트를 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 세척 완충액으로 3회 세척한 후 50 μ l의 차단 용액을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 마우스 혈장과 시험 항체를 표준 곡선에 따라 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 항온처리하였다. 세척 완충액으로 3회 세척한 후, 항-hIgG Fab-HRP[시그마(Sigma), 카탈로그 번호 A0293, 1:10,000]를 50 μ l/웰로 첨가하고 플레이트를 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. TMB를 100 μ l/웰로 첨가하고, 혼합물을 암실에서 5분 동안 반응하도록 두었다. 0.16M 황산을 100 μ l/웰로 첨가하였다. 인비전 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서의 OD 값을 측정하고 CD40 길항 항체의 농도를 계산하였다.

[0373] 표 24 및 도 8에 제시된 결과에 따르면, 9E6-L4H2, 2F12-L4H2 및 대조 분자 CFZ533은 인간 CD40 형질전환 마우스에서 유사한 PK 특성을 갖는다.

[0374] [표 24]

[0375] hCD40 형질전환 마우스에서의 CD40 길항 항체에 대한 PK 데이터

	CFZ533	9E6-L4H2	2F12-L4H2
T1/2 (h)	214.8	226.8	257.1
C _{최대} (mg/L)	75.95	85.8	88.78
AUC _(0-d14) ((h)*(mg/L))	12655	13439	12014

[0376]

[0377] 실시예 15. 인간 FcRn에 대한 인간화 항-CD40 항체의 친화도 분석

[0378] 시험 항체를 항-인간 Fab 칩에 친화성 포획하고, 일련의 농도의 인간 FcRn 항원(아크로바이오시스템스 인크.에서 구입)을 칩 표면 위로 흐르게 하였다. 반응이 정상 상태인 반응 신호는 비아코어 장비를 사용하여 실시간으로 검출되었다. 실험에 사용된 완충액은 탈이온수로 1×(pH 7.4)로 희석한 HBS-EP + 10× 완충 용액(카탈로그 번호 BR-1006-69, GE)이었다. 정상 상태 결합 모델을 사용하여 실험에서 획득된 데이터를 정합시켜 친화도 값을 획득하였다. 표 25를 참조한다. AAYTE 돌연변이를 보유하는 항-CD40 항체는 이의 모 항체보다 인간 FcRn에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는다.

[0379] [표 25]

[0380] 인간 FcRn에 대한 인간화 항-CD40 항체의 친화도 분석

이동상	고정상	KD (M)
인간 FcRn	2F12-L4H2	2.79E-07
	2F12-L4H2-AAYTE	4.42E-08
	9E6-L4H2	2.93E-07
	9E6-L4H2-AAYTE	3.98E-08

[0381]

[0382] 실시예 16. B 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc에 AAYTE 돌연변이를 보유하는 항-CD40 항체의 억제 활성

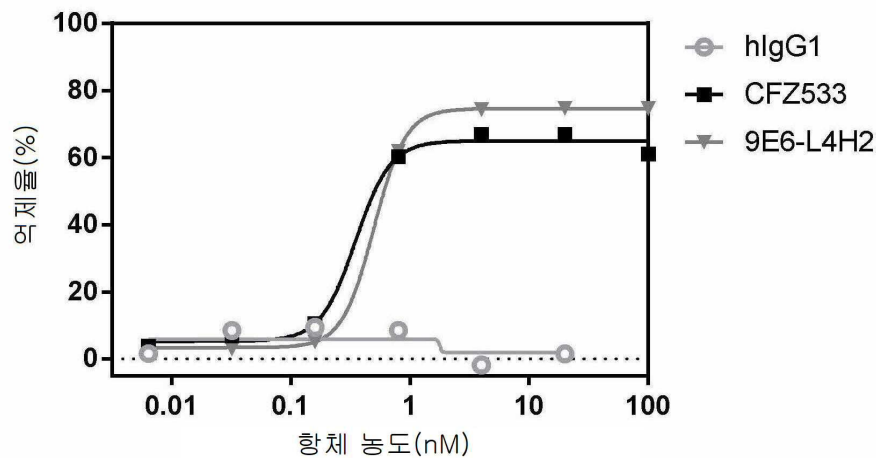
[0383] 실시예 10의 방법을 참조하여, B 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc에 AAYTE 돌연변이를 보유하는 항CD40 항체, 2F12-L4H2-AAYTE 및 9E6-L4H2-AAYTE의 억제 활성을 측정하였다. 도 9a 및 9b에 제시된 결과에 따르면, Fc-돌연변이 항-CD40 항체는 이들의 모 항-CD40 항체와 유사한 B 세포 억제 활성을 갖는다.

[0384] 실시예 17. DC 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc에 AAYTE 돌연변이를 보유하는 항-CD40 항체의 억제 활성

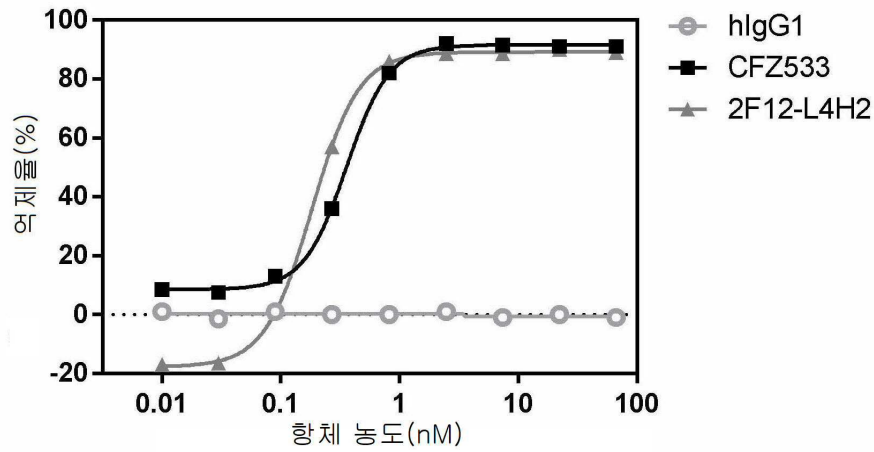
[0385] 실시예 11의 방법을 참조하여, DC 세포 활성화 분석 시스템에서 Fc에 AAYTE 돌연변이를 보유하는 항CD40 항체, 2F12-L4H2-AAYTE 및 9E6-L4H2-AAYTE의 억제 활성을 측정하였다. 도 10a 내지 10d에 제시된 결과에 따르면, Fc-돌연변이 항-CD40 항체는 이들의 모 항-CD40 항체와 유사한 DC 세포 억제 활성을 갖는다.

도면

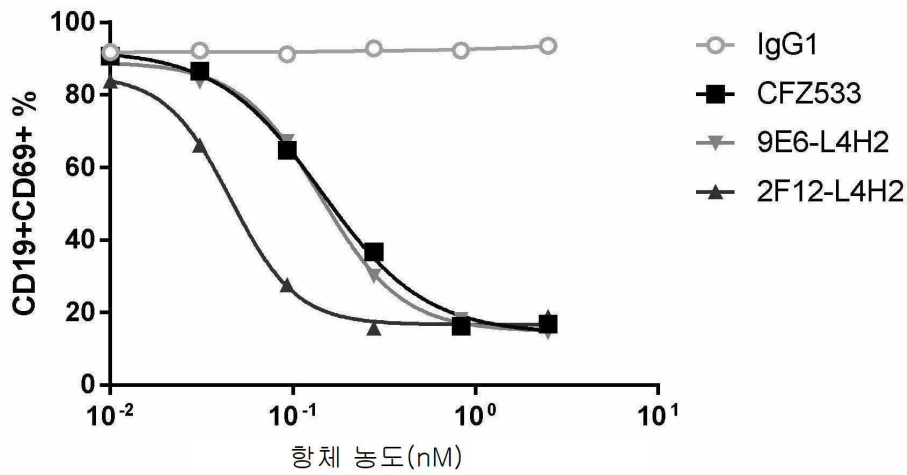
도면1a



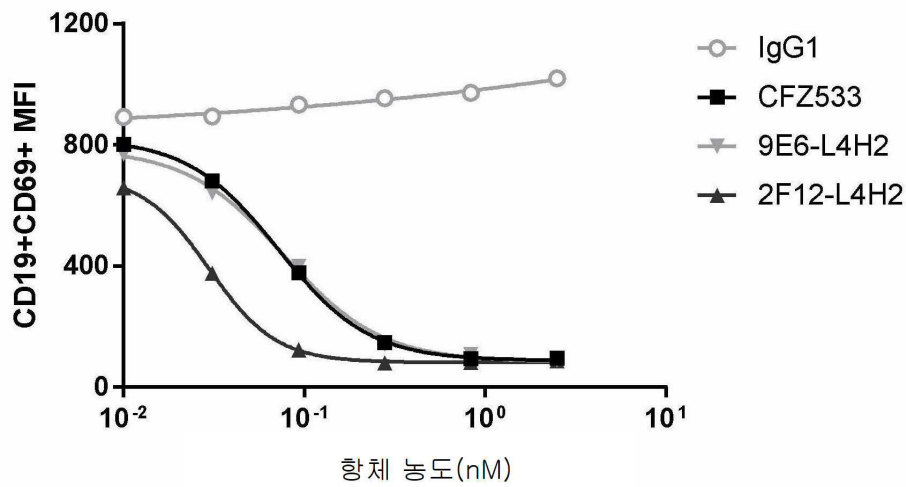
도면1b



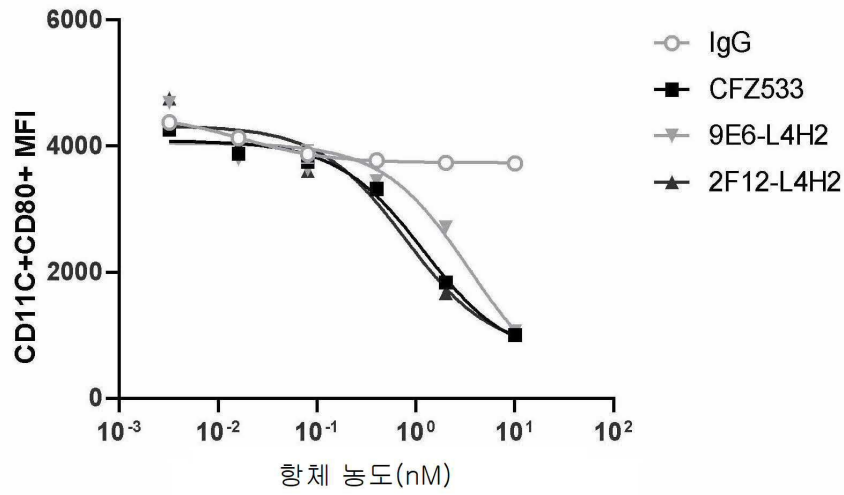
도면2a



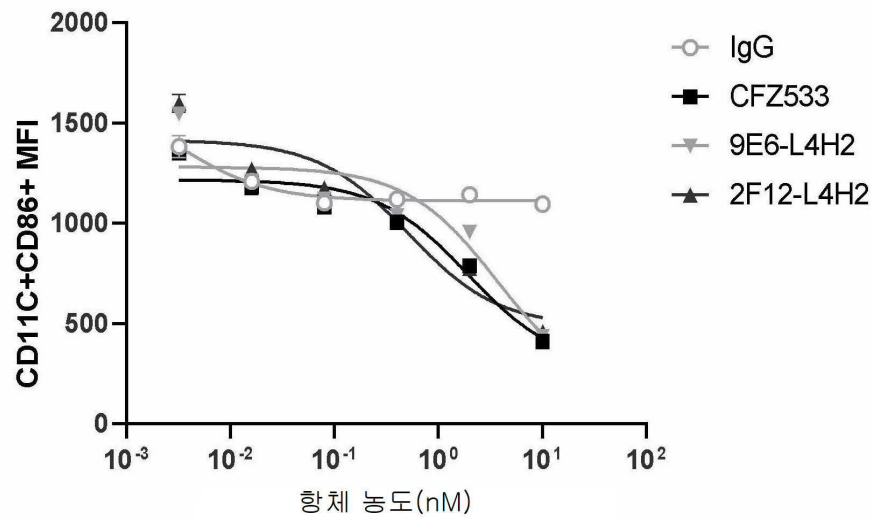
도면2b



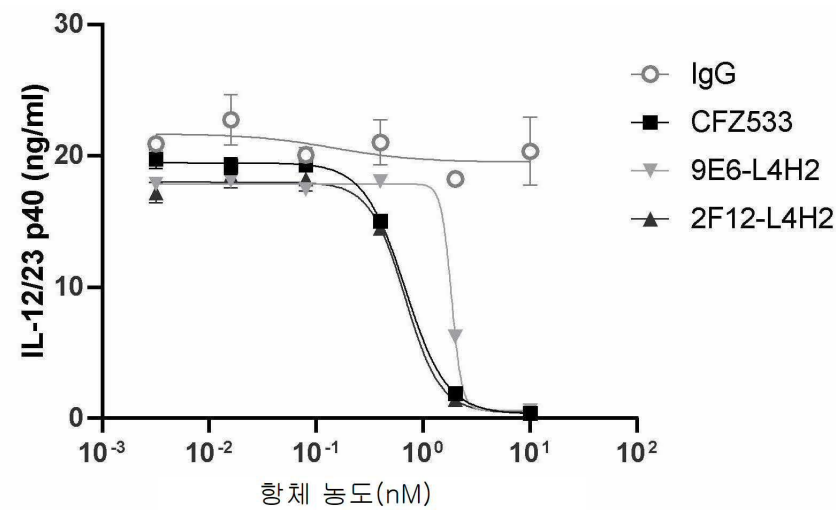
도면3a



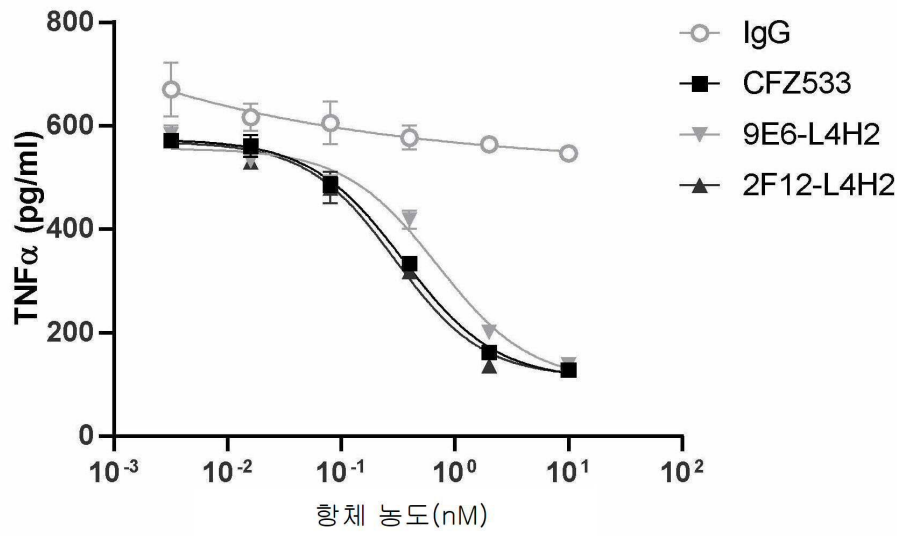
도면3b



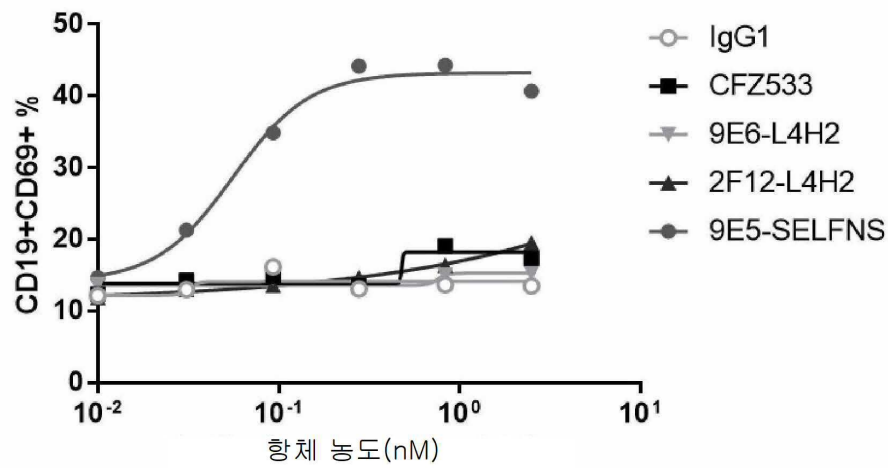
도면3c



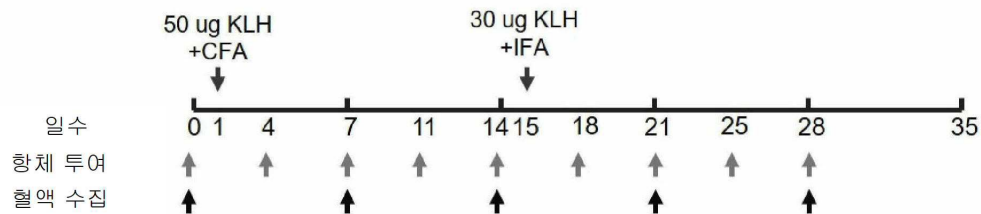
도면3d



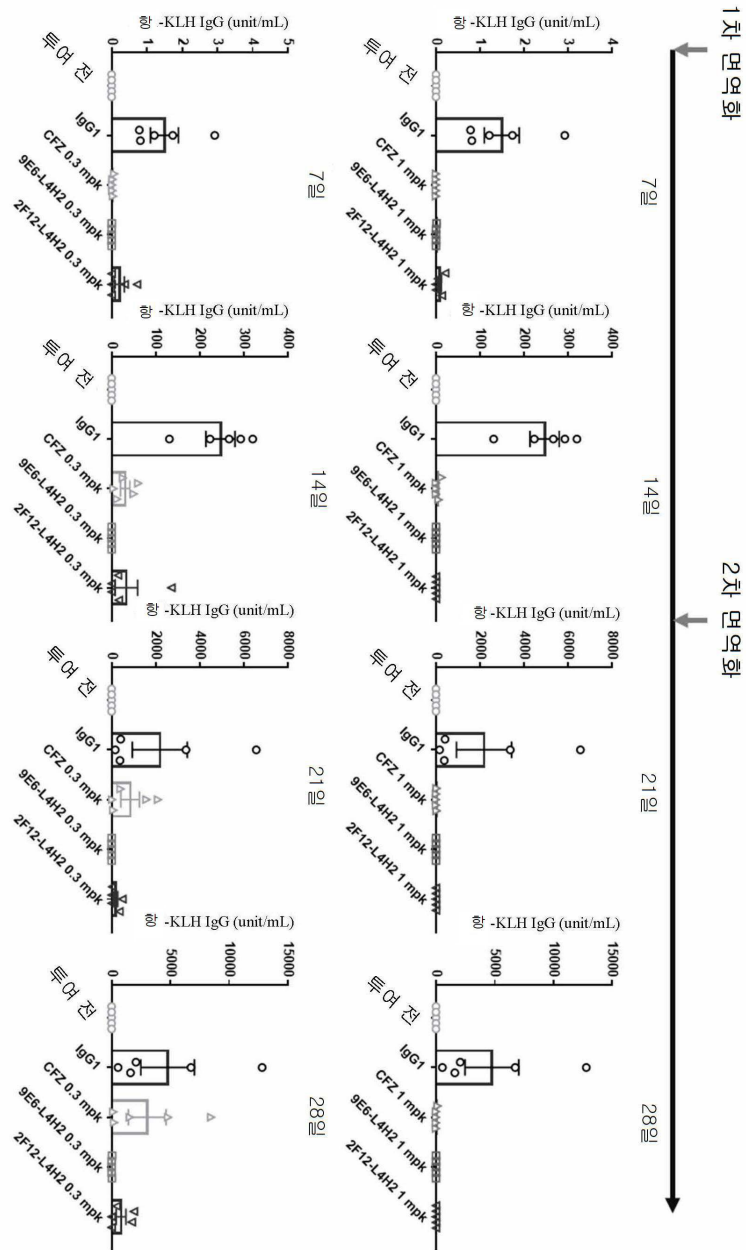
도면4



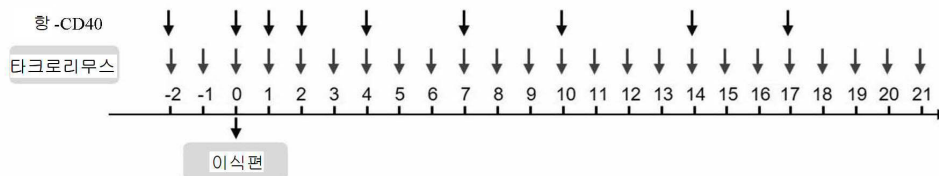
도면5a



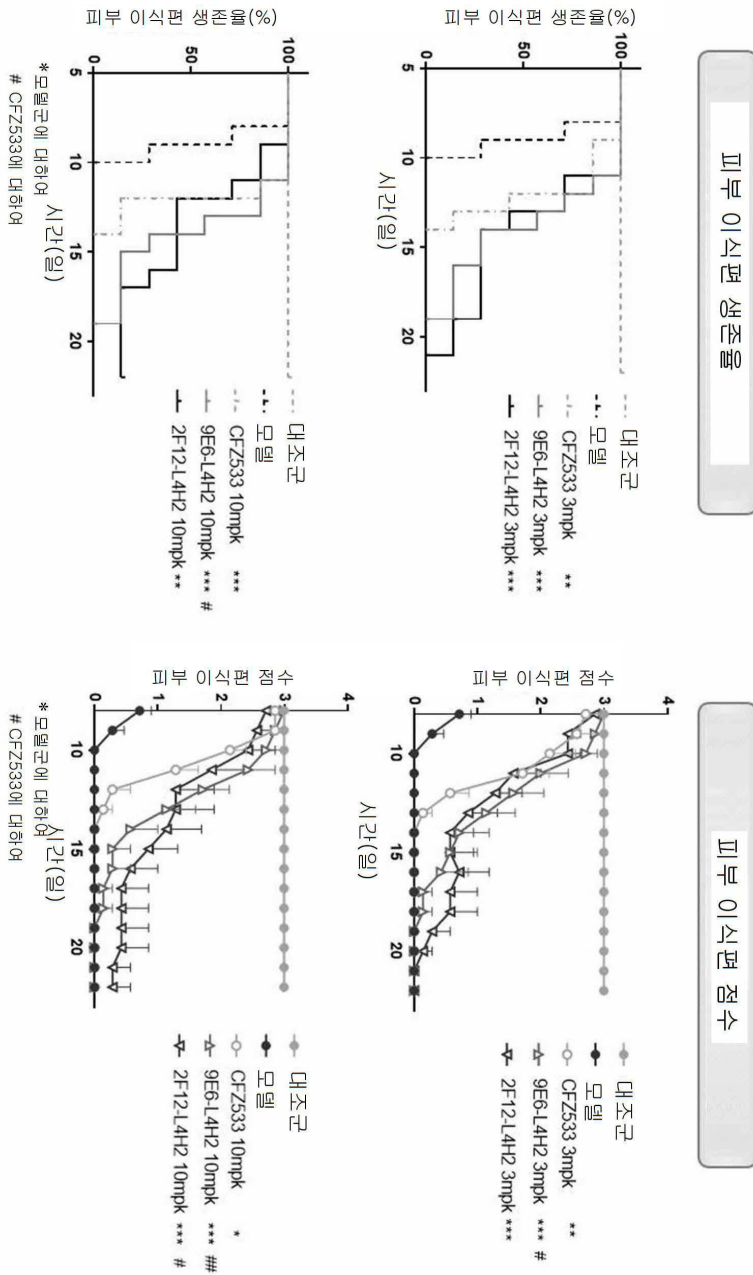
도면5b



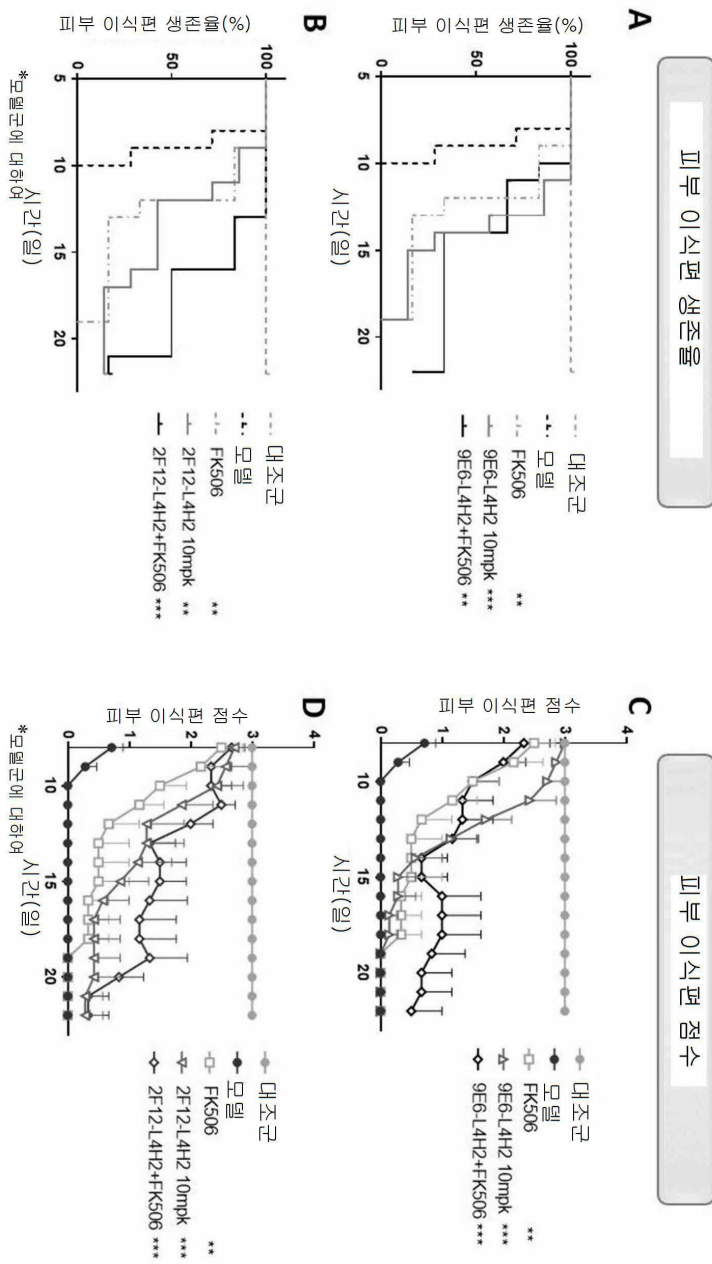
도면6a



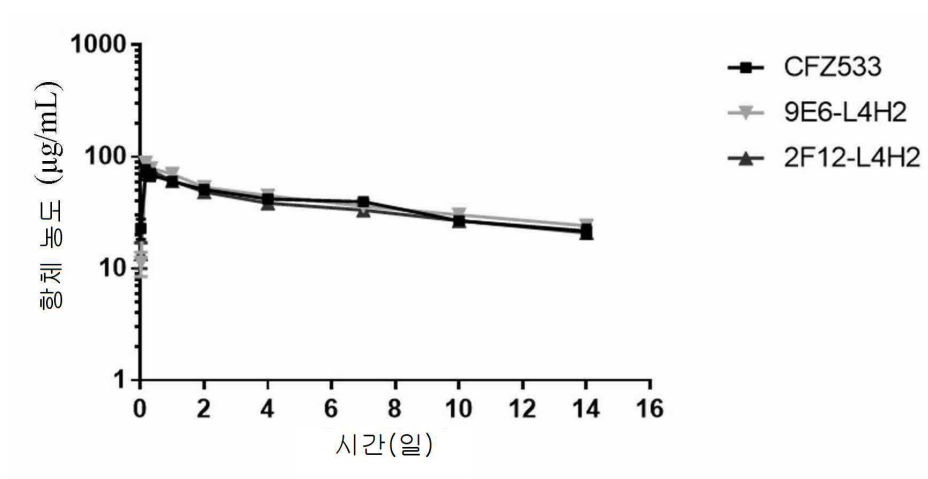
도면6b



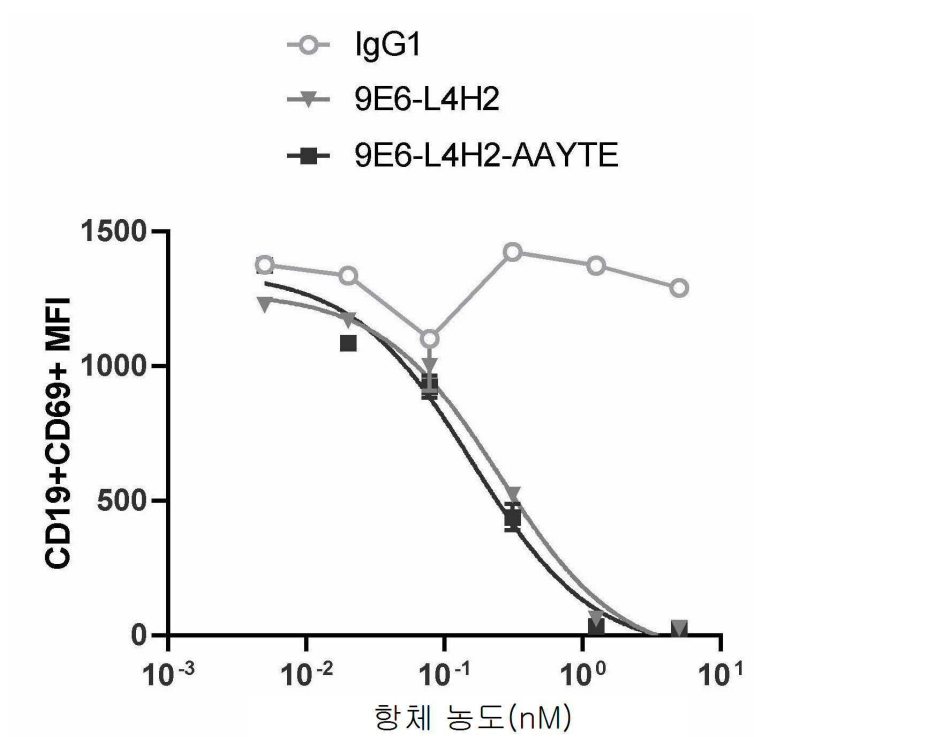
도면7



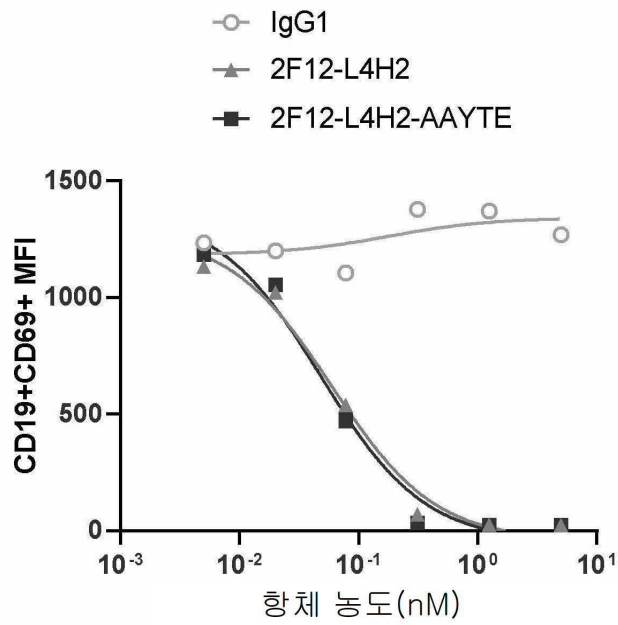
도면8



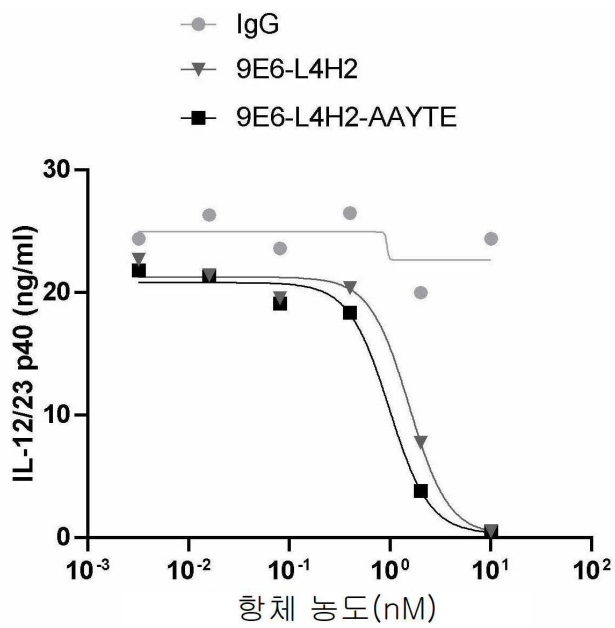
도면9a



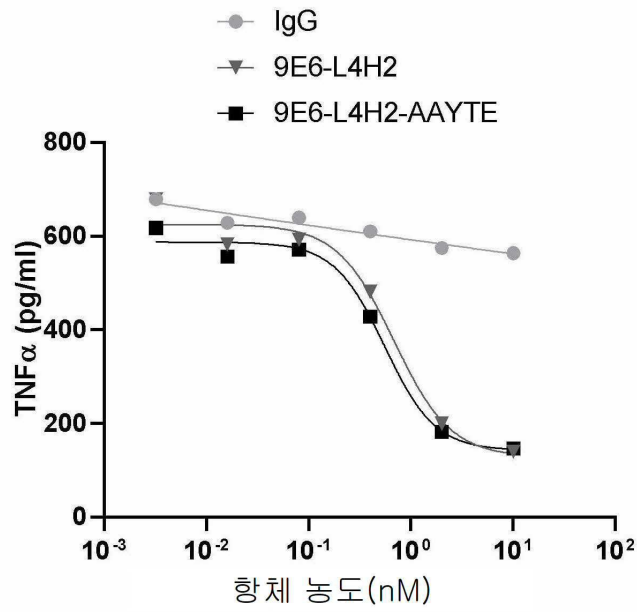
도면9b



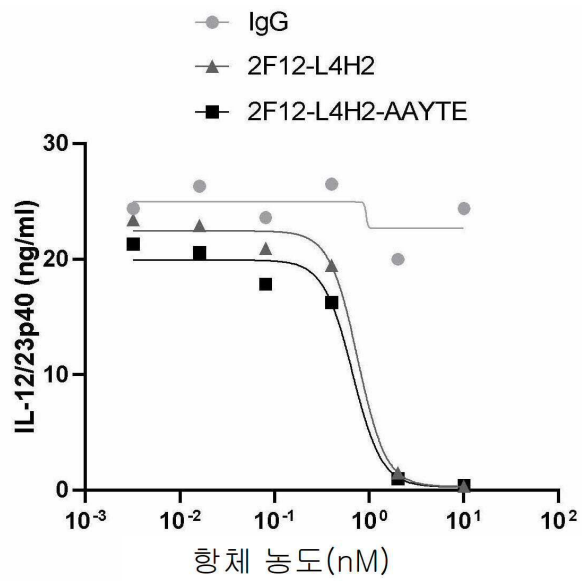
도면10a



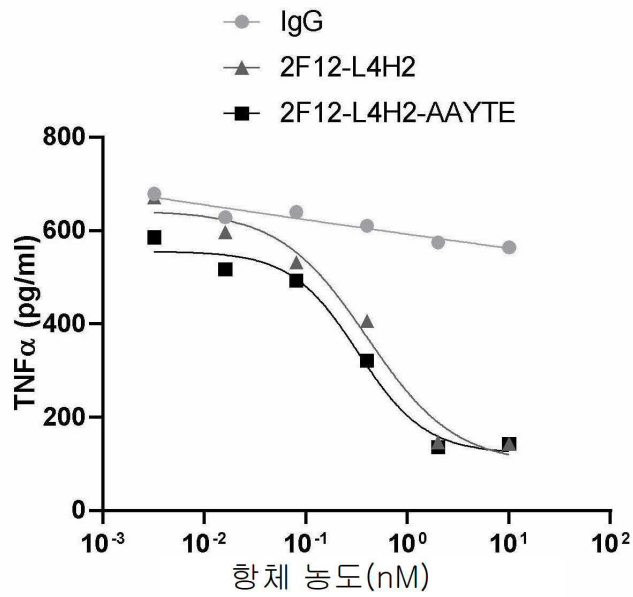
도면10b



도면10c



도면10d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.

SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> ANTI-CD40 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT AND MEDICAL USE THEREOF

<130> 722083CPCT

<140> PCT/CN2022/101780

<141> 2022-06-28

<150> CN 202110722124.0

<151> 2021-06-28

<160> 100

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 1

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Arg Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
Ala Ile Gly Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60
Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Leu Asn Thr Leu Thr Leu Lys
65 70 75 80
Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 2

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

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

65 70 75 80
Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Trp Ser Gly
85 90 95

Ile Ser Asn Phe Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
 100 105 110

Lys

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 3

Gln Ser Val Arg Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Lys Pro Thr Asp Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Ala Ile Gly Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Leu Asn Thr Val Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Met Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95

Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Phe Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu

65 70 75 80

Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser

85 90 95

Thr Ser Asn Phe Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val

100 105 110

Lys

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 5

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp

20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Leu Asn Thr Val Thr Leu Lys

65 70 75 80

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

85 90 95
Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 6

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

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

85 90 95
Thr Ser Tyr Phe Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Gln Val Val Val
100 105 110
Lys

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 7

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Ala Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Leu Asn Thr Val Thr Leu Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ile Glu Phe Ile Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asn Ser Phe Thr
85 90 95

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

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 9

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

35 40 45
Ala Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Arg Ser
50 55 60
Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Leu Asn Thr Val Thr Leu Lys
65 70 75 80
Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 10

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Thr Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys

65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr

85 90 95

Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105

<210> 11

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 11

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly

20 25 30

Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ser Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Gly Ile Ala Ser Thr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Ser

50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Leu Lys Thr Val Thr Leu Lys

65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95
Gly Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 12

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

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

<210> 13

<

211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 13

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

50 55 60
 Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Leu Lys Thr Val Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 14

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

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

Ala Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95

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

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 15

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly
20 25 30

Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Gly Ile Gly Ser Asp Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Leu Lys Thr Val Thr Leu Glu
65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400>

> 16

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

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

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 17

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Lys Asp Thr

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

65 70 75 80
 Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95

Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 18

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Met Gly

1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gly
20 25 30

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

Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ser Ile Ser Asp Leu Glu Cys

65 70 75 80
Ala Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95

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

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 19

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr

1 5 10 15

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

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95
 Gly Pro Trp Tyr Tyr Gly Gly Asp Val Ala Trp Thr Gly Ser Phe Asp
 100 105 110
 Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 20

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

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

65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Thr Gly Gly Tyr Ala Gly
 85 90 95

Pro Ile Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 21

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 21

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asn Ala
 20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Gly Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 50 55 60

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

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 85 90 95

Asp Gly Tyr Ala Gly Ser Ser Trp Gly Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Pro
 100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 22

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly His Ser Tyr Ser Ser
 85 90 95
 Ala Gly Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 23

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 25

Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 26

Gln Ser Ser Glu Asp Ile Ser Ser Asn Leu Ser

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 27

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 28

Gln Gly Gly Tyr Trp Ser Gly Ile Ser Asn Phe Gly Asn Gly

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 29

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 30

Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 31

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Asn Gly

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 32

Gln Gly Ala Tyr Trp Ser Ser Thr Ser Tyr Phe Gly Asn Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 33

Ser Tyr Gly Val Thr

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400>

35

Gly Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Ile

1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 36

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 37

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 38

Gln Ser Tyr Tyr Asn Ser Phe Thr Thr Val

1 5 10

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 39

Ser Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 40

Ala Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Arg Ser

1 5 10 15

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 41

Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Ile

1 5

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 42

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Thr Asn Gly Ile Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 43

Gln Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Thr Ile

1 5 10

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 44

Gly Ile Ala Ser Thr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Ser

1 5 10 15

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 45

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 46

Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Ser Thr Val

1 5 10

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 47

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

1 5 10 15

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 48

Gln Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser Thr Val

1 5 10

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 49

Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 50

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 51

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 52

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

1 5 10 15

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 53

Gly Pro Trp Tyr Tyr Gly Gly Asp Val Ala Trp Thr Gly Ser Phe Asp

1 5 10 15

Pro

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 54

Gln Ser Ser Gln Ser Val Ala Asn Asn Asp Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> CDR

<400> 55

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 56

Thr Gly Gly Tyr Ala Gly Pro Ile Tyr Ile

1 5 10

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 57

Arg Asn Ala Ile Ser

1 5

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 58

Gly Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser

1 5 10 15

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 59

Asp Gly Tyr Ala Gly Ser Ser Trp Gly Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Pro

1 5 10 15

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 60

Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Arg Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 61

Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR

<400> 62

Leu Gly Gly His Ser Tyr Ser Ser Ala Gly Leu Thr

1 5 10

<210> 63

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L1

<400> 63

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

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

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

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr
85 90 95

Ser Asn Phe Gly Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L2

<400> 64

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

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

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

Phe Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr

85 90 95
 Ser Asn Phe Gly Ser Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L3

<400> 65

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L4

<400> 66

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

100 105 110

<210> 67

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-H1

<400> 67

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

85 90 95
Arg Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 68

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-H2

<400> 68

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Leu Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of 9E6-L1

<400> 69

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Asn Val

1 5 10

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of 9E6-L2

<400> 70

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of 9E6-L3

<400> 71

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Thr Gly

1 5 10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of 9E6-L4

<400> 72

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Gln Gly

1 5 10

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula for LCDR3s of 9E6-Ls

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 73

Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr Ser Asn Phe Gly Xaa Xaa

1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 74

Gln Xaa Ser Glu Asp Ile Ser Ser Asn Leu Xaa

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 75

Xaa Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 76

Gln Gly Xaa Tyr Trp Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Phe Gly Xaa Xaa

1 5 10

<210> 77

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L1

<400> 77

Ala Phe 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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala 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 Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95

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

<210> 78

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L2

<400> 78

Ala Phe 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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gln Gly
20 25 30

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

Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala 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 Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95

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

<210> 79

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L3

<400> 79

Ala Phe 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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala 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 Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L4

<400> 80

Ala Phe 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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Gly

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala 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 Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser
85 90 95
Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 81

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-H1

<400> 81

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Asn Leu Lys Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-H2

<400> 82

Glu Val Thr Val Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Arg Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1 of 2F12-L1

<400> 83

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Val Leu Ala

1 5 10

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1 of 2F12-L2

<400> 84

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gln Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1 of 2F12-L3

<400> 85

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1 of 2F12-L4

<400> 86

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Gly Leu Ala

1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> General formula for LCDR1s of 2F12-Ls

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 87

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Xaa Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 88

Ser Tyr Gly Val Xaa

1 5

<210> 89

<211
> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCDR2
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (12)..(12)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 89
Xaa Ile Xaa Ser Xaa Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Xaa Trp Ala Xaa Ser
1 5 10 15
<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HCDR3
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 90

Gly Gly Ile Thr Xaa Tyr Ala Xaa

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 91

Gln Ala Ser Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 92

Gln Ser Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Thr Xaa

1 5 10

<210> 93

<211> 445

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L4H2 HC

<400> 93

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Leu Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

180 185 190

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

195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445
<210> 94
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 9E6-L4H2 LC
<400> 94
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Pro Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Trp Thr Ser Thr
85 90 95
Ser Asn Phe Gly Gln Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 95
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 2F12-L4H2 HC
<400> 95
Glu Val Thr Val Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

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

65 70 75 80
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 96

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L4H2 LC

<400> 96

Ala Phe 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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Gly

20 25 30

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

35 40 45

Val Gly Ala Ser Asn Leu Ala 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 Ser Tyr Phe Ser Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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> 97

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E6-L4H2-AAYTE HC

<400> 97

Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Arg Gly Trp Thr Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

145 150 155 160

 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 98

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2F12-L4H2-AAYTE HC

<400> 98

Glu Val Thr Val Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Gly Ile Gly Ser Asp Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Asn Leu Lys Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405

410

415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420

425

430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 99

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1-Fc(N297A)

<400> 99

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 Ala 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

 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

 <210> 100
 <211> 330
 <212>
 PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IgG1-Fc(AAYTE)
 <400> 100
 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 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu 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
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330