(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0144965
(43) 공개일자 2023년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0045920
(22) 출원일자 2023년04월07일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020220043555 2022년04월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사유한양행
서울특별시 동작구 노량진로 74 (대방동)
(72) 발명자
이은정
경기도 용인시 수지구 수지로 75, 208동 101호(상현동, 심곡마을 광교 힐스테이트)
이은정
경기도 용인시 기흥구 구성로53번길 8, 604호(마북동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

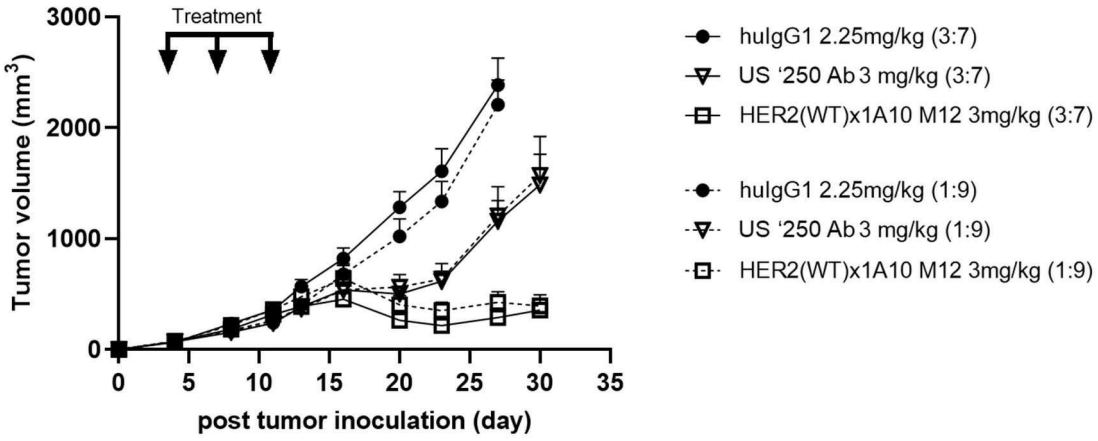
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **HER2 저발현 암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물**

(57) 요 약

항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체를 이용한 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 암의 치료 및/또는 예방용 약학적 조성물 및 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
김준환
서울특별시 용산구 이촌로87길 14, 103동 304호(이촌동, 강촌아파트)
최민지
경기도 수원시 팔달구 효원로93번길 33, 111동 106호(매교동, 힐스테이트 푸르지오 수원)
신장우
경기도 용인시 기흥구 사은로84번길 10, 104동 1302호 (보라동, 용인보라 효성해링턴플레이스)
정혜진
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 712번길 16, 2층 (삼평동)
이양순
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 712번길 16, 2층 (삼평동)
손원준
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 712번길 16, 2층 (삼평동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

(b) 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고,

상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 1, 2, 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1;

서열번호 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

서열번호 7, 8, 9, 10, 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

서열번호 16 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3

을 포함하는 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체를 포함하는,

HER2 저발현 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3; 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1; 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역; 및

서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 또는 88의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

(i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는

(ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 62, 63, 또는 64의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

항-4-1BB 항체의 항-4-1BB scFv인,

약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체는 트라스투주맙(Trastuzumab), 페르투주맙(Pertuzumab), 또는 트라스투주맙 엠탄신(Trastuzumab emtansine)(T-DM1)인 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1;

서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 73 또는 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

항-HER2 항체의 항-HER2 scFv인,

약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

항-HER2 항체의 전장 형태, 및

항-4-1BB 항체의 scFv

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

항-4-1BB 항체의 전장 형태, 및

항-HER2 항체의 scFv

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 면역 항암제를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 면역 항암제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 또는 이들의 조합인, 약학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 HER2에 특이적 결합 가능한 항-HER2 항체를 사용하는 면역조직화학법(Immunohistochemistry; IHC)으로 측정한 IHC 스코어가 0, 1+, 또는 2+인 것인, 약학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 전체 종양 세포 중 HER2를 발현하는 종양 세포의 비율이 50% 이하인 것인, 약학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 통상적인 단백질 측정 방법으로 측정한 종양 내 HER2 수준이 HCC1954 세포주보다 낮은 것인, 약학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 통상적인 단백질 측정 방법으로 측정한 종양 내 HER2 수준이 SK-BR-3 세포주 대비 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하인 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

(a) 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

(b) 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고,

상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 1, 2, 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1;

서열번호 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

서열번호 7, 8, 9, 10, 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

서열번호 16 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3

을 포함하는 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체를 포함하는,

FcγRI 발현 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3; 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1; 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역; 및

서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 또는 88의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

(i) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는

(ii) 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 62, 63, 또는 64의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

항-4-1BB 항체의 항-4-1BB scFv인,

약학적 조성물.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 항-HER2 항체는 트라스투주맙(Trastuzumab), 페르투주맙(Pertuzumab), 또는 트라스투주맙 엠탄신(Trastuzumab emtansine)(T-DM1)인 것인, 약학적 조성물.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1;

서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 29

제21항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역, 및

서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역

을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 30

제21항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

서열번호 73 또는 74의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및

서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 31

제21항에 있어서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

항-HER2 항체의 항-HER2 scFv인,

약학적 조성물.

청구항 32

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

항-HER2 항체의 전장 형태, 및

항-4-1BB 항체의 scFv

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 33

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

항-4-1BB 항체의 전장 형태, 및

항-HER2 항체의 scFv

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 34

제21항에 있어서, 상기 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체는,

서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드

를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 항-4-1BB/항-HER2 이중 특이 항체를 이용한 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 암의 치료 및/또는 예방용 약학적 조성물 및 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0003] 4-1BB 단백질은 TNF-수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF)의 구성원이며 선천 면역 세포와 적응 면역 세포 모두의 면역 세포가 활성화된 후 발현되는 공동 자극 분자이다. 4-1BB는 다양한 면역 세포의 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 4-1BB 효능제는 면역 세포의 증식과 생존, 사이토카인의 분비 및 세포용해 활성 CD8 T 세포를 향상시킨다. 다른 많은 연구에서는 4-1BB의 활성화가 마우스의 종양을 제거하기 위해 면역 반응을 향상시키는 것으로 나타났다. 따라서 4-1BB는 암 면역학에서 유망한 표적 분자임을 시사한다. 항종양 효능에도 불구하고 항-4-1BB 항체는 임상 적용에서 심각한 간 독성을 유발했다.

[0004] 한편, HER2 단백질은 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 패밀리의 구성원이며 종양과 관련된 다양한 메커니즘에 관여한다. HER2는 세포 표면에 존재하는 대표적인 수용체 티로신 키나아제(RTK)로 암세포의 증식과 침투, 혈관신생 등을 유도한다. 현재까지 개발된 HER2 타겟 치료제는 대부분 HER2를 높은 수준으로 발현하는 암에 대하여 항암 효과를 나타내며, HER2를 낮은 수준으로 발현하는 암에 대해서는 유의미한 치료 효과를 나타내지 못한다.

[0005] 따라서, 보다 효율적인 암 치료를 위해, 간 독성이 낮으면서 HER2 발현수준에 의존하지 않고 광범위한 암종에 대하여 항암 효과를 가지는 약물의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 예는 다음을 포함하는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체를 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0008] (1) HER2 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 HER2 표적화 모이어티로서의 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 및

[0009] (2) 4-1BB 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 4-1BB 표적화 모이어티로서의 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0010] 상기 암은 HER2 저발현 특성, FcγRI을 발현하는 특성, 또는 이들 모두를 가지는 암일 수 있다.

[0011] 다른 예는, 상기 이중 특이 항체의 약학적 유효량 또는 상기 약학적 조성물을 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 투여하는 단계 이전에, 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 암은 HER2 저발현 특성, FcγRI을 발현하는 특성, 또는 이들 모두를 가지는 암일 수 있다.

[0012] 다른 예는 상기 이중 특이 항체 또는 상기 약학적 조성물의 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공한다. 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다. 상기 암은 HER2 저발현 특성, FcγRI을 발현하는 특성, 또는 이들 모두를 가지는 암일 수 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 명세서는 종양 연관 항원(tumor associated antigen, TAA; HER2)에 특이적인 항체 및 4-1BB에 특이적인 항체를 포함하는 이중 특이 항체 및 이의 용도에 관한 것이다. 상기 이중 특이 항체는 HER2 고발현 종양(암)뿐만 아니라, HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암 세포에 대하여 4-1BB 신호전달을 활성화하고 면역반응을 강화시킬 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공되는 이중 특이 항체는 HER2 고발현 종양(암)은 물론이고, HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암에 항암 활성을 나타내는 면역 항암제로서 사용될 수 있다.

[0015] 본 명세서에서, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암에 대한 항암 (예방, 치료, 개선, 완화, 및/또는 경감 등) 용도가 제공되며, 상기 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0016] (1) HER2 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 HER2 표적화 모이어티로서의 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

[0017] (2) 4-1BB 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 4-1BB 표적화 모이어티로서의 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0021] **용어의 정의**

[0022] 본 명세서에서, "서열로 이루어지는", "서열로 필수적으로 이루어지는", 또는 "서열을 포함하는"은 상기 서열을 포함하는 모든 경우를 의미할 수 있지만, 상기 서열 이외의 다른 서열을 포함하는 경우를 배제하려는 것이 아니다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "서열번호로 인식되는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지는 단백질 또는 폴리펩타이드" 및 "서열번호로 인식되는 핵산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지는 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드"는, 상기 아미노산 서열 또는 핵산 서열로 필수적으로 구성되거나, 고유의 및/또는 목적하는 활성 및/또는 기능을 유지하면서, 상기 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성(identity or similarity)을 갖는 단백질(또는 폴리펩타이드) 또는 유전자(또는 폴리뉴클레오타이드)를 지칭할 수 있다.

[0024] 본원에 사용된 용어 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 다양한 광범위한 부류의 폴리펩타이드를 포괄할 수 있다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론(γ, μ, α, δ, ε)으로 분류되며 그 중 일부 하위 클래스(예: γ1-γ4)를 가지며, 또한 경쇄가 카파 또는 람다(K, λ)로 분류되는 것을 이해할 것이다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE로 결정하는 것은 이 사슬의 특성이다. 면역글로불린 서브클래스(아이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 등은 잘 특성화되어 있으며 기능적 전문화를 부여하는 것으로 알려져 있다.

[0025] 온전한 항체는 2개의 전장 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 포함하며, 여기서 각각의 경쇄는 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결될 수 있다. 항체는 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ε) 유형이며, 이들은 감마 1(γ1), 감마 2(γ2), 감마 3(γ3), 감마 4(γ4), 알파 1(α1) 또는 알파 2(α2)로 더욱 유형화될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파(κ) 또는 람다(λ) 유형일 수 있다.

[0026] 용어 "중쇄"는 항원에 특이성을 제공하기에 충분한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 V_H, 및 3개의 불변 영역인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}, 및 힌지 영역을 포함하는 전장 중쇄 또는 이의 단편을 의미할 수 있다. 용어 "경쇄"는 항원에 특이성을 제공하기에 충분한 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 V_L- 및 불변 영역 C_L을 포함하는 전장 경쇄 또는 이의 단편을 지칭할 수 있다.

[0027] 용어 "상보성 결정 영역(CDR)"는 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 초가변 영역에서 발견되는 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)을 포함할 수 있

다. CDR은 항체가 항원 또는 에피토프에 결합하는 데 중요한 역할을 하는 잔기를 제공할 수 있다. "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 인식되는"이라는 용어는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 항체와 항원이 특이적으로 상호작용하여 면역학적 활성을 유도함을 나타낸다.

[0028] 본 명세서에서, 항체는 다클론(polyclonal) 항체 또는 단일클론(monoclonal) 항체; 및/또는 인간, 인간화, 동물(예: 마우스, 토끼 등) 유래 항체, 또는 키메라 항체(예: 마우스-인간 키메라 항체)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 동물을 원하는 항원으로 면역시켜 생성된 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에게 투여될 때 면역 거부 반응을 유발할 수 있으며, 이러한 면역 거부 반응을 억제하기 위해 키메라 항체가 개발되었다. 키메라 항체는 항-아이소타입 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변영역을 유전공학적 방법을 이용하여 인간 항체의 불변영역으로 대체함으로써 형성된다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비해 항-동형 반응이 상당히 개선되었지만, 동물 유래 아미노산이 가변 영역에 여전히 존재하므로 항-이디오타입 반응으로 인한 잠재적인 부작용이 여전히 존재한다. 이러한 부작용을 개선하기 위해 개발된 것이 인간화 항체이다. 이것은 키메라 항체의 가변 영역 중 항원 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(상보성 결정 영역)을 인간 항체 프레임워크에 이식하여 제조한다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 "항원 결합 단편"은 CDR과 같은 항원에 결합할 수 있는 부분을 포함하는 완전한 면역글로불린 구조로부터 유래된 단편을 지칭한다. 예를 들어, 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)2, scFv-Fc, Fab, Fab', 또는 F(ab')2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 예를 들어 scFv, (scFv)2, scFv-Fc, Fab, Fab' 및 F(ab')2로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 상보성 결정 영역을 포함하는 항체 유래 단편일 수 있다.

[0031] 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역, 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 제1불변영역(CH1)을 갖는 구조로, 하나의 항원 결합 부위를 갖는다.

[0032] Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역을 갖는다는 점에서 Fab와 다르다. F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 이황화 결합을 통해 형성된다.

[0033] Fv는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역만을 가지는 최소 항체 조각으로, Fv 단편을 생산하는 재조합 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 2쇄 Fv는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 비공유결합으로 연결된 구조를 가질 수 있으며, 단일쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 펩타이드 링커를 통해 공유결합되거나 또는 C-말단에서 서로 직접적으로 연결된, 2쇄 Fv와 같은 다이머(dimer) 구조를 가질 수 있다.

[0034] 항원 결합 단편은 프로테아제를 사용하여 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 분해하여 Fab 단편을 얻거나, 펩신으로 분해하여 F(ab')2 단편을 얻음), 유전자 재조합 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0035] 본 명세서의 면역글로불린(예를 들어, 인간 면역글로불린) 또는 항체 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, IgY 등), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgA1, IgA2 등) 또는 면역 글로불린 분자의 하위 클래스일 수 있다.

[0036] 항체 또는 항체 단편에서, CDR 또는 가변 영역을 제외한 부분(예를 들어, 불변 영역)은 인간 항체로부터 유래될 수 있고, 특히, 이들은 예를 들어, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 또는 IgY, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4로부터 유래될 수 있다.

[0037] 항체 또는 항원 결합 단편은 화학적으로 또는 재조합적으로 합성될 수 있다(자연 발생이 아님).

[0039] **4-1BB 표적화 모이어티**

[0040] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 4-1BB 표적화 모이어티로서 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0041] CD137 또는 TNFRSF9(TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 9)라고도 하는 용어 "4-1BB"는 TNF-수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF)의 구성원이며 선천 면역 세포와 적응 면역 세포 모두의 면역 세포 활성화 후에 발현되는 공동 자극 분자이다. 4-1BB는 다양한 면역 세포의 활동을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 4-1BB는 포유동물, 예를 들어 호모 사피엔스(인간)로부터 유래될 수 있다(NCBI Accession No. NP_001552.2). 예를 들어, 인간 4-1BB 단백질(NP_001552.2)은 다음과 같이 아미노산 서열(서열번호 89)로 나타낼 수 있다:

[0042] 1 mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpcsn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr

[0043] 61 tcdicrqckg vfrtrkecss tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckqgq eltkkgckdc

[0044] 121 cfgtfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtppapare

[0045] 181 pghspqiisf flaltstall fllffltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg

[0046] 241 cscrfpeeee ggcel

[0048] 일 예에서, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다:

[0049] 서열번호 1, 2 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR(상보성 결정 영역)-H1(H-CDR1);

[0050] 서열번호 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

[0051] 서열번호 7, 8, 9, 10, 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

[0052] 서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

[0053] 서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

[0054] 서열번호 16 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3.

[0055] 항-4-1BB 항체 또는 항원 결합 단편의 CDR의 아미노산 서열은 표 1에 예시되어 있다:

표 1

[0056]

서열번호	**H-CDR1**	**서열번호**	**H-CDR2**	**서열번호**	**H-CDR3**
1	SYDMS	4	WISYSGGSIYYADSVKG	7	DGQRNSMREFDY
				8	DAQRNSMREFDY
				9	DAQRQSMREFDY
2	GYDMS	5	VIYPDDGNTYYADSVKG	10	HGGQKPTTKSSSAYGMDG
3	SYWMH	6	EINPGNGHTNYNEKFKS	11	SFTTARAFAY
서열번호	**L-CDR1**	**서열번호**	**L-CDR2**	**서열번호**	**L-CDR3**
12	SGSSSNIGNNYVT	14	ADSHRPS	16	ATWDYSLSGYV
13	RASQTISDYLH	15	YASQSIS	17	QDGHSFPPT

[0057] 예를 들어, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다:

[0058] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0059] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0060] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0061] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0062] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0063] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 9의

아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0064] 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0065] 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3;

[0066] 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3; 또는

[0067] 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3.

[0068] 또 다른 예에서, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0069] 서열번호 1, 2, 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 및 서열번호 7, 8, 9, 10, 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0070] 또 다른 예에서, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0071] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 또는 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0072] 항-4-1BB 항체 또는 항원 결합 단편의 가변 영역의 아미노산 서열은 표 2에 예시되어 있다:

표 2

[0073]

서열번호	4-1BB를 표적으로 하는 중쇄 가변영역
18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
19	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
20	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS
21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
22	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
23	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS
24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS
26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS
27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
28	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
29	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS

서열번호	4-1BB를 표적으로 하는 경쇄 가변영역
30	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL
31	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL
32	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQGTKLEIKR
33	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL
34	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL
88	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGCGTKLEIKR

[0074] 예를 들어, 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다:

[0075] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;

[0076] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;

[0077] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;

[0078] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역;

[0079] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 또는

[0080] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역.

[0081] 항-4-1BB 항체 또는 항원 결합 단편의 가변 영역의 프레임워크의 아미노산 서열은 표 3에 예시되어 있다:

표 3

[0082]

서열번호	H-FR1	서열번호	H-FR2	서열번호	H-FR3	서열번호	H-FR4
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	41	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	42	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	37	WVRQAPGKGLEWVS	43	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
36	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFS	38	WVRQAPGQGLEWIG	44	RATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	41	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	42	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	39	WVRQAPGKCLEWVS	43	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	45	WGQGTLVTVSS
36	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFS	40	WVRQAPGQCLEWIG	44	RATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	45	WGQGTLVTVSS
서열번호	**L-FR1**	**서열번호**	**L-FR2**	**서열번호**	**L-FR3**	**서열번호**	**LFR4**
46	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	53	FGGGTKLTVL
47	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	53	FGGGTKLTVL

48	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC	50	WYQQKPDQAPKLLIK	52	GIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC	54	FGQGTKLEIKR
46	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	55	FGCGTKLTVL
47	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	49	WYQQLPGTAPKLLIY	51	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	55	FGCGTKLTVL

[0083] 다른 예에서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0084] 서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄; 및 서열번호 62, 63, 또는 64의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0085] 예를 들어, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0086] 서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄; 및 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄;

[0087] 서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄; 및 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄; 또는

[0088] 서열번호 56, 57, 58, 59, 60, 또는 61의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄; 및 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0089] 다른 예에서, 상기 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함하는 scFv (단일 사슬 가변 단편)일 수 있다:

[0090] 서열번호 1, 2, 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 및 서열번호 7, 8, 9, 10, 또는 11의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및

[0091] 서열번호 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 16 또는 17의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역,

[0092] 이 때 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 임의의 순서로 직접(예컨대, 링커 없이) 또는 펩타이드 링커를 통해 서로 연결될 수 있다.

[0093] 일 예에서, 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 포함할 수 있다:

[0094] 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역; 및

[0095] 서열번호 30, 31, 32, 33, 34, 또는 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역,

[0096] 이 때 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 직접적으로 또는 펩타이드 링커를 통해 임의의 순서로 서로 연결될 수 있다.

[0097] 일 예에서, 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 포함할 수 있다:

[0098] 서열번호 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역;

[0099] 서열번호 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역; 또는

[0100] 서열번호 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역 및 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역,

[0101] 이 때 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 직접적으로 또는 펩타이드 링커를 통해 임의의 순서로 서로 연결될 수 있다.

[0102] 본 명세서에서, 항-4-1BB scFv는 임의의 순서로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함한다. 예를 들어, 항-4-

1BB scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또는, 항-4-1BB scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 일 예에서, 항-4-1BB scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 경쇄 가변영역, 펩타이드 링커 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항-4-1BB scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 중쇄 가변영역, 펩타이드 링커 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0104] **HER2 표적화 모이어티**

[0105] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 HER2 표적화 모이어티로서 항-HER2 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[0106] "HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2)"는 ERBB2 유전자에 의해 암호화되며, 표피 성장 인자 수용체(EGFR/ErbB)의 구성원이다. HER2는 세포 증식 및 분화를 조절하는 데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 세포외 성장인자에 결합하면 다른 HER 수용체와 함께 동종이량체 및/또는 이종이량체로 조립되는 경향이 강하여 여러 형태의 신호전달 경로를 활성화시켜 세포사멸, 생존 또는 세포 증식을 유도한다. 예를 들어, HER2 단백질은 각각 GenBank Accession No. NM_004448.4, NM_001005862.3 등으로 기탁된 뉴클레오타이드 서열(mRNA)에 의해 암호화되는 GenBank Accession No. NP_004439.2, NP_001005862.1 등으로 기탁된 폴리펩타이드일 수 있다.

[0107] 일 예에서, 항-HER2 항체는 트라스투주맙(Trastuzumab), 페르투주맙(Pertuzumab), 및 트라스투주맙 엠탄신(Trastuzumab emtansine)(T-DM1)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0108] HER2를 항원으로 인식하는 항-HER2 항체의 항원 결합 영역은 트라스투주맙, 페르투주맙, 및 트라스투주맙 엠탄신으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-HER2 항체의 scFv, (scFv)2, Fab, Fab' 또는 F(ab')2일 수 있다.

[0109] 상기 항-HER2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 트라스투주맙, 페르투주맙 또는 트라스투주맙 엠탄신의 6개 CDR을 포함하는 항-HER2 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0110] 일 예에서, 항-HER2 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 트라스투주맙 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0111] 예를 들어, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함할 수 있다:

[0112] 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1;

[0113] 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2;

[0114] 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3;

[0115] 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1;

[0116] 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2; 및

[0117] 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3.

[0118] 항-HER2 항체 또는 항원-결합 단편의 CDR의 아미노산 서열은 표 4에 예시되어 있다:

표 4

[0119]

서열번호	VH_CDR1	서열번호	VH_CDR2	서열번호	VH_CDR3
65	DTYIH	66	RIYPTNGYTRYADSVKG	67	WGGDGFYAMDY
서열번호	**L-CDR1**	**서열번호**	**L-CDR2**	**서열번호**	**L-CDR3**
68	RASQDVNTAVA	69	SASFLYS	70	QQHYTTPPT

[0120] 다른 예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0121] 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 L-

CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0122] 다른 예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0123] 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0124] 항-HER2 항체 또는 항원-결합 단편의 가변 영역의 아미노산 서열은 표 5에 예시되어 있다:

표 5

[0125]

서열번호	HER2을 표적으로 하는 중쇄 가변영역
71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS
서열번호	HER2을 표적으로 하는 경쇄 가변영역
72	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR

[0126] 다른 예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,

[0127] 서열번호 73 또는 74의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄; 및 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0128] 다른 예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함하는 scFv (단일 사슬 가변 단편)일 수 있다:

[0129] 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR1, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 H-CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및

[0130] 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR1, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR2, 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 L-CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역,

[0131] 이 때 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 임의의 순서로 직접(예컨대, 링커 없이) 또는 펩타이드 링커를 통해 서로 연결될 수 있다.

[0132] 다른 예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함하는 scFv (단일 사슬 가변 단편)일 수 있다:

[0133] 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 중쇄 가변영역; 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 필수적으로 이루어지는 경쇄 가변영역,

[0134] 이 때 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 직접적으로 또는 펩타이드 링커를 통해 임의의 순서로 서로 연결될 수 있다.

[0135] 본 명세서에서, 항-HER2 scFv는 임의의 순서로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항-HER2 scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또는, 항-HER2 scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 일 예에서, 항-HER2 scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 경쇄 가변영역, 펩타이드 링커 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항-HER2 scFv는 N-말단에서 C-말단 방향으로 중쇄 가변영역, 펩타이드 링커 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0137] 이중 특이 항체

[0138] 본 명세서는 다음을 포함하는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체를 제공한다:

[0139] (1) HER2 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 HER2 표적화 모이어티로서의 항-HER2 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

[0140] (2) 4-1BB 단백질을 특이적으로 인식 및/또는 결합할 수 있는 4-1BB 표적화 모이어티로서의 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

[0141] 상기 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 HER2-발현 종양 세포에 의해 가교된 경우에만 4-1BB 신호전달을 활성화할 수 있다. 또한, 이중 특이 항체에 포함된 항-4-1BB 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 종양 미세환경(TME)에서만 국소화 및/또는 활성화되고, 및/또는 기존의 항-4-1BB 항체와 비교하여 면역 반응 향상 및/또는 종양 치료의 효능을 유지하면서, 간 독성을 상당히 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0142] 일 예에서, 이중 특이 항체는 전장 항-HER2 항체 및 항-4-1BB 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함할 수 있고, 상기 항-4-1BB 항체의 항원-결합 단편은 직접적으로 또는 펩타이드 링커를 통해 전장 항-HER2 항체의 N-말단, C-말단, 또는 이들 모두에 연결될 수 있다. 다른 예에서, 상기 이중 특이 항체는 전장 항-4-1BB 항체 및 항-HER2 항체의 항원-결합 단편(예를 들어, scFv)을 포함할 수 있고, 상기 항-HER2 항체의 항원-결합 단편은 전장 항-4-1BB 항체의 N-말단, C-말단, 또는 이들 모두에 직접 또는 펩타이드 링커를 통해 연결될 수 있다.

[0143] 일 예에서, 이중 특이 항체에 함유된 scFv는 임의의 순서로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중 특이 항체에 포함된 scFv는 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있으며, 선택적으로 이들 사이에 펩타이드 링커를 포함할 수 있거나, 또는 이중 특이 항체에 포함된 scFv는 N-말단에서 C-말단으로의 방향으로 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역, 및 선택적으로 이들 사이에 펩타이드 링커를 포함할 수 있다.

[0145] 상기 이중 특이 항체가 전장 항-HER2 항체 및 항-4-1BB scFv를 포함하는 경우, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0146] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0147] 항-HER2 항체의 중쇄,

[0148] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0149] 항-4-1BB scFv; 및

[0150] (ii) 항-HER2 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0151] 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0152] 항-4-1BB 항체의 경쇄 가변영역,

[0153] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0154] 항-4-1BB 항체의 중쇄 가변영역.

[0155] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0156] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0157] 항-4-1BB scFv;

[0158] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0159] 항-HER2 항체의 중쇄; 및

[0160] (ii) 항-HER2 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0161] 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0162] 항-4-1BB 항체의 경쇄 가변영역,

[0163] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0164] 항-4-1BB 항체의 중쇄 가변영역.

[0165] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0166] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0167] 항-HER2 항체의 중쇄;

[0168] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0169] 항-4-1BB scFv; 및

[0170] (ii) 항-HER2 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0171] 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0172] 항-4-1BB 항체의 중쇄 가변영역,

[0173] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0174] 항-4-1BB 항체의 경쇄 가변영역.

[0175] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0176] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0177] 항-4-1BB scFv;

[0178] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0179] 항-HER2 항체의 중쇄; 및

[0180] (ii) 항-HER2 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0181] 상기 항-4-1BB scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0182] 항-4-1BB 항체의 중쇄 가변영역,

[0183] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0184] 항-4-1BB 항체의 경쇄 가변영역.

[0186] 상기 이중 특이 항체가 전장 항-4-1BB 항체 및 항-HER2 scFv를 포함하는 경우, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0187] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0188] 항-4-1BB 항체의 중쇄,

[0189] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0190] 항-HER2 scFv; 및

[0191] (ii) 항-4-1BB 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0192] 상기 항-HER2 scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0193] 항-HER2 항체의 경쇄 가변영역,

[0194] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0195] 항-HER2 항체의 중쇄 가변영역.

[0196] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0197] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0198] 항-HER2 scFv;

[0199] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0200] 항-4-1BB 항체의 중쇄; 및

[0201] (ii) 항-4-1BB 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0202] 상기 항-HER2 scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0203] 항-HER2 항체의 경쇄 가변영역,

[0204] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0205] 항-HER2 항체의 중쇄 가변영역.

[0206] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0207] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0208] 항-4-1BB 항체의 중쇄,

[0209] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0210] 항-HER2 scFv; 및

[0211] (ii) 항-4-1BB 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0212] 상기 항-HER2 scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0213] 항-HER2 항체의 중쇄 가변영역,

[0214] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0215] 항-HER2 항체의 경쇄 가변영역.

[0216] 또는, 상기 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0217] (i) 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함하는 제1 폴리펩타이드:

[0218] 항-HER2 scFv,

[0219] 선택적으로, 펩타이드 링커(제1 펩타이드 링커), 및

[0220] 항-4-1BB 항체의 중쇄; 및

[0221] (ii) 항-4-1BB 항체의 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩타이드,

[0222] 상기 항-HER2 scFv는 다음을 N-말단에서 C-말단 방향으로 포함할 수 있다:

[0223] 항-HER2 항체의 중쇄 가변영역,

[0224] 선택적으로, 펩타이드 링커(제2 펩타이드 링커), 및

[0225] 항-HER2 항체의 경쇄 가변영역.

[0227] 제1 펩타이드 링커 및 제2 펩타이드 링커는 이중 특이 항체에 독립적으로 존재하거나 존재하지 않을 수 있으며, 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0228] 일 예에서, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0229] (i) 서열번호 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 또는 84의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

[0230] (ii) 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드.

[0231] 예를 들어, 상기 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 다음을 포함할 수 있다:

[0232] (i) 서열번호 83의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및

[0233] (ii) 서열번호 75의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드.

[0234] 다른 예에서, 이중 특이 항체에 포함된 HER2 표적화 모이어티 및 4-1BB 표적화 모이어티 모두는 전장 항체, 또는 중쇄 CDR, 경쇄 CDR, 또는 이들의 조합을 포함하는 항원 결합 단편일 수 있으며, 펩타이드 링커를 통해 또는 직접적으로 서로 연결될 수 있다.

[0235] 각각의 항체가 4-1BB(예: 인간 4-1BB) 및 HER2(예: 인간 HER2) 모두에 결합할 수 있다는 점을 감안할 때, 본 명

세서의 CDR 서열, 또는 VH(중쇄 가변영역) 및 VL(경쇄 가변영역) 서열은 다른 항-HER2/항-4-1BB 결합 이중 특이 분자를 생성하기 위해 "혼합 및 매칭"될 수 있다.

[0237] 펩타이드 링커

[0238] 항체의 고순도를 위해, 이중 특이 항체는 제1 폴리펩타이드의 중쇄와 scFv 사이(제1 펩타이드 링커), 및/또는 scFv의 중쇄 및 경쇄 가변영역 사이(제2 펩타이드 링커)에 펩타이드 링커를 포함할 수 있다.

[0239] 본 명세서에서, 용어 "펩타이드 링커"는 1 내지 100개의 아미노산, 특히 2 내지 50개의 아미노산을 포함하는 올리고펩타이드를 의미할 수 있으며, 이들 각각은 제한 없이 모든 종류의 아미노산일 수 있다. 임의의 통상적인 펩타이드 링커는 특정 목적에 따르기 위해 적절한 변형과 함께 또는 변형 없이 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 펩타이드 링커는 예를 들어 Gly, Asn 및/또는 Ser 잔기를 포함할 수 있고, 및/또는 Thr 및/또는 Ala와 같은 중성 아미노산을 포함할 수 있다. 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 서열은 공지되어 있을 수 있다. 관련 기술에서. 펩타이드 링커의 길이는 폴리펩타이드 및/또는 scFv의 기능이 영향을 받지 않는 한도 내에서 적절하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 링커는 총 약 1 내지 약 100개의 아미노산, 약 2 내지 약 50개의 아미노산, 또는 약 5 내지 약 25개(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개) 아미노산으로 형성될 수 있으며, 이들 각각은 Gly, Asn, Ser, Thr, 및 Ala로 이루어지는 군에서 독립적으로 선택된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 펩타이드 링커는 $(G_mS_l)_n$ (m, l, 및 n은 각각 "G", "S" 및 "(G_mS_l)"의 개수이며, 각각 독립적으로 약 1 내지 약 10, 특히, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 정수로부터 선택될 수 있다.)로 표현될 수 있다. 일 구현예에서, 펩타이드 링커는 (GGGGS)2 (서열번호 90), (GGGGS)3 (서열번호 85), (GGGGS)4 (서열번호 87), 또는 (GS)9 (서열번호 87)의 펩타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0241] 의약 용도

[0242] 이중 특이 항체의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 의약 용도가 제공된다.

[0243] 보다 구체적으로, 본 발명은 상기 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물은 면역 항암제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 함께 포함되거나, 병용투여용으로 제제화된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제가 하나의 제제로 제제화된 것일 수 있고, 또는 상기 이중 특이 항체와 면역항암제가 각각 제제화된 후 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 약학 조성물은 암의 예방 및/또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0244] 다른 예는 상기 이중 특이 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 면역 항암제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 함께 포함되거나, 병용투여용으로 제제화된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제가 하나의 제제로 제제화된 것일 수 있고, 또는 상기 이중 특이 항체와 면역항암제가 각각 제제화된 후 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0245] 다른 예는 상기 이중 특이 항체 또는 상기 약학 조성물의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 투여하는 단계 이전에 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상을 확인하는 방법을 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 상기 대상에게 면역 항암제의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 이중 특이 항체의 투여 단계와 면역 항암제의 투여 단계는 순서에 상관없이 순차적으로 수행되거나 동시에 수행될 수 있다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 하나의 제제로 제제화되어 투여되는 것일 수 있고, 각각 제제화된 후 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 면역 항암제는 상기 이중 특이 항체와 함께 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0246] 다른 예는 상기 이중 특이 항체 또는 상기 약학 조성물의 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공

한다. 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 약학 조성물의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[0247] 다른 예는 상기 이중 특이 항체 및 면역 항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및/또는 치료를 위한 병용투여용 약학 조성물을 제공한다. 상기 병용투여용 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 함께 포함되거나, 병용투여용으로 제제화된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제가 하나의 제제로 제제화된 것일 수 있고, 또는 상기 이중 특이 항체와 면역항암제가 각각 제제화된 후 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0248] 다른 예는 상기 이중 특이 항체의 약학적 유효량 및 면역 항암제의 약학적 유효량을 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다. 상기 방법에서, 상기 이중 특이 항체의 약학적 유효량 및 면역 항암제의 약학적 유효량은 동시에 또는 순서와 상관없이 연속적으로 투여될 수 있다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 하나의 제제로 제제화되어 투여되는 것일 수 있고, 각각 제제화된 후 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 면역 항암제는 상기 이중 특이 항체와 함께 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0249] 다른 예는 상기 이중 특이 항체 및 면역 항암제의 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공한다. 다른 예는 상기 이중 특이 항체 및 면역 항암제의 암의 예방 및/또는 치료를 위한 약학 조성물의 제조를 위한 용도를 제공한다. 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제는 융합 단백질 또는 다중 특이 항체(예컨대, 삼중 특이 항체 또는 사중 특이 항체 등)의 형태로 함께 포함되거나, 병용투여용으로 제제화된 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제가 하나의 제제로 제제화된 것일 수 있고, 또는 상기 이중 특이 항체와 면역 항암제가 각각 제제화된 후 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0251] 본 명세서에서, 상기 면역 항암제는 면역체계 활성화, 예컨대, 면역관문억제에 의하여 항암 효과를 발휘하는 모든 약물 중에서 선택된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 면역 항암제는 PD-1, PD-L1, TIGIT, 4-1BB, OX40, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, GITR, GITRL, ICOS, ICOSL, VISTA 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 활성 (예컨대, 각각의 결합 단백질(예, 리간드 등)과의 상호작용 등)을 저해하는 제제 (예컨대, 항체 등)일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 면역 항암제는 PD-1과 PD-L1의 상호작용을 저해하는 제제일 수 있으며, 예컨대, PD-1을 표적으로 하는 제제(PD-1 억제제), PD-L1을 표적으로 하는 제제(PD-L1 억제제), 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PD-1을 표적으로 하는 제제는 PD-1에 결합하는 (예컨대, 특이적으로 결합하는) 단백질 (예컨대, 항체, 항체의 항원결합단편, 항체 유사체 등), 핵산 분자 (예컨대, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA 등), 소분자 화합물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 PD-L1을 표적으로 하는 제제는 PD-L1에 결합하는 (예컨대, 특이적으로 결합하는) 단백질 (예컨대, 항체, 항체의 항원결합단편, 항체 유사체 등), 핵산 분자 (예컨대, 압타머, siRNA, shRNA, microRNA 등), 소분자 화합물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0252] 일 구체예에서, 상기 면역 항암제는 PD-1 억제제 (예컨대, 항-PD-1 항체, 이의 항원결합단편 등) 및 PD-L1 억제제 (예컨대, 항-PD-L1 항체, 이의 항원결합 단편 등)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0253] 예컨대, 상기 PD-1 억제제는 항-PD-1 항체 또는 이의 항원결합단편일 수 있고, 상기 항-PD-1 항체는 펨브롤리주맙 (pembrolizumab), 니볼루맙 (nivolumab), 세미플리맙 (cemiplimab), 도스타리맙 (dostarlimab) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원결합단편일 수 있고, 상기 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맙 (atezolizumab), 두발루맙 (durvalumab), 아벨루맙 (avelumab) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0255] 상기 암은 HER2 저발현, FcγRI 발현, 또는 이들 모두의 특성을 가지는 암일 수 있다. 예를 들어, 상기 암은 HER2 저발현 암일 수 있다.

[0256] 본 명세서에서, 'HER2 저발현 암'이라 함은, 당업자에게 HER2 저발현 암으로 인식되는 것이면 특별히 제한은 없으나, 넓은 의미로, 종양 전체로 보아 HER2 발현율이 일정 수준 이하인 모든 경우를 포괄하는 것으로 해석될

수 있다. 예를 들어, HER2를 낮은 수준으로 발현, 종양 내에서 HER2를 발현하는 세포의 비율이 낮음, 또는 HER2를 발현하지 않음 (HER2 미발현)을 의미하는 것일 수 있다. 다른 예에서, 'HER2 저발현 종양(암)'이 협의로 해석되는 경우, HER2를 낮은 수준으로 발현하거나 또는 종양 내에서 HER2를 발현하는 세포의 비율이 낮은 것으로 해석될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0257] 일 예에서, HER2 저발현 암은 다음 중 선택된 하나 이상에 해당하는 경우를 의미할 수 있다:

[0258] (1) HER2에 특이적 결합 가능한 항-HER2 항체를 사용하는 면역조직화학법으로 측정한 IHC 스코어가 0, 1+, 또는 2+인 경우;

[0259] (2) 통상적인 단백질 측정 방법으로 측정한 종양 내 HER2 수준이 SK-BR-3 세포주 (예컨대, HTB-30 (ATCC)) 대비 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하인 경우 (하한값은 0% 또는 0%를 초과하는 수치일 수 있음);

[0260] (3) 통상적인 단백질 측정 방법으로 측정한 종양 내 HER2 수준이 HCC1954 세포주 (예컨대, CRL-2338 (ATCC))보다 낮은 경우 (하한값은 0 또는 0을 초과하는 수치일 수 있음); 및

[0261] (4) 상기 암을 구성하는 전체 종양 세포 중 HER2를 발현하는 종양 세포의 비율이, 세포 개수, 세포 부피, 또는 세포 중량 기준으로, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 또는 30% 이하 (하한값은 0% 또는 0%를 초과하는 수치일 수 있음)인 경우.

[0262] 다른 예에서, 'HER2 저발현 암'은 (i) 면역조직화학법에 의해 HER2 발현이 2+로 판정되고, ISH법(in situ hybridization)에 의해 HER2 발현이 음성으로 판정된 암, 또는 (ii) 면역조직화학법에 의해 HER2 발현이 1+로 판정된 암일 수 있다. ISH법에는 FISH(fluorescence in situ hybridization) 또는 DISH(dual in situ hybridization) 등이 포함될 수 있다. 면역조직화학법에 의한 HER2 발현도의 판정 방법이나, ISH법에 의한 HER2 발현의 양성 또는 음성의 판정 방법은 당업자에게 인식되는 것이면 특별히 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들어, ASCO/CAP 가이드라인 또는 NCCN 가이드라인 등에 따른 판정 방법이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 예에서, 'HER2 저발현 암'은 차세대염기서열분석법(Next Generation Sequencing, NGS)에 의해 당업자에게 HER2 저발현 암으로 인식되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0263] 일 예에서, HER2 저발현 암은 암을 구성하는 전체 종양 세포 중 HER2를 발현하는 종양 세포의 비율이, 세포 개수, 세포 부피, 또는 세포 중량 기준으로, 0.05 내지 50%, 0.5 내지 50%, 1 내지 50%, 5 내지 50%, 10 내지 50%, 0.05 내지 40%, 0.5 내지 40%, 1 내지 40%, 5 내지 40%, 10 내지 40%, 0.05 내지 30%, 0.5 내지 30%, 1 내지 30%, 5 내지 30%, 또는 10 내지 30%인 경우를 의미할 수 있다.

[0264] 상기 통상적인 단백질 측정 방법은 측정하고자 하는 단백질 (예컨대, HER2)에 특이적으로 결합하는 화합물, 항체, 압타머 등을 이용하는 통상적인 효소 반응, 형광, 발광 및/또는 방사선 검출을 통한 측정일 수 있으며, 구체적으로, 면역조직화학법, ISH법, 면역크로마토그래피(Immunochromatography), 효소결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay: ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay: RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay: EIA), 형광면역분석(Fluorescence immunoassay: FIA), 발광면역분석(luminescence immunoassay: LIA), 웨스턴블라팅(Western blotting), 마이크로어레이법 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0265] 상기 FcγRI는 Fc 감마 수용체 I (Fc gamma receptor I)을 의미하는 것으로 CD64라고도 칭해진다. FcγRI 발현 암은 FcγRI를 발현하는 세포 (예컨대, 종양 내 침투된 면역세포)를 포함하는 모든 종류의 암을 의미할 수 있다.

[0266] 본 명세서에서 제공되는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 HER2 고발현 암에서뿐만 아니라, HER2 저발현 암에 대한 항암 활성을 가지며, FcγRI 발현 암에서 4-1BB 활성화 및/또는 면역 반응 유도 활성이 우수하여, HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암에 대한 항암 효과가 우수한 것을 특징으로 한다.

[0267] 이중 특이 항체 또는 약학 조성물에 의해 예방 및/또는 치료될 수 있는 암은 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암일 수 있다. 상기 암은 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 고형암 및 혈액암 중에서 선택될 수 있다. 상기 암은, HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지고, 유방암, 대장암, 위암, 폐암 (예컨대, 폐암의 편평상피암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐선암), 복막암, 피부암, 편평세포암, 피부나 안구의 흑색종, 직장암, 항문근처암, 식도암, 소장종양, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구성 림프종, 간암, 위장관암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 방광암,

간세포 선종, 자궁내막암 또는 자궁암, 타액선 종양, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 담도암, 담낭암 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 암일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 암은 원발성 암, 전이성 암, 또는 재발성 암일 수 있다.

[0268] 본 명세서에서 용어 "암의 예방 및/또는 치료"는 암세포의 사멸, 암세포 증식의 억제, 암과 관련된 증상의 완화, 암의 전이 억제, 암의 재발 억제 등을 의미할 수 있다.

[0269] 본 명세서에서 용어 "면역 반응의 증진"은 4-1BB 신호 활성화, 4-1BB 유도 신호 활성화와 같은 4-1BB와 관련된 면역 반응의 향상 또는 강화 (예컨대, 4-1BB 유도 NF-kB 신호 활성화, 사이토카인 방출 증가, T 세포와 같은 면역 세포에 의한 표적 세포 사멸 등) 등을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 예에서, 본 명세서에 의해 제공되는 이중 특이 항체에 의한 면역 반응 증진은 HER2의 존재 하에 발생할 수 있다.

[0270] 상기 약학 조성물은 이중 특이 항체를 유효성분으로 추가로 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제는 항체의 제형화에 일반적으로 사용되는 것들 중에서 선택되는 모든 것일 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 담체는 유당, 덱스트로스, 자당, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아검, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미정질셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 미네랄 오일을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0271] 상기 약학 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미료, 향미증진제, 유화제, 현탁제, 방부제 등으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있다.

[0272] 상기 이중 특이 항체 또는 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 대상에게 투여될 수 있다. 비경구 투여는 정맥 주사, 피하 주사, 근육 주사, 복강 주사, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 또는 직장 투여일 수 있다. 경구투여는 단백질이나 펩타이드의 소화로 이어지기 때문에 경구투여용 조성물의 유효성분은 위에서 소화를 방지하기 위해 코팅되거나 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 성분이 표적 세포(예를 들어, 암세포)에 전달될 수 있게 하는 임의의 장치를 사용하여 투여될 수 있다.

[0273] 본 명세서에서 용어 "약학적 유효량"은 활성 성분인 이중 특이 항체 및/또는 면역 항암제가 암의 예방 또는 치료에 약학적으로 의미 있는 효과를 발휘할 수 있는 양을 의미할 수 있다. 이중 특이 항체 및/또는 면역 항암제의 약학적 유효량, 또는 이중 특이 항체의 양으로 표시되는 약학 조성물의 적절한 투여량은 연령, 체중, 성별, 병리학적 상태, 식이, 배설 속도 및/또는 환자의 반응 민감도, 제형 유형, 투여 시간, 투여 경로, 투여 방식 등의 다양한 인자에 따라 다양하게 처방될 수 있다. 예를 들어, 이중 특이 항체(및/또는 면역 항암제)의 약학적 유효량 또는 약학적 조성물의 적합한 투여량은 성인의 경우 하루에 약 0.001 내지 약 1000 mg(이중 특이 항체의 양)/kg(체중), 약 0.01 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 0.1 내지 약 50 mg/kg일 수 있다.

[0274] 이중 특이 항체 및/또는 면역 항암제, 또는 약학적 조성물이 투여되는 대상은 포유동물, 예를 들어, 인간, 원숭이, 랫트, 마우스, 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 랫트, 마우스, 말, 소, 암소 등, 또는 이들로부터 수득된 세포 또는 조직을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 상기 대상은 암을 앓고 있는 것일 수 있다.

[0275] 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 함께 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 수행할 수 있는 방법에 의해 단위 또는 다중 제형으로 제형화될 수 있다. 제형은 유상 또는 수성 매질, 현탁액, 시럽, 유화액, 추출물, 산제, 과립제, 정제 또는 캡슐제일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0277] 본 명세서에서 제공되는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 HER2 고발현 암뿐 아니라, HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암 세포에 대하여 4-1BB 신호전달을 활성화하고 면역 반응을 강화시킬 수 있다. 따라서, 상기 이중 특이 항체는 HER2 저발현 및/또는 FcγRI 발현 특성을 가지는 암에 항암 활성을 나타내는 면역 항암제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0279] 도 1a는 ELISA로 측정한 항-4-1BB 항체의 항원(인간 4-1BB) 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 1b는 FACS로 측정한 항-4-1BB 항체의 4-1BB 발현 세포 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 2a는 ELISA로 측정한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항원(인간 HER2) 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 2b는 ELISA로 측정한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항원(인간 HER2) 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3a는 ELISA로 측정한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항원(인간 4-1BB) 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3b는 ELISA로 측정한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항원(인간 4-1BB) 결합 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 FcγRI 발현 세포에서의 4-1BB 활성화 유도 효능을 나타낸 그래프이다.

도 5a는 HER2 저발현 종양세포(JIMT-1)에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 ADCC(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5b는 HER2 저발현 종양세포(MDA-MB-231)에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 ADCC(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 HER2 저발현 종양에 대한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항암 효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 HER2 저발현 종양에 대한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체와 PD-1 억제제의 병용 투여에 의한 항암 효과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0280] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다.

[0281] 하기 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이며 본 발명을 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0283] **실시예 1. 항-4-1BB 항체**

[0284] **1.1 4-1BB에 대한 완전한 인간 단일클론 항체의 제조**

[0285] 전장 IgG 형태의 완전한 인간 단일클론 항-4-1BB 항체를 4-1BB에 대한 파지 라이브러리(KBio Health에서 입수) 면역튜브 패닝으로 스크리닝하였다. 표적 분자에 대한 파지 라이브러리의 패닝을 위해, 4-1BB(NCBI Accession No. NP_001552.2) 코팅된 면역튜브를 사용하여 총 4회의 패닝을 수행하였다.

[0286] 3회 패닝의 결과물로부터의 박테리아 콜로니를 96 딥웰 플레이트의 SB-카르베니실린(Biomatik cat# A2311-5g)에서 탁해질 때까지 성장시켰으며, 이 시점에서 10^{11} pfu의 VCSM13 헬퍼 파지(K-Bio Health)를 각 웰에 첨가하였다. 37 ℃에서 1시간 동안 부드럽게 흔들면서 감염시킨 후 (80 rpm), 70 μg/mL의 카나마이신을 첨가하고 세포를 200 rpm에서 진탕하면서 30 ℃에서 밤새 배양하였다.

[0287] 다음 날, 플레이트를 원심분리하고 파지를 함유하는 상청액을 PBST (Tween 20을 포함하는 인산염 완충 식염수) 중 3%(v/v) BSA (소 혈청 알부민)로 차단된 4-1BB 항원 코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하였다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고 항 M13 항체(Sino Biological cat#11973-MM05)를 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 배양하고, PBST로 3회 세척하고, 테트라메틸벤지딘(TMB)을 사용하여 결합 활성을 측정하였다.

[0288] 4-1BB 특이적 결합제는 플라스미드 DNA 시퀀싱을 위해 증폭되었다. 경쇄 및 중쇄 가변영역(VL 및 VH) 서열은 표 6 내지 표 13 (밑줄: CDR1, CDR2 및 CDR3, 순서대로)에 나타낸 바와 같이 고유한 서열을 확인하고 서열 다양성을 결정하기 위해 분석되었다.

표 6

[0289]

1A10	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 56)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 18)
H-CDR1	SYDMS (서열번호: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (서열번호: 4)
H-CDR3	DGQRNSMREFDY (서열번호: 7)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 62)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 7

[0290]

1A10 M4	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 57)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 19)
H-CDR1	SYDMS (서열번호: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (서열번호: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (서열번호: 8)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 62)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 8

[0291]

1A10 M11	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 58)

Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 20)
H-CDR1	SYDMS (서열번호: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (서열번호: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (서열번호: 9)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 62)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 9

[0292]

1A10 M12	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 57)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 19)
H-CDR1	SYDMS (서열번호: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (서열번호: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (서열번호: 8)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 63)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 10

[0293]

1A10 M13	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 58)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 20)
H-CDR1	SYDMS (서열번호: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (서열번호: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (서열번호: 9)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 63)

Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 11

[0294]

1A12	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 59)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (서열번호: 21)
H-CDR1	GYDMS (서열번호: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (서열번호: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (서열번호: 10)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 62)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 12

[0295]

1A12 M1	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 60)
Heavy Chain Variable Region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (서열번호: 22)
H-CDR1	GYDMS (서열번호: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (서열번호: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (서열번호: 10)
Light Chain	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (서열번호: 63)
Light Chain Variable Region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL (서열번호: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (서열번호: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (서열번호: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (서열번호: 16)

표 13

[0296]

AB41	Amino acid sequence (N' →C')
Heavy Chain	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호: 61)
Heavy Chain Variable Region (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS (서열번호: 23)
H-CDR1	SYWMH (서열번호: 3)
H-CDR2	EINPGNGHTNYNEKFKS (서열번호: 6)
H-CDR3	SFTTARAFAY (서열번호: 11)
Light Chain	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSL EAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 64)
Light Chain Variable Region (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSL EAEDAATYYCQDGHSFPPTFGQGTKLEIKR (서열번호: 32)
L-CDR1	RASQTISDYLH (서열번호: 13)
L-CDR2	YASQSIS (서열번호: 15)
L-CDR3	QDGHSFPPT (서열번호: 17)

[0297] **1.2. 4-1BB에 대한 scFv 항체의 제조**

[0298] (N')-VL-링커-VH-(C')의 구조를 갖는 항-4-1BB scFv 항체는 실시예 1.1의 표 6 내지 13에 나타낸 4-1BB에 대한 완전한 인간 단일클론 항체의 가변 영역을 사용하여 제조하였다. 여기서 중쇄 가변영역의 44번째 아미노산 잔기 "G"가 "C"로 치환되고, 경쇄 가변영역의 103번째 아미노산 잔기 "G"가 "C"로 치환되었다. scFv에서 "G"에서 "C"로의 이러한 아미노산 치환은 scFv를 하나의 표적-특이적 부분으로 포함하는 이중 특이 항체의 안정성 증가에 기여할 수 있다. 제조된 항-4-1BB scFv의 아미노산 서열을 하기 표 14 내지 19에 나타내었으며, 당업자라면 하기 실시예에서 (GGGGS)2 (서열번호 90), (GGGGS)3 (서열번호 85), (GGGGS)4 (서열번호 87), 또는 (GS)9 (서열번호 86)와 같은 다양한 타입의 펩타이드 링커를 적용하는 것을 포함하여, 특정한 목적을 충족시키기 위해 아미노산 서열의 변화 또는 변형을 적용할 수 있다.

표 14

[0299]

1A10 (scFv)	Amino acid sequence (N' →C')
Light chain variable region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
Heavy chain variable region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 24)

표 15

[0300]

1A10 M4 (scFv)	Amino acid sequence (N' →C')
Light chain variable region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호:87)
Heavy chain variable region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 25)

표 16

[0301]

1A10 M12 (scFv)	Amino acid sequence (N'→C')
Light chain variable region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
Heavy chain variable region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 25)

표 17

[0302]

1A12 (scFv)	Amino acid sequence (N'→C')
Light chain variable region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
Heavy chain variable region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (서열번호: 27)

표 18

[0303]

1A12 M1 (scFv)	Amino acid sequence (N'→C')
Light chain variable region (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
Heavy chain variable region (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (서열번호: 28)

표 19

[0304]

AB41 (scFv)	Amino acid sequence (N'→C')
Light chain variable region (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGCGTKLEIKR (서열번호: 88)
Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
Heavy chain variable region (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCLEWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFTTARAFAYWGQGTLVTVSS (서열번호: 29)

[0305] **1.3. 인간 4-1BB에 대한 항-4-1BB 항체(전장 IgG 형태)의 항원 결합 능력**

[0306] **(1) ELISA로 측정한 항원 결합 활성**

[0307] 항원 결합 활성을 평가하기 위하여 실시예 1.1에서 제조된 항체 후보 물질을 ELISA 시험하였다. 간략하게, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 내 인간 4-1BB-Fc 단백질(Sino Biological) 0.1 μg/ml로 코팅하고 4 ℃에서 밤새 100 μl/웰로 코팅한 다음 5%(v/v) BSA의 100 μl/웰(well)로 차단하였다.

[0308] 10 μg/ml에서 시작하는 인간화 항체(1A10, 1A12, 및 AB41)의 5배 희석액을 각 웰에 첨가하고 실온(RT)에서 1-2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 다음, HRP(Horse Radish Peroxidase)(Thermo)와 접합된 염소-항-인간 IgG 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 TMB 기질로 현상하고 OD 450-630nm에서 분광광도계로 분석하였다.

[0309] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-4-1BB 항체는 4-1BB 결합 활성을 나타내었다.

[0311] **(2) FACS에 의해 측정된 세포 결합 활성**

[0312] 세포 결합 활성을 평가하기 위해, 형광 활성화 세포 분류(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해 인간 4-1BB에 대한 항체 후보의 결합을 분석하였다. 간략하게, 표면에 인간 4-1BB를 발현하는 GloResponse™ NF κB-luc2/4-1BB Jurkat 세포주(Promega; 3x10^5 of cells)를 항체(1A10 및 1A12, 각각 10 μg/mL)와 함께 인큐베이션하였다. FACS 완충액(PBS 내 1%(v/v) BSA)으로 세척한 후, FITC-항-인간 IgG 항체(Sigma, F9512, 농도: 2.0 mg/ml)를 각 웰에 첨가하고 4 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. FITC의 평균 형광 강도(MFI)는 FACSCalibur(BD Biosciences)에 의해 측정되었다.

[0313] 그 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-4-1BB 항체는 인간 세포 표면에 발현되는 4-1BB에 효율적인 결합 활성을 나타내었다.

[0315] **실시예 2. 항-HER2 항체의 제조**

[0316] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 HER2 표적화 모이어티로서, trastuzumab(Genentech; 이하 "HER2(WT)", DrugBank Accession No. DB00072; 인간 IgG1 Kappa 단일클론 항체) 또는 이의 scFv와 같은 항원 결합 단편이 사용되었다.

[0317] HER2(WT)의 서열을 하기 표 20에 요약하였다.

[0318] 이중 특이 항체에 포함된 항-HER2 항체의 불변 영역은 인간 IgG1에 하나 이상의 돌연변이 또는 변화를 도입함으로써 변형될 수 있으며, 하나의 예시적인 실시양태, HER2(NA 또는 N297A)는 하기 표 20에 제시되어 있다:

표 20

[0319]

HER2(WT)	Amino acid sequence (N'→C')
Heavy Chain	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 73)
Light Chain	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)
HER2(NA) (N297A)	Amino acid sequence (N'→C')
Heavy Chain	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**A**STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
Light Chain	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

[0320] **실시예 3. 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 제조**

[0321] 다양한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체 후보가 전장 IgG(항-HER2 항체)-scFv(항-4-1BB 항체) 형식 또는 전장 IgG(항-4-1BB 항체)-scFv(항-HER2 항체) 형태로 제조되었다. 본 실시예에서는 실시예 2 및 실시예 1.2에서 각각 제조된 항-HER2 IgG 및 4-1BB scFv 클론을 예시적으로 선택하여, IgG-scFv 융합 형태의 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(한 항원의 scFv 항체 단편이 다른 항원의 IgG의 C-말단에 융합됨)를 제조하였다. HER2 표적화 모이어티가 전체 IgG 부분에 위치할 경우 ADCC가 감소된 돌연변이 골격을 갖는 IgG1(N297A 돌연변이; Cancer Cell, vol.19, issue 1, pp.101-113 등)을 사용하고 4-1BB 표적화 모이어티가 전체 IgG 부분에 위치하는 경우 IgG4를

사용하였다.

[0322] pcDNA 3.4(Invitrogen, A14697; 플라스미드 1)에 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 IgG 항체의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 가지는 DNA 분절 1을 삽입하고, pcDNA 3.4(Invitrogen, A14697; 플라스미드 2)에 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 IgG 항체의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 가지는 DNA 분절 2를 삽입하였다. 이후, (GGGGS)3(서열번호 85)으로 구성된 15개 아미노산 길이의 펩타이드 링커를 코딩하는 DNA 분절 4 또는 (GS)9(서열번호 86)로 구성된 18개 아미노산 길이의 펩타이드 링커를 코딩하는 DNA 세그먼트 5를 사용하여, 플라스미드 1에 삽입된 IgG 항체의 Fc 영역의 c-말단에 해당하는 DNA 분절 1의 일부에 scFv를 코딩하는 DNA 세그먼트 3을 융합하여, 이중 특이 항체의 발현을 위한 벡터를 제조하였다. 또한, scFv를 안정화하기 위해 실시예 1.2에 기재된 바와 같이 경쇄의 C-말단 및 중쇄의 C-말단에 각각 VL103-VH44 (VL103: 103번 위치에 G→C 돌연변이를 갖는 VL; VH44: 44번 위치의 G→C 돌연변이를 갖는 VH)를 융합하는 이황화 가교를 생성하도록 추가 변형을 적용하였다.

[0323] 제조된 이중 특이 항체 중 몇몇 예시적인 이중 특이 항체를 제조하는데 사용된 중쇄, 경쇄, scFv 및 DNA 절편의 서열은 표 21 내지 29에 예시되어 있다. 개선된 안정성 및 효능, 감소된 면역원성 등을 위해 아미노산 서열에서 하나 이상의 점 돌연변이가 아래 제시된 항체에 적용될 수 있다.

표 21

[0324]

HER2 (NA)x1A10 bispecific antibody-1			Amino acid sequence (N'→C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 85)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 24)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCS GSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 76)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 22

[0325]

HER2 (NA)x1A10 bispecific antibody-2			Amino acid sequence (N'→C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 24)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTI SCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 77)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 23

[0326]

HER2 (NA)x1A10 M4 bispecific antibody			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVS S (서열번호: 25)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASG TPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 78)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 24

[0327]

HER2 (NA)x1A10 M12 bispecific antibody			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVS S (서열번호: 25)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASG TPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 79)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 25

[0328]

HER2 (NA)x1A12 bispecific antibody-1			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 85)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQG TLVTVSS (서열번호: 27)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPG RRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTV SS (서열번호: 80)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 26

[0329]

HER2 (NA)x1A12 bispecific antibody-2			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 33)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQG TLVTVSS (서열번호: 27)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASG TPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTL VTVSS (서열번호: 81)
Light component	Light chain of a anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 27

[0330]

HER2 (NA)x1A12 M1 bispecific antibody			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 74)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQG TLVTVSS (서열번호: 28)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASG TPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTL VTVSS (서열번호: 82)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 28

[0331]

HER2 (WT)x1A10 M12 bispecific antibody			Amino acid sequence (N' →C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 73)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVS S (서열번호: 25)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASG TPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSA SLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS (서열번호: 83)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

표 29

[0332]

HER2 (WT)x1A12 M1 bispecific antibody			Amino acid sequence (N'→C')
Heavy component	① Heavy chain of anti-HER2 antibody		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 73)
	② Linker		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (서열번호: 86)
	③ scFv of anti-4-1BB antibody	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (서열번호: 34)
		Linker	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (서열번호: 87)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVT VSS (서열번호: 28)
	Heavy component (①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSN IGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA TWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS (서열번호: 84)
Light component	Light chain of anti-HER2 antibody		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호: 75)

[0333] **실시예 4. 이중 특이 항체(BsAbs)의 결합 친화도 시험**

[0334] **4.1. 인간 HER2에 결합**

[0335] 이중 특이 항체의 HER2 결합 친화성은 실시예 1.3(1)을 참조하여 ELISA로 수행하였다.

[0336] 간략히, 96-웰 마이크로타이터 플레이트(Nunc-Immuno Plates, NUNC)를 PBS 중 1 μg/ml, 100 μl/웰의 인간 HER2-His 단백질(Sino Biological, 10001-H08B)로 4 ℃에서 밤새 코팅하고, 그 다음 37 ℃에서 2시간 동안 차단 완충액(200 μl/웰의 1% BSA(PBS 중 소 혈청 알부민(Gibco, 30063572)))으로 차단하였다. 실시예 3에서 제조된 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체 및 대조군으로서 항-HER2 항체(HER2(NA))의 연속 희석액(0.1 μM부터 시작)을 각 웰에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% Tween20으로 세척하고 HRP-접합 Fab 항체(Pierce, 31414)와 함께 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 TMB(Tetramethylbenzidine, Sigma, T0440) 기질로 현상하고 OD 450-650nm에서 분광광도계로 분석하였다.

[0337] 그 결과, 도 2a 및 2b에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 대조군 항-HER2 항체(NA)의 것과 유사한 정도로, 높은 친화도로 인간 HER2 단백질에 결합할 수 있음을 확인하였다.

[0339] **4.2. 인간 4-1BB에 대한 결합 친화도_ELISA 측정**

[0340] 이중 특이 항체의 4-1BB 결합 친화성은 실시예 1.3(1)을 참조하여 ELISA에 의해 수행하였다. 간략히, 96-웰 미세역가 플레이트(Nunc-Immuno Plates, NUNC)를 4 ℃에서 밤새 PBS 중 1 μg/ml, 100 μl/웰로 인간 4-1BB-His 단백질(Sino Biological, 10041-H08H)로 코팅하였다. 37 ℃에서 2시간 동안 차단 완충액(PBS 중 1%(v/v) BSA (소 혈청 알부민(Gibco, 30063572))의 200 μl/웰)으로 차단 완충액으로 차단하였다. 실시예 3에서 제조된 항-

HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체 및 대조군으로서 항-HER2 항체(HER2(NA))의 연속 희석액(0.1 μM부터 시작)을 각 웰에 첨가하고 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% Tween20으로 세척하고 HRP-접합 Fab 항체(Pierce, 31414)와 함께 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 TMB 기질로 현상하고 OD 450-650 nm에서 분광광도계로 분석하였다.

[0341] 그 결과, 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 높은 친화도로 인간 4-1BB 단백질에 결합할 수 있는 반면, 항-HER2 항체는 인간 4-1BB 단백질에 결합하지 않음을 확인하였다.

[0343] 도 2a, 2b, 3a 및 3b의 결과를 정량화하고 하기 표 30에 요약하였다:

표 30

[0344]

EC50 (nM)	HER2	4-1BB
HER2(NA)	0.134	N/A
HER2(WT)x1A10 M12	0.159	0.027
HER2(NA)x1A10	0.135	0.033
HER2(NA)x1A10 M4	0.148	0.025
HER2(NA)x1A10 M12	0.161	0.031
HER2(WT)x1A12 M1	0.174	0.051
HER2(NA)x1A12	0.148	0.043
HER2(NA)x1A12 M1	0.143	0.048

[0345] 표 30에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 높은 친화도로 인간 HER2 및 인간 4-1BB 단백질 모두에 결합할 수 있음을 확인하였다.

[0347] **4.3. 다양한 세포 표면 발현 인간 HER2에 대한 결합**

[0348] 이중 특이 항체의 표면에 HER2를 발현하는 다양한 세포에 대한 결합 친화도는 실시예 1.3(2)를 참조하여 FACS 분석에 의해 수행하였다.

[0349] 아래 표 31에 열거된 다양한 종양 세포주가 사용되었다. 각 세포주를 분리하고 PBS로 세척한 후 세포의 수를 세어 $2x10^5$개 세포/100 μl FACS 완충액으로 설정한 다음 항-HER2 항체 또는 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체를 10 μg/mL로 처리하고, 4 ℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 세포를 FACS 완충액으로 세척한 후 FITC 표지된 불변영역(Fc) 특이적 항체(Goat anti-human IgG FITC conjugate, Fc specific, Sigma, F9512, 농도: 2.0 mg/ml)를 2 μl/$2x10^5$개 세포/100 μl FACS buffer에 현탁시키고, 4 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, FACSCalibur 장치를 사용하여 분석하였다. 음성대조군은 FITC로 표지된 불변영역(Fc) 특이적 항체만을 처리하였다. 암세포주 중 HER2의 발현 정도를 비교하기 위해 실험군의 피크 이동 결과 값을 음성 대조군의 피크 이동 결과 값으로 나누었다.

[0350] 얻어진 결과를 하기 표 31에 나타내었다:

표 31

[0351] MFI (mean fluorescence intensity) ratio

Cell line			Anti-HER2	HER2x1A10	HER2x1A12
NCI-N87	Gastric	ATCC, CRL-5822	104	139	145
BT-474	Breast	ATCC, HTB-20	81	102	90
Calu-3	Lung	ATCC, HTB-55	74	82	82
HCC1954	Breast	ATCC, CRL-2338	32	40	42
JIMT1	Breast	DSMZ, ACC 589	26	27	25
HT29	Colon	ATCC, HTB-38	6.1	6.0	7.4
MCF-7	Breast	ATCC, HTB-22	5.2	4.9	5.8
MDA-MB231	Breast	ATCC, HTB-26	1.2	1.4	1.6
H929	MM	ATCC, CRL-9068	0.9	1.4	1.4

Jurkat	ALL	ATCC, TIB-152	1.0	1.3	1.6

[0352] (MFI Ratio: MFI of 1st Ab / MFI of 2nd Ab)

[0353] 표 31에 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 세포 표면 발현 인간 HER2 단백질에 결합할 수 있음을 확인하였다.

[0355] **4.4. 4-1BB에 대한 결합 친화도_SPR 측정**

[0356] SPR 실험에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체는 플로우 셀 2, 3 및 4에서 개별적으로 캡처되었고, 플로우 셀 1은 참조로 유지하고, Biocore® 시리즈 S 센서 칩 CM5(GE Healthcare, BR100530)에서 항-인간 Fab 항체(GE Healthcare, 28958325)가 아민 커플링에 의해 고정되었다. 재조합 인간 4-1BB 단백질(ACROBiosystems, 41B-H5227)은 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 및 0.78 nM의 농도로 칩을 가로질러 30 μl/분으로 300초 동안 흘렸으며, 400초의 해리 단계가 뒤따랐다. 10 mM Glycine-HCl(pH 2.0)(GE Healthcare, BR100355)을 사용하여 재생을 수행하였다.

[0357] 얻어진 결과를 하기 표 32에 나타내었다.

표 32

[0358]

Antibody	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
HER2(WT)x1A10 M12	2.11E-09	2.55E+05	5.38E-04
HER2(NA)x1A10 M12	2.35E-09	2.69E+05	6.33E-04
HER2(WT)x1A12 M1	1.24E-08	6.57E+04	8.11E-04
HER2(NA)x1A12 M1	1.38E-08	6.74E+04	9.27E-04

[0359] 표 32에 나타낸 바와 같이, 시험된 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체들은 높은 4-1BB 결합 친화성을 나타냈다.

[0361] **실시예 5. 다양한 세포에서의 HER2 발현 수준**

[0362] 제조업체의 권장 사항에 따라 QIFIKIT 정량 키트(Dako)를 사용하여 다양한 암세포주에서의 HER2 세포 표면 발현 수준을 정량하였다. 보다 구체적으로, 세포를 포화 농도에서 표지되지 않은 항-HER2 마우스 단일클론 항체(R&D 시스템) 또는 정제된 마우스 IgG2b 이소형 대조군(R&D 시스템)으로 염색하였다. 세척 후, 키트의 염색된 세포와 보정 비드를 키트의 동일한 FITC-접합 염소 항-마우스 IgG 2차 항체로 동시에 표지하였다. 표지된 세포 및 보정 비드를 유세포 분석기에서 분석하였다. 보정 비드의 MFI 값을 사용하여 선형 회귀를 수행하였다. ABC(항체 결합 능력)는 이 회귀선으로부터 외삽하여 측정하였고, sABC(특이적 ABC)는 항-HER2 항체의 ABC에서 이소형 대조군 항체의 ABC를 공제하여 측정하였다. 또한, 상기 얻어진 다양한 세포주의 sABC (HER2 수준)를 SK-BR-3의 값(100%)으로 표준화하였다.

[0363] 얻어진 결과를 표 33에 나타내었다.

표 33

[0364]

Cell lines		sABC[HER2]	%[SK-BR-3]
NCI-N87	ATCC, CRL-5822	1,624,200	225.2
BT-474	ATCC, HTB-20	1,190,606	165.1
SK-BR-3	ATCC, HTB-30	721,333	100.0
Calu-3	ATCC, HTB-55	706,886	98.0
HCC1954	ATCC, CRL-2338	497,805	69.0
JIMT-1	DSMZ, ACC 589	93,113	12.9
ZR-75-1	ATCC, CRL-1500	25,360	3.5
A-431	ATCC, CRL-1555	13,130	1.8
MCF7	ATCC, HTB-22	9,916	1.4
LoVo	ATCC, CCL-229	7,273	1.0

MDA-MB-231	ATCC, HTB-26	3,844	0.5
BxPC-3	ATCC, CRL-1687	2,013	0.3

[0365] **실시예 6. 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 FcγRI 결합에 의존하는 4-1BB 신호 활성화 유도**

[0366] FcγRI (CD64)를 발현하는 CHO-K1 세포(GenScript)를 96-웰 분석 플레이트에 플레이팅(4x10^{4}개 세포/웰)하고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 밤새 배양하였다. 분석 당일, 각 웰에서 배양액을 제거하고 효과기 세포(NFκB-Luc2/h4-1BB 세포; Promega)를 플레이팅(5x10^{4}개 세포/웰)하였다. 각 웰에 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2(WT)x1A10 M12) 또는 항-4-1BB 항체(Urelumab, 미국 특허 7,288,638)를 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 6시간 인큐베이션하였다. 이후 각 웰에 Bio-Glo™ 시약을 첨가하고 마이크로플레이트 리더를 사용하여 발광성을 측정하였다.

[0367] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2(WT)x1A10 M12)는 FcγRI 존재 조건에서 강한 4-1BB 활성화를 유도하였다.

[0369] **실시예 7. HER2 발현이 낮은 종양세포에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 FcγRIIIa 매개 ADCC 활성**

[0370] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 HER2를 저발현하는 종양세포에서의 효능을 확인하기 위하여, FcγRIIIa 매개 ADCC(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)에 대한 효과를 시험하였다. HER2를 저발현하는 세포 JIMT-1과 MDA-MB-231(표 33 참조)을 각각 96-웰 분석 플레이트에 플레이팅(각각 1x10^{4}개 세포/웰)하고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 밤새 배양하였다. 분석 당일, 각 웰에서 배양액을 제거하고, 효과기 세포(NFκB-Luc2/FcγRIIIa 세포; Promega)를 플레이팅(5x10^{4}개 세포/웰)하였다. 각 웰에 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2(WT)x1A10 M12), US '250 Ab (항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체, 미국 특허 10,865,250의 서열번호 9 및 10으로 제조함), 또는 항-4-1BB 항체인 Urelumab을 각각 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 6시간 인큐베이션하였다. 이후 각 웰에 Bio-Glo™ 시약을 첨가하고 마이크로플레이트 리더를 사용하여 발광성을 측정하였다.

[0371] 그 결과, 도 5a(JIMT-1 cell line)와 5b(MDA-MB-231 cell line)에 나타낸 바와 같이, 시험된 HER2 저발현 종양세포(JIMT-1, MDA-MB-231) 모두에서, 다른 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체인 US '250 Ab와 항-4-1BB 항체인 Urelumab은 ADCC 활성화를 거의 유도하지 않은 반면, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2(WT)x1A10 M12)는 현저하게 ADCC 활성화를 유도하였다.

[0373] **실시예 8. HER2 발현이 낮은 종양을 가지는 마우스 모델에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 항종양 효과**

[0374] HER2 발현이 낮은 종양에 대한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체의 효능 평가를 위한 마우스 모델을 제작하였다. 구체적으로, 마우스 대장암 세포인 MC38를 사람 HER2를 발현하도록 유전자 조작한 MC38 종양세포(MC38/hHER2; 바이오사이토젠)와 야생형 MC38 종양세포를, 세포 개수 기준으로, 3:7 비율 (MC38/hHER2 1.5x10^6 cells + MC38 3.5x10^6 cells, with 0.1 mL PBS) 또는 1:9의 비율 (MC38/hHER2 0.5x10^6 cells + MC38 4.5x10^6 cells, with 0.1 mL PBS)로 혼합하여 사람 HER2 발현이 낮은 환경을 모사하는 종양 세포를 준비하였다. 사람 4-1BB(h4-1BB)가 발현하도록 유전자 조작된 마우스(h4-1BB Knock In mouse; 바이오사이토젠)의 옆구리에 상기 준비된 종양 세포를 이식한 후, 이식 4일째 종양 크기를 기준으로 군 분리를 실시하였다.

[0375] 유사한 종양 크기를 지니도록 군 분리된 마우스에 항-hIgG1항체, US '250 Ab, 및 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2 (WT) x 1A10 M12)를 각각 2.25 mg/kg, 3 mg/kg, 및 3 mg/kg의 용량으로 군 분리 당일, 4일후, 및 7일후에 마우스의 복강을 통해 투여한 후, 일주일에 두 번 디지털 칼리퍼(Digital caliper)로 종양 크기를 측정하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2 (WT) x 1A10 M12)는, 항-hIgG1항체와 다른 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체인 US '250 Ab와 비교하여, HER2 저발현 환경을 모사하는 종양 마우스 모델(3:7 비율 모델 및 1:9 비율 모델) 모두에 대해 우수한 종양 억제 효과를 나타내었다.

[0377] **실시예 9. HER2 발현이 낮은 종양을 가지는 마우스 모델에서 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체와 PD-1 억제제의 병용 투여에 따른 항-종양 효과**

[0378] HER2 발현이 낮은 종양에 대한 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체와 PD-1 억제제(항 PD-1 항체)의 병용 투여에 따른 항-종양 효력 평가를 위한 마우스 모델을 제작하였다. 구체적으로, 마우스 대장암 세포인 MC38를 사람 HER2를 발현하도록 유전자 조작한 MC38 종양세포 (MC38/hHER2; 바이오사이토젠)와 야생형 MC38 종양세포를, 세포 개수 기준으로, 1:9의 비율 (MC38/hHER2 $0.5x10^6$ cells + MC38 $4.5x10^6$ cells, with 0.1 mL PBS)로 혼합하여 사람 HER2 발현이 낮은 환경을 모사하는 종양 세포를 준비하였다. 사람 4-1BB(h4-1BB)를 발현하도록 유전자 조작된 마우스(h4-1BB Knock-In mouse; 바이오사이토젠)의 옆구리에 상기 준비된 종양 세포를 이식한 후, 이식 6일째 종양 크기를 기준으로 군 분리를 실시하였다.

[0379] 유사한 종양 크기를 지니도록 군 분리된 마우스에,

[0380] 항-hIgG1(2.25 mg/kg, BIW 2주)+항-mIgG2 항체(10 mg/kg, QW 4주)(Isotype control 그룹),

[0381] 항-mPD-1 항체(BioXcell, Cat# BP0146; 10 mg/kg, QW 4주),

[0382] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2 (WT) x 1A10 M12; 3 mg/kg, BIW 2주),및

[0383] 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2 (WT) x 1A10 M12; 3 mg/kg, BIW 2주)+항-mPD-1 항체(10 mg/kg, QW 4주)

[0384] 를 각 군 별로 마우스의 복강을 통해 투여한 후 일주일에 두 번 디지털 칼리퍼(Digital caliper)로 종양 크기를 측정하였다.

[0385] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, HER2 발현이 매우 낮은 저발현 환경을 모사하는 종양에 대해, 항-HER2/항-4-1BB 이중 특이 항체(HER2 (WT) x 1A10 M12)는 단독 투여 시 우수한 항-종양 효과가 나타났을 뿐 아니라, 항-mPD-1 항체와 병용 투여한 경우에는 각 약물의 단독 투여에 비해 상승된 항-종양 효과를 나타냈다.

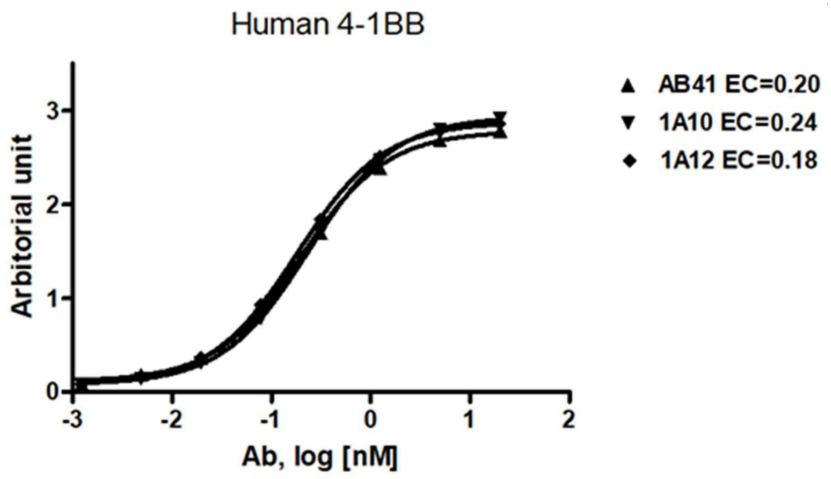
[0387] 본 명세서에 인용된 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참고 문헌은 마치 각 참고 문헌이 개별적으로 그리고 구체적으로 참고로 인용되는 것으로 표시되고 그 전체가 여기에 기재된 것처럼 동일한 정도로 참고로 인용된다.

[0388] 용어 "a" 및 "an" 및 "the" 및 "적어도 하나" 및 "하나 이상" 및 본 발명을 설명하는 맥락에서(특히 다음 청구범위의 맥락에서) 유사한 참조의 사용은 다음과 같다. 여기에 달리 명시되지 않거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "적어도 하나"(또는 "하나 이상") 다음에 하나 이상의 항목 목록(예: "A 및 B 중 적어도 하나")의 사용은 선택된 하나의 항목을 의미하는 것으로 해석되어야 한다. 여기에 달리 표시되지 않거나 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 나열된 항목(A 또는 B) 또는 나열된 항목(A 및 B) 중 둘 이상의 조합, "포함하는(comprising)", "가지는(having)", "포함하는(including)" 및 "포함하는(containing)"이라는 용어는 달리 명시되지 않는 한 개방형 용어(즉, "포함하지만 이에 제한되지 않는"을 의미)로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위에 대한 언급은 단지 본 명세서에서 달리 지시되지 않는 한 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 역할을 하도록 의도되며, 각각의 개별 값은 마치 본 명세서에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 통합된다. 여기에 설명된 모든 방법은 여기에 달리 표시되지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 여기에 제공된 모든 예 또는 예시적인 언어(예: "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실행에 필수적인 것으로 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

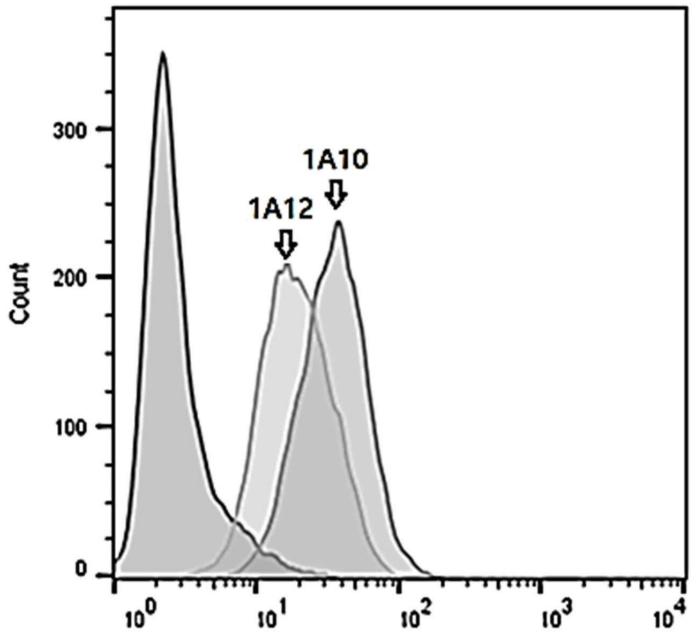
[0389] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자들에게 알려진 최상의 모드를 포함하여 본 발명의 바람직한 실시예가 여기에 설명되어 있다. 이러한 바람직한 실시예의 변형은 전술한 설명을 읽을 때 당업자에게 명백해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련된 기술자가 그러한 변형을 적절하게 사용하기를 기대하고, 본 발명자들은 본 명세서에 구체적으로 기술된 것과는 다르게 본 발명이 실시되기를 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용 가능한 법률이 허용하는 바에 따라 여기에 첨부된 청구범위에 인용된 주제의 모든 수정 및 등가물을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 달리 나타내지 않거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한, 모든 가능한 변형에서 전술한 요소의 임의의 조합은 본 발명에 포함된다.

도면

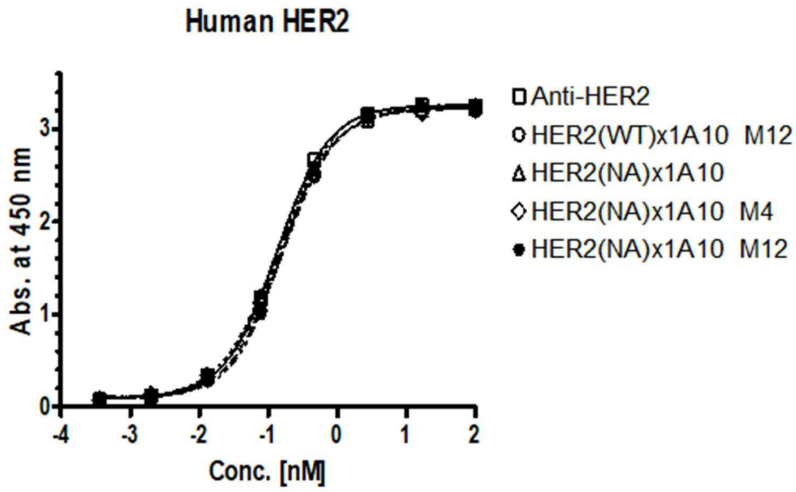
도면1a


Human 4-1BB
AB41 EC=0.20
1A10 EC=0.24
1A12 EC=0.18
Arbitorial unit
Ab, log [nM]
0
1
2
3
-3
-2
-1
0
1
2

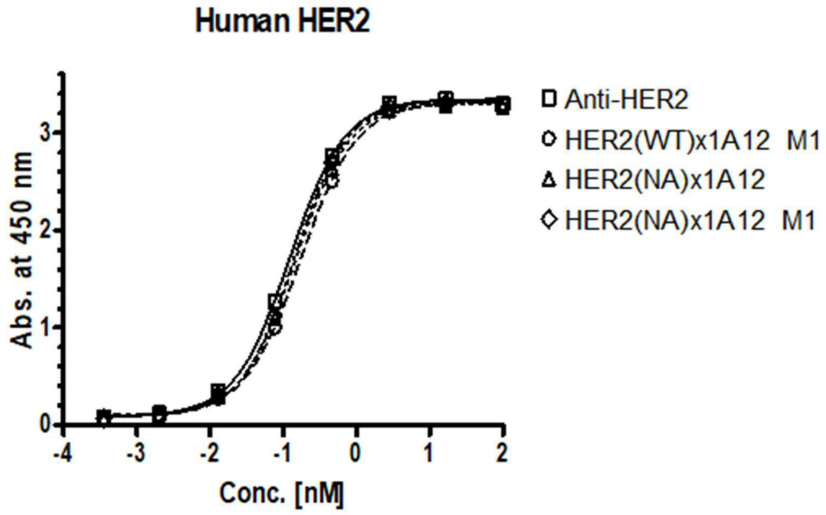
도면1b


1A10
1A12
Count
0
100
200
300
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

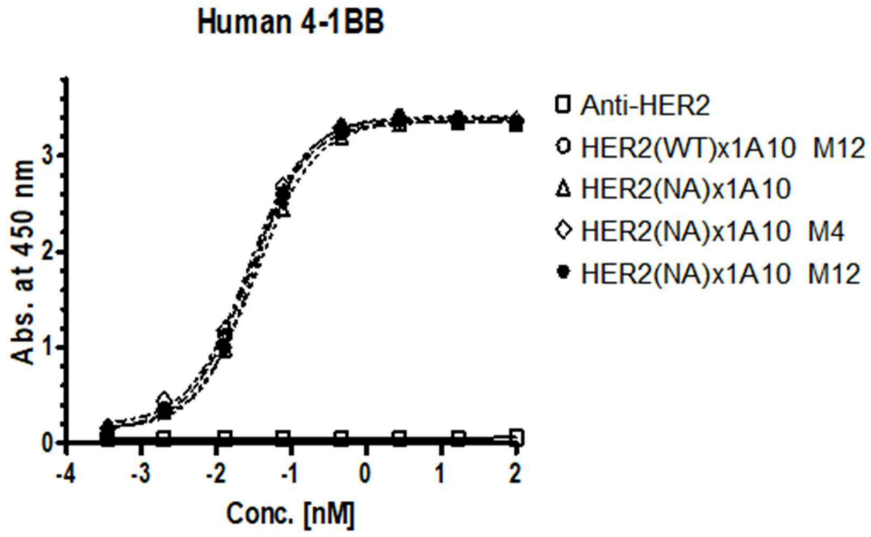
도면2a



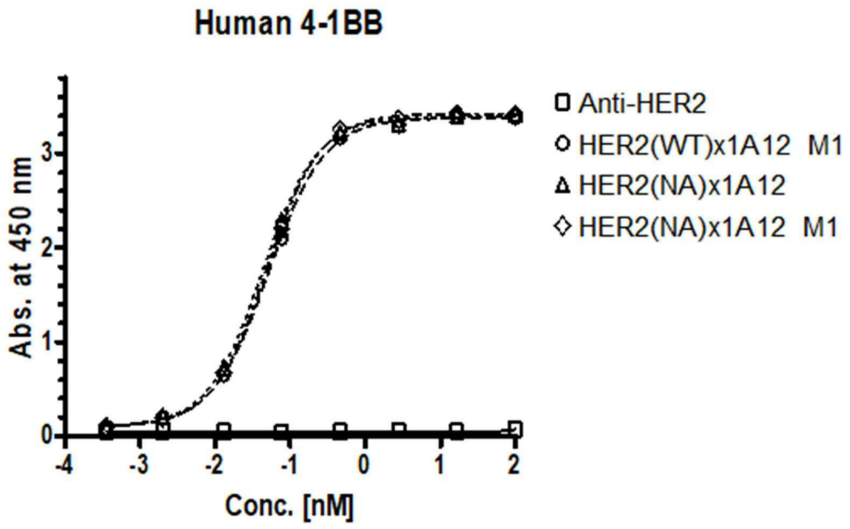
도면2b



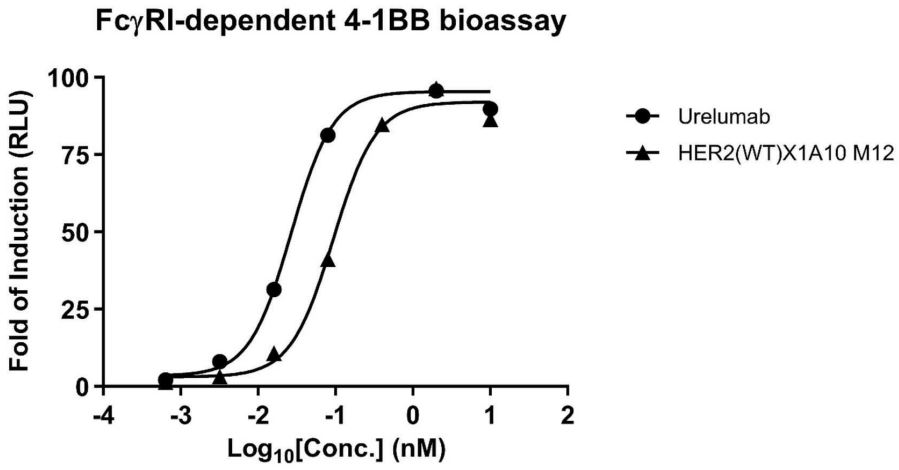
도면3a



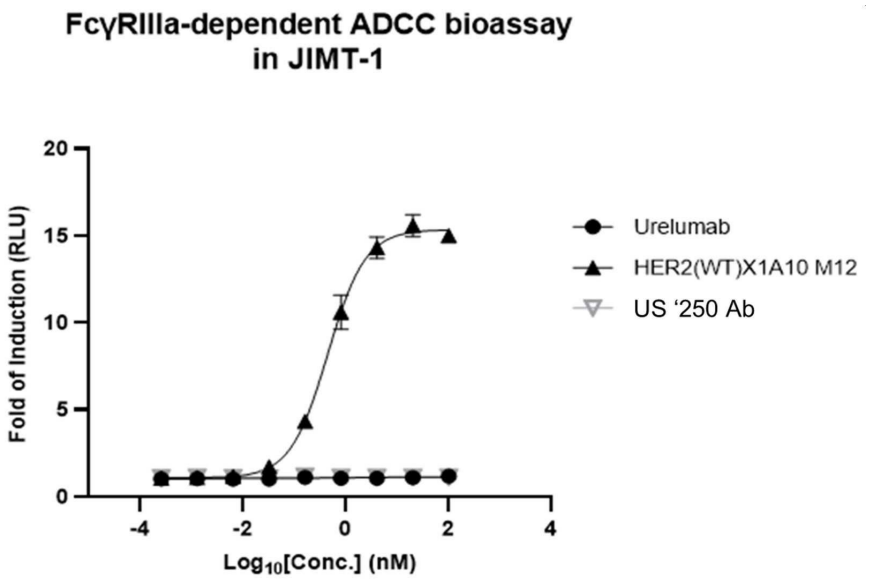
도면3b


Human 4-1BB
Abs. at 450 nm
Conc. [nM]
Anti-HER2
HER2(WT)x1A12 M1
HER2(NA)x1A12
HER2(NA)x1A12 M1

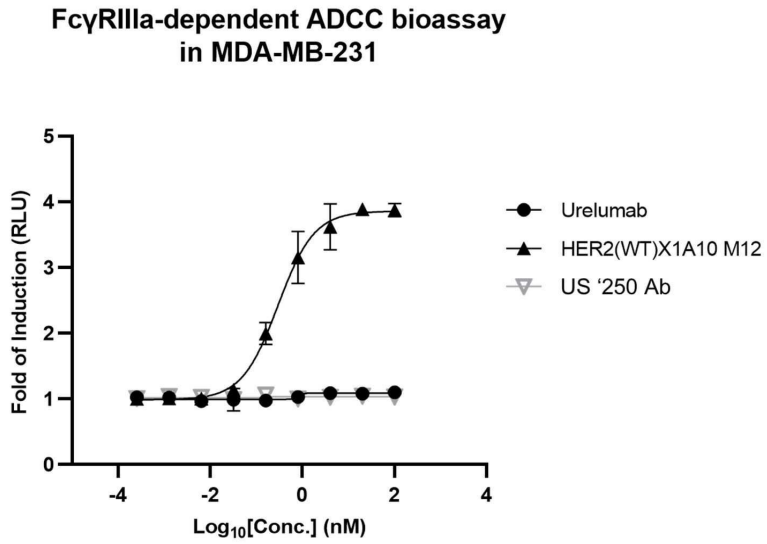
도면4


FcγRI-dependent 4-1BB bioassay
Fold of Induction (RLU)
Log10[Conc.] (nM)
Urelumab
HER2(WT)X1A10 M12

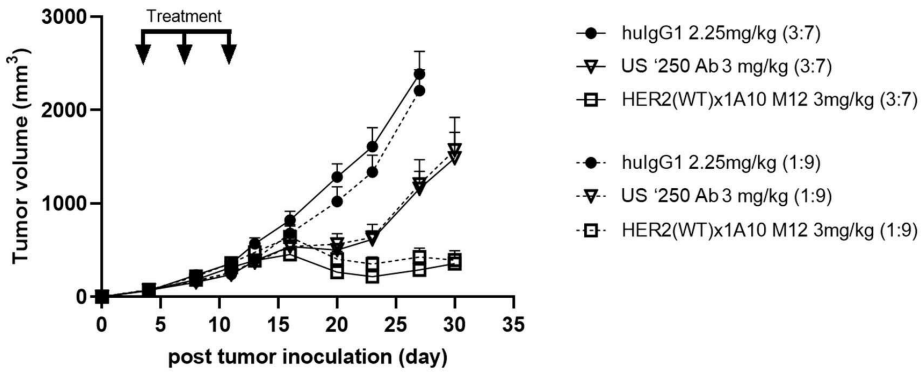
도면5a



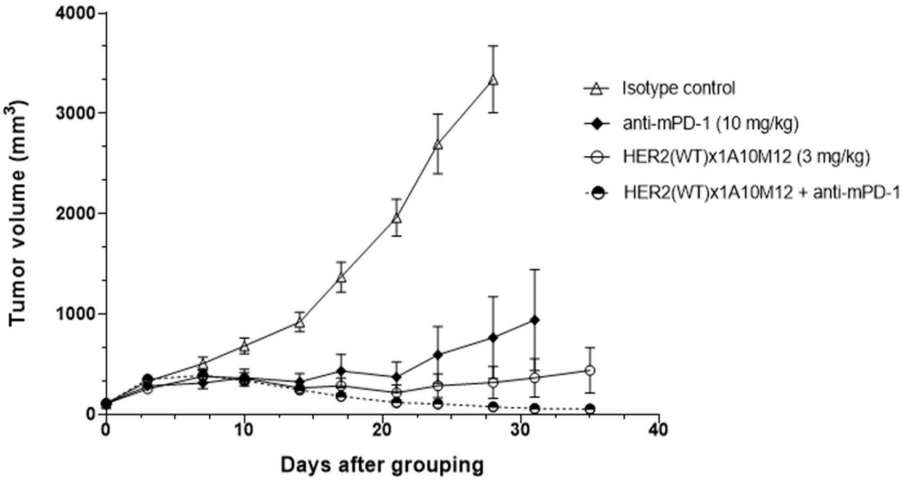
도면5b



도면6



도면7


Tumor volume (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
Days after grouping
Isotype control
anti-mPD-1 (10 mg/kg)
HER2(WT)x1A10M12 (3 mg/kg)
HER2(WT)x1A10M12 + anti-mPD-1

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.