



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월28일

(11) 등록번호 10-2679632

(24) 등록일자 2024년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-7015905

(22) 출원일자(국제) 2017년11월21일

심사청구일자 2020년11월19일

(85) 번역문제출일자 2019년06월03일

(65) 공개번호 10-2019-0086691

(43) 공개일자 2019년07월23일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/079930

(87) 국제공개번호 WO 2018/091740

국제공개일자 2018년05월24일

(30) 우선권주장

1619648.7 2016년11월21일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016134358 A1*

WO2016029073 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

엘리게이터 바이오사이언스 에이비

스웨덴 에스이-223 81 룬드 메디콘 빌리지

(72) 발명자

엘마크 피터

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비

프리젠 사라

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게이터 바이오사이언스 에이비

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 24 항

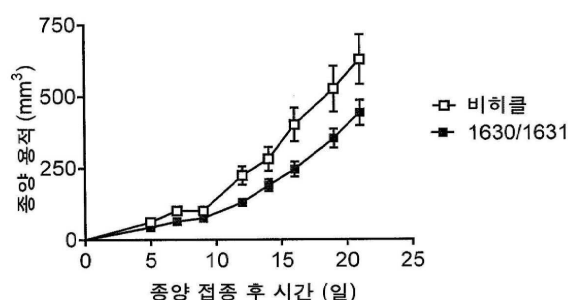
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 신규한 항_CD137 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 CD137에 대한 기준 항체의 결합을 억제할 수 있는 인간 CD137의 도메인 2에 대해 결합 특이성을 갖는 항체(및 이의 단편, 변이체, 융합체 및 유도체)에 관한 것이다. 본 항체 및 단편은 질환, 예컨대, 암의 치료에 유용성을 갖는다. 본 발명은 또한 이러한 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 용도, 방법 및 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)

(72) 발명자

퓨어브링 크리스티나

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

페터슨 제시카

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

살 안나

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

스미스 카린 예넬

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

바라스 라우라

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

본 샬트스 라우라

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

베이톤마키 니나

스웨덴 에스이-233 81 룬드 메디콘 빌리지 엘리게
이터 바이오사이언스 에이비

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD137의 도메인 2에 대한 결합 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 항원-결합 단편은 CD137 효능제이고 인간 CD137에 대한 기준 항체 '1630/1631'의 결합을 억제할 수 있고,

상기 항체 또는 항원-결합 단편은

- a) 공통서열 GFX^1FGYSY 를 포함하고, 여기서 X^1 은 T 또는 N인 중쇄 CDR1 서열;
- b) 공통서열 $\text{IGSX}^2\text{SSX}^3\text{T}$ 를 포함하고, 여기서 X^2 는 G 또는 T이고, X^3 은 Y 또는 H인 중쇄 CDR2 서열; 및
- c) 서열 ARVYSSPGIDY 를 포함하는 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- a) 공통서열 QSIX^4SX^5 를 포함하고, 여기서 X^4 는 S 또는 G이고, X^5 는 Y 또는 T인 경쇄 CDR1 서열;
- b) 공통서열 $X^6\text{AS}$ 를 포함하고, 여기서 X^6 는 A 또는 G인 경쇄 CDR2 서열; 및
- c) 서열 QQYYTWVPFT 를 포함하는 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 CD137에 대한 기준 항체 '2674/2675' 또는 기준 항체 '1630/1631'의 결합을 억제할 수 있는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 하기 특성:

- a) CD137을 자극하고 가교결합 의존적 기전을 통해 T 세포 및 다른 면역 세포를 활성화시키는 능력; 및/또는
- b) 사이노-CD137 항체와의 교차-반응성; 및/또는
- c) Fc 수용체를 결합할 수 있는 능력; 및/또는
- d) 종양 면역력을 유도할 수 있는 능력

중 1개 이상을 나타내는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 CD137을 발현하는 세포에 결합 시 실질적으로 하기를 유도할 수 없는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- a) 항체 의존적 세포의 세포독성(ADCC); 및/또는
- b) 항체-의존적 세포의 식균작용(ADCP); 및/또는
- c) 보체-의존적 세포독성(CDC).

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 기준 항체 1630/1631이 결합할 수 있는 CD137 상의 에피

토프와 적어도 부분적으로 중첩하는 CD137의 세포외 도메인 상의 에피토프에 결합할 수 있는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

온전한 항체를 포함하거나 이로 구성되거나; 또는

Fv 단편 및 Fab-유사 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항원-결합 단편을 포함하거나 이로 구성되는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

하기 CDR들

- a) GFTFGYSY [서열번호 3];
- b) IGS GSSYT [서열번호 4]; 및
- c) ARVYSSPGIDY [서열번호 5]을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

하기 CDR들

- a) QSISSY [서열번호 6];
 - b) AAS; 및
 - c) QQYTWVPFT [서열번호 8]을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는,
- 항체 또는 이의 항원-결합 단편:.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 3, 4 및 5의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

서열번호 2의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 6, 서열 AAS, 및 서열번호 8의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

서열번호 21, 22 및 23의 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호 24, 서열 GAS, 및 서열번호 26의 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

서열번호 19의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 21, 22 및 23의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는

서열번호 20의 아미노산 서열 또는 이와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 24, 서열 GAS, 및 서열번호 26의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 중쇄 불변 영역, 또는 이의 일부; 및/또는 경쇄 불변 영역, 또는 이의 일부를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역은 서열번호 12, 13, 14 및 15로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되고; 및/또는

상기 경쇄 불변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된 카파 경쇄인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

청구항 1에 있어서, Fc 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 항체는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 중쇄 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성된 온전한 IgG4 분자이고; 및/또는

상기 항체는 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 중쇄 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 2개의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성된 온전한 IgG4 분자인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 세포독성 모이어티를 더 포함하고; 및/또는

검출가능 모이어티를 더 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이의 성분 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 단리된 핵산 분자로서;

상기 단리된 핵산은 항체 중쇄 또는 이의 가변 영역 및 항체 경쇄 또는 이의 가변 영역을 인코딩하는, 단리된 핵산 분자.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 단리된 핵산은

서열번호 9 또는 27; 및

서열번호 10 또는 28의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성된, 핵산 분자.

청구항 18

청구항 16에 따른 핵산 분자를 포함하는 발현벡터,

청구항 19

청구항 16에 따른 핵산 분자를 포함하는 단리된 재조합 숙주 세포.

청구항 20

항체 또는 항원-결합 단편을 제조하는 방법으로서, 인코딩된 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 청구항 19에서 정의된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 21

유효량의 청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약제학적으로-허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 암 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 비경구 전달 또는 정맥내 전달 또는 국소 전달에 적합한 것인 약제학적 조성물.

청구항 23

청구항 21에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암; 결장직장암; 신장암; 췌장암; 난소암; 폐암; 자궁경부암; 횡문근육종; 신경교세포종; 골암; 다발성골수종; 백혈병, 피부암, 방광암 및 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 24

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 1개 이상의 추가의 항암제를 포함하는, 항암 병용요법을 위한 약제학적 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질환 예컨대 암의 치료에 유용성이 있는, CD137에 대해 결합 특이성을 갖는 항체-기재 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 용도, 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD137 (4-1BB, TNFRSF9)은 TNF 수용체 (TNFR) 슈퍼패밀리 일원이고 활성화된 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포, Treg, DC, 단핵구, 비만세포 및 호산구 상에 발현된다. CD137 활성화는 $CD8^{+}$ T 세포 활성화 및 생존에서 중요한 역할을 한다 (Lee 등, 2002; Pulle 등, 2006). 이것은 효과기 기능을 개시하기보다는 유지하고 확대하며, 그리고 우선적으로 Th1 사이토카인 생산을 지지한다 (Shuford 등, 1997). $CD4^{+}$ T 세포에서, CD137 자극은 초기에 활성화를 초래하고 후에는 활성화-유도된 세포사를 초래하여, CD137 효능적 항체가 종양면역뿐만 아니라 자가면역에서 치료 효과를 나타내는 이유를 설명한다 (Zhang, JCI, 2007, Sun, Trends Mol Med, 2003). CD137은 또한 Treg 기능을 억제한다 (So, Cytokine Growth Factor Rev, 2008). CD137의 활성화는 올리고머화 수용체에 의존적이다 (Rabu 등, 2005; Wyzgol 등, 2009).

[0003] CD137 효능적 항체는 종양 환경에서 내피 세포를 활성화시켜, ICAM-1 및 VCAM-1의 상향조절 및 개선된 T 세포 동원을 야기한다는 것이 밝혀졌다 (Palazon, Cancer Res, 2011).

- [0004] CD137은 각각 마우스 또는 인간에서 사이토카인 또는 CD16에 의해 활성화된 NK 세포 상에서 상향조절된다 (문헌 [Melero, CCR 19 (5)1044-53, 2013] 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌들 참고). CD137은 마우스뿐만 아니라 인간에서 NK 세포를 활성화시켜, ADCC를 강력하게 하는 것으로 밝혀졌지만 (Kohrt 등, 2014), 마우스에서 NK 세포 활성화와 인간에서의 억제제를 야기하는, 마우스 및 인간에서 NK 세포에 대한 반대 효과를 시사하는 보고가 있다 (Baessler, Blood, 2010).
- [0005] 몇 개의 연구는 효능적 CD137 항체로의 치료에 의한 종양 면역력의 유도를 실증했다 (Dubrot 등, 2010; Gauttier 등, 2014; Kim 등, 2001; McMillin 등, 2006; Melero 등, 1997; Miller 등, 2002; Sallin 등, 2014; Taraban 등, 2002; Uno 등, 2006; Vinay and Kwon, 2012; Wilcox 등, 2002). 또한, 이것은 전-임상 모델에서 CpG, TRAIL, CD40, OX-40, DR5, PD-1/PD-L1, CTLA-4 Tim-3, IL-2, IL-12를 포함한 몇 개의 면역조절물질과 함께 상승작용을 한다 (Curran 등, 2011; Gray 등, 2008; Guo 등, 2013; Kwong 등, 2013; Lee 등, 2004; Morales-Kastresana 등, 2013; Pan 등, 2002; St Rose 등, 2013; Uno 등, 2006; Wei 등, 2013; Westwood 등, 2010; Westwood 등, 2014a; Westwood 등, 2014b).
- [0006] 2가지 CD137 항체가 임상 개발중이다. 우렐루맵 (BMS-66513)은 Bristol-Myers Squibb 사에 의해 개발된 완전 인간 IgG4 항체이다. 다양한 징후에서의 몇 개의 단계 I 및 II 연구가 현재 진행중에 있다. 개발중인 다른 CD137 항체는 PF-05082566으로, Pfizer 사에 의해 개발된 완전 인간 IgG2 항체이다. 이것은 현재 림프종 및 다양한 고형 암에서 단계 I 개발중에 있다.
- [0007] CD137 항체의 효능적 효과는 Fc 영역의 아이소타입에 영향을 받는다. 임상에서 시험된 항체는 IgG2 또는 IgG4이다. 대부분의 TNFR 패밀리를 일원화 마찬가지로, CD137은 활성화를 위해 가교 결합에 좌우된다 (Wilson 2011, Cancer Cell). APC의 막 상에 발현된 CD137L은 수용체의 상당한 다중 가교 결합을 유도할 수 있다. 항체는 단지 그것만으로 2가지 CD137 수용체를 가교 결합시킬 수 있고, 그리고 강한 신호를 유도하기 위해 (트랜스 형으로) 다른 세포 상에 발현된 Fc γ R들을 통한 추가의 가교 결합이 강한 CD137 매개된 신호의 유도를 위해 필요할 수 있다. 이에 대한 예외는 미공지된 기전에 의해 가교 결합하는 독립적인 신호전달을 유도하는 IgG2 항체일 수 있다 (White et al, 2015 Cancer Cell). T 세포는 Fc γ R들을 발현하지 않고, 생체내 Fc γ R 매개된 가교 결합은 단핵구, 대식세포, DC들 및 잠재적으로 B 세포 및 다른 세포 유형에 의해 매개되는 것으로 생각된다. 억제성 Fc γ R Fc γ RIIB와 상호작용은 CD40 효능제에 대한 마우스 모델에서 이 효과에 대해 주요한 역할을 한다는 것이 제안되었고 (Li 2011, Science), 반면에 OX40 항체에 대해, 활성화 수용체와 상호작용은 더욱 중요한 것일 수 있다 (Bulliard 2014, Imm and Cell Biol). CD137 항체에 대해, Fc γ RII는 중요하지 않다 (Sanmamed 2015, Semin Onc). 인간 Fc γ R 분포뿐만 아니라 상이한 Fc γ R에 대한 상이한 IgG 아이소타입의 친화성이 마우스와 다르기 때문에, 이것의 번역 관련성은 불확실하다. 또한, 인간 IgG1은 mIgGIIa에 유사하고 mIgG1보다 상당히 낮은 상대적으로 저친화도로 mFc γ RIIB에 결합하고, mIgG1은 생체내에서 가장 강력한 효과를 갖는다 (Li Science 2011, Overdijk 2012 JI, Horton et al 2008, White et al 2011 and 2014).
- [0008] 고려해야 하는 또 다른 인자는 Fc γ R 수용체의 참여가 또한 항체로 도포된 세포 상에 항체-의존적 세포 식균작용 (ADCP) 및 보체-의존적 세포독성 (CDC)인 ADCC (간단히 하기 위해 이하 ADCC는 ADCP 및 CDC를 포함함)를 유도할 수 있다는 것이다. 전형적으로, 인간 IgG1은 표적의 특질인, 세포 유형 및 수용체 밀도에 의존하여 NK/대식세포 의존적 ADCC의 강한 유발제이다. IgG4 항체는 또한 IgG1보다는 낮은 정도이지만 ADCC를 유발할 수 있다 (Wang 2015, Front Imm; Vidarson 2014 Front Imm).
- [0009] 상이한 아이소타입을 갖는 CD137 효능적 항체의 효과는 따라서 1) 보다 강한 면역 활성화를 초래하는 가교 결합을 유도하는 것과 2) 효과기 T 세포 (우세하게 CD8 T 세포) 및 Treg들 양자를 사멸하는 것으로 이어질 수 있는 ADCC를 유도하는 것 사이의 균형에 영향을 미칠 수 있다. 1) 및 2)의 순 효과는 CD137 발현 세포의 분포, Fc γ R 발현 면역 세포와 표적 세포의 계합 가능성, 수용체 밀도와 친화성 및 ADCC에 대한 Teff 대 Treg의 민감성에 의존할 것이다. CD137 발현은 흑색종 종양에서 CD8 및 Treg들 양자 상에서 높다 (Quezada, presentation SITC 2015). IgG4 형식은, 효과기 CD8 T 세포의 NK 매개된 ADCC를 여전히 최소화하면서, 대식세포 및 단핵구에 의한 Fc γ RI 매개된 가교 결합을 허용할 수 있다.
- [0010] 그러나, 상기에 설명된 바와 같이, 쥐와 인간 FcR들 사이의 발현과 친화성에서의 차이에 기인하여 마우스 모델에서 상이한 인간 Fc의 비교를 설명하는 것은 어렵다. 또한, CD137에 CD137L의 결합을 차단하는 항체의 생체내 기능적 결과가 현재 논쟁중이다.
- [0011] 몇 개의 연구가 효능적 CD137 mAb로의 치료에 의한 종양 면역력의 유도를 실증하였다 (Dubrot 등, 2010; Gauttier 등, 2014; Kim 등, 2001; McMillin 등, 2006; Melero 등, 1997; Miller 등, 2002; Sallin 등, 2014;

Taraban 등, 2002; Uno 등, 2006; Vinay and Kwon, 2012; Wilcox 등, 2002). 2개의 상이한 항체인 Lob12.3 및 3H3이 마우스에서 생체내 연구를 위해 통상적으로 사용된다 (Shuford 1997 J Exp Med).

[0012] 마우스 모델에서 나타난 독성이 용량 의존 방식이 아니라 시간 의존 방식으로 반복된 투약에 이어 검출되었다 (Ascierto 2010 Semin Onc, Dubrot 2010 Can Imm, Niu 2007 JI). 독성은 피부 독성 및 간 독성: 아스파르테이트 아미노 전달효소/알라닌 아미노 전달효소 비 (ASAT/ALAT) 및 사이토카인 방출을 포함한다. 이것은 독성이 (T 세포와 마찬가지로) 면역 세포 모집단의 CD137 매개된 예비-활성화를 요하거나 또는 향상된 가교결합으로 이어질 수 있는 CD137 항체의 응집을 잠재적으로 형성하는, 항약물-항체 (ADA) 반응에 의해 야기된 이차 효과에 의존한다는 것을 시사한다. 마우스에서 나타난 독성은 가역적이고 TNFa/CD8 세포 의존 방식에 의존하는 것으로 보인다 (Ascierto 2010 Sem Onc). 원숭이에서 독성학 연구는 4주 동안 매주 1회 최대 100mg/kg의 단일 및 반복 투약 둘 모두가 검출된 피부 또는 간 독성 없이 내성이 있었다 (Ascierto 2010, Semin Onc).

[0013] TNF 수용체 패밀리를 통한 장기적이고 연속적인 활성화는 면역 소진으로 이어질 수 있다. 따라서, 수용체를 발현하는 세포에 대해 휴지 기간을 허용하는 방식으로 이러한 항체를 투여하는 것이 유익할 수 있다. 특이적 투약 프로토콜에서 휴지 기간을 증가시키기 위한 접근법은, 예를 들어, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합을 감소시킴에 의해 항체의 반감기를 감소시키는 것이다. 이것은 투여 경로에 의존하여 치료와 관련된 독성을 또한 감소시킬 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 개선된 항-종양 요법, 특히 임상적 사용에 적합하고 감소된 독성과 같은 개선된 특성을 갖는 항-CD137 항체에 대한 요구가 남아있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 제1 양태는 CD137의 도메인 2에 대해 결합 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 ('항체 폴리펩타이드')을 제공하고, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 CD137 효능제이고 인간 CD137에 대해 기준 항체 '1630/1631'의 결합을 억제할 수 있다.

[0016] 본 발명의 제2 양태는 CD137의 도메인 2에 대해 결합 특이성을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 ('항체 폴리펩타이드')을 제공하고, 여기서 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 CD137 효능제이고 인간 CD137에 대해 기준 항체 '2674/2675'의 결합을 억제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 상기 양태의 일 구현예에서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 CD137에 대해 기준 항체 '1630/1631' 및/또는 '2674/2675'의 결합을 억제할 수 있다.

[0018] 본 발명의 제1 양태에 따르면, 인간 CD137에 대해 1개 이상의 기준 항체에 결합을 억제할 수 있는 항체 폴리펩타이드가 제공된다.

[0019] 의심할 여지를 없애기 위해, 하기 개시내용은 본 발명의 제1 및 제2 양태 둘 모두에 적용될 수 있다.

[0020] 본 발명자들은 "CD137"에 구체적으로, 예를 들어, 유전자은행 수탁 번호 AAH06196.1 (하기 서열번호:11로 제시된 서열)에서 기재된 바와 같은, 인간 CD137 단백질을 포함시킨다. CD137은 또한 4-1BB 및 TNFRSF9로 과학적 문헌에 공지되어 있다.

[0021] 인간 CD137, 아미노산 서열:>gi|571321|gb|AAA53133.1| 4-1BB [호모 사피엔스]

[0022] MGNSCYNIVATLLLVLFNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDDNNRNQICSPCPPNSFSSAGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAECDCTPGFHCGLGAGCSMC
EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQIIISFFLALTSTALLFLFL
FLTLRFVSVKGRGKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0023] [서열번호: 11]

[0024] "도메인 2"는 인간 CD137의 아미노산 66 내지 107에 상응한다 (상기 서열번호:11에서 굵은 밑줄친 영역 참고).

[0025] 따라서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 CD137에 대해 특이성을 가진다. 본 발명자들은 "특이성"에 의해서는 항체 폴리펩타이드가 생체내, 즉 CD137이 인간 신체 내에 존재하는 생리적 병태하에서 CD137에 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 항체 폴리펩타이드는 생체내에서 임의의 다른 단백질에 결합하지 않는다. 이러한

결합 특이성은 CD137을 발현하는 형질감염된 세포를 사용하여 당해 분야에서 잘 알려진 방법, 예컨대 ELISA, 면역조직화학, 면역침강, 웨스턴 블랏 및 유세포측정에 의해 결정될 수 있다.

- [0026] 항체는 바람직하게는 10×10^{-9} M 미만 또는 7×10^{-9} M 미만, 더 바람직하게는 4, 또는 2×10^{-9} M 미만, 가장 바람직하게는 1.2×10^{-9} M 미만인 Kd 값으로 인간 CD137에 결합한다. 유익하게는, 항체 폴리펩타이드는 CD137에 선택적으로 결합할 수 있고, 즉 이것은 임의의 다른 단백질보다 CD137에 적어도 10-배 더 강하게 결합한다. 항-CD137 항체는 바람직하게는 CD137에 특이적으로 결합하고, 즉 이것은 CD137에 결합하지만 다른 분자에는 결합하지 않거나 더 낮은 친화성으로 결합한다. 따라서, 전형적으로, 인간 CD137에 관한 항체에 대한 Kd는 다른 비-표적 분자, 예컨대 췌장 CD137, 다른 TNFR 슈퍼패밀리 일원, 또는 임의의 다른 관련없는 물질 또는 환경에 수반되는 물질에 관한 Kd보다 2-배, 바람직하게는 5-배, 더 바람직하게는 10-배 낮을 것이다. 더 바람직하게는, Kd는 50-배 이하, 더욱더 바람직하게는 100-배 이하, 그리고 더욱더 바람직하게는 200-배 이하일 것이다.
- [0027] 전체적인 친화성 (KD) 및 상호작용 (예컨대 항체와 리간드 사이의 상호작용)의 온-레이트 (ka) 및 해리속도상수 (kd)를 측정하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 예시적인 *시험관내* 방법은 첨부되는 실시예에 기재되어 있다. 유세포측정 기반 방법을 사용하는 것을 또한 상상할 수 있다 (Sklar 등, Annu Rev Biophys Biomol Struct, (31), 97-119, 2002).
- [0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 CD137은 전형적으로 인간 CD137을 지칭한다. 항체는 다른 포유동물로부터의 CD137, 예컨대 비-인간 영장류, 예를 들어 *마카카 파스시컬라리스* (사이노몰구스 원숭이)로부터의 CD137에 대해 일부 결합 친화도를 가질 수 있다. 항체는 바람직하게는 췌장과 CD137에 결합하지 않고 및/또는 다른 인간 TNFR 슈퍼패밀리 일원, 예를 들어 인간 OX40 또는 CD40에 결합하지 않는다.
- [0029] 전형적으로, 본 발명은 그것의 원상태로 CD137, 그리고 특히 세포의 표면에 국소화된 CD137에 대해 친화성을 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0030] "세포의 표면에 국소화된"은 CD137이 CD137의 1개 이상의 영역이 세포 표면의 외부 면 상에 존재하도록 세포와 연계된다는 것을 의미한다. 예를 들어, CD137은 세포의 표면에 제시된 1개 이상의 영역으로 세포 원형질막 (즉, 막관통 단백질과 같이 배향됨) 안으로 삽입될 수 있다. 이것은 세포에 의한 CD137의 발현 과정에서 발생할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, "세포의 표면에 국소화된"은 "세포의 표면에 발현된" 것을 의미할 수 있다. 대안적으로, CD137은 이것을 세포 표면의 특정 영역 또는 영역들에 국소화하는 공유 및/또는 이온성 상호작용으로 세포 외부에 있을 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 정의된 바와 같은 항체 및 이들의 항원-결합 단편은 CD137 효능제이다. 예를 들어, 이들은 CD8+ T 세포로부터 인터페론-감마의 방출을 유도할 수 있다. 항-CD137 항체의 효능적 활성은 일차 CD8+ T 세포에 기반한 T 세포 검정으로 평가될 수 있다 (실시에 참고).
- [0032] 따라서, 항체는 CD137을 발현하는 세포의 활성을 조절할 수 있고, 여기서 상기 조절은 상기 세포의 활성의 증가 또는 감소이다. 세포는 전형적으로 T 세포이다. 항체는 CD4+ 또는 CD8+ 효과기 세포의 활성을 증가시킬 수 있거나, 또는 조절 T 세포 (T reg)의 활성을 감소시킬 수 있거나, 또는 고갈시킬 수 있다. 어느 경우에도, 항체의 순 효과는 효과기 T 세포, 특히 CD4+, CD8+ 또는 NK 효과기 T 세포의 활성에서의 증가일 것이다. 효과기 T 세포의 활성에서의 변화를 결정하는 방법은 잘 알려져 있고 이미 기재된 바와 같다.
- [0033] 항체는 바람직하게는 *시험관내*에서 CD8+ T 세포에서의 활성의 증가를 야기하고, 선택적으로 여기서 상기 활성의 증가는 T 세포에 의한 증식, IFN- γ 생산 및/또는 IL-2 생산에서의 증가이다. 본 증가는 동일한 검정에서 측정된 아이소타입 대조군 항체에 의해 야기된 활성의 변화보다 바람직하게는 적어도 2-배, 더 바람직하게는 적어도 10-배 그리고 더욱더 바람직하게는 적어도 25-배 더 높다.
- [0034] 상기에 설명된 바와 같이, 인간 CD137에 대해 1개 이상의 기준 항체의 결합을 억제할 수 있는 항체 폴리펩타이드가 제공된다. 본 명세서에 기재된 기준 항체는 기준항체 1630/1631 및 기준항체 2674/2675이다.
- [0035] 기준항체 "1630/1631"로 본 발명자들은 각각 서열번호: 17 및 18의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 온전한 IgG 항체를 의미한다.
- [0036] 1630/1631- 전체 서열 중쇄
- [0037] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGYSMSWVRQAPGKGLEWVSSIGSGSSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSSPGIDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKITYTCNVD

HKPSNTKVKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0038] [서열번호: 17]

[0039] 1630/1631 - 전체 서열 경쇄

[0040] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYTWVPFTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0041] [서열번호: 18]

[0042] 기준항체 "674/2675"로 본 발명자들은 각각 서열번호: 29 및 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하
는 온전한 IgG 항체를 의미한다.

[0043] 2674/2675 - 전체 서열 중쇄

[0044] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGYSYMSWVRQAPGKGLEWVSSIGSTSSHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSS
PGIDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD
HKPSNTKVKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0045] [서열번호: 29]

[0046] 2674/2675 - 전체 서열 경쇄

[0047] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIGSTLWYQQKPGKAPKLL IYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYTWVPFTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0048] [서열번호: 30]

[0049] 아래에 논의된 바와 같이, 기준항체 '1630/1631'은 CD137의 도메인 2에 결합한다. 기준항체 2674/2675는 또한
CD137의 도메인 2에 결합한다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 CD137의 도메인 2에 결합하
는 것이 인정될 것이다.

[0050] "인간 CD137에 대해 기준항체 '1630/1631'의 결합을 억제할 수 있는"으로는 본 발명자들은 본 발명의 항체 폴리
펩타이드의 존재가 인간 CD137에 '1630/1631'의 결합을 전체적으로 또는 부분적으로 억제한다는 것을 의미한다.
유사하게, "인간 CD137에 대해 기준항체 '2674/2675'의 결합을 억제할 수 있는"으로는 본 발명자들은 본 발명의
항체 폴리펩타이드의 존재가 인간 CD137에 '2674/2675'의 결합을 전체적으로 또는 부분적으로 억제한다는 것을
의미한다. 이러한 경쟁적 결합 억제는 당해 분야에서 잘 알려진 검정 및 방법을 사용하여, 예를 들어, 고정된
CD137을 갖는 BIAcore 칩을 사용하여 시험되는 항체 폴리펩타이드와 함께 그리고 없이 기준항체 '1630/1631' 또
는 '2674/2675'로 인큐베이팅하여 결정될 수 있다. 대안적으로, 쌍으로 맵핑하는 접근법이 사용될 수 있고, 여
기서 기준항체 '1630/1631' 또는 '2674/2675'는 BIAcore 칩의 표면에 고정되어 지고, CD137 항원은 고정된 항체
에 결합되고, 그리고 그 다음 제2 항체는 동시 CD137-결합 능력에 대해 시험된다 (그것의 개시내용은 본 명세서
에 참고로 편입되는, 문헌 ['BIAcore Assay Handbook', GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA
05/2012] 참고).

[0051] 추가의 대안으로, 경쟁적 결합 억제는 유세포측정을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 테스트 항체가 세포
표면 항원에 1630/1631 또는 2674/2675 기준항체의 결합을 억제할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 항원을 발
현하는 세포는 20분 동안 테스트 항체로 사전-인큐베이션될 수 있고 그 후 세포는 세정되고 유세포측정에 의해
검출될 수 있는, 형광단에 접합된 기준 1630/1631 또는 2674/2675 항체로 인큐베이션된다. 만일 테스트 항체로
사전-인큐베이션이 유세포측정에서 기준 1630/1631 또는 2674/2675 항체의 검출을 감소시키면, 본 테스트 항체
는 세포 표면 항원에 기준 항체의 결합을 억제한다. 만일 시험되는 항체가 CD137에 대해 고친화도를 나타내면,
감소된 사전-인큐베이션 기간이 사용될 수 있다 (또는 전혀 사전-인큐베이션되지 않을 수 있다).

- [0052] 추가의 대안에서, 경쟁적 결합 억제제 (예를 들어 실시예 8에서 기재된 바와 같이) ELISA를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0053] "항체 또는 이의 항원-결합 단편"에 본 발명자들은 실질적으로 온전한 항체 분자, 뿐만 아니라 키메라 항체, 인간화된 항체, 단리된 인간 항체, 단일 사슬 항체, 이중특이적 항체, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 동종이량체 및 이종이량체, 및 이들의 항원-결합 단편 및 유도체를 포함시킨다. 적합한 항원-결합 단편 및 유도체는, 반드시 이에 제한되지는 않지만, Fv 단편 (예를 들어 단일사슬 Fv 및 디설파이드-결합된 Fv), Fab-유사단편 (예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab)₂ 단편), 단일 가변 도메인 (예를 들어 V_H 및 V_L 도메인) 및 도메인 항체 (dAbs, 단일 및 이중 포맷 [즉 dAb-링커-dAb]를 포함함)을 포함한다. 전체의 항체보다 항체 단편을 사용하는 잠재적인 이점이 몇-배로 된다. 단편의 더 작은 크기는 개선된 약리적 특성, 예컨대 고정 조직의 더 나은 침투로 이어질 수 있다. 또한, 항원-결합 단편 예컨대 Fab, Fv, ScFv 및 dAb 항체 단편이 E. 콜리에서 발현될 수 있고 이로부터 분비될 수 있어, 따라서 다량의 상기 단편의 손쉬운 생산을 가능하게 한다.
- [0054] 예를 들어, 항원-결합 단편은 scFv 분자를 포함할 수 있고, 즉 여기서 V_H 및 V_L 파트너 도메인은 가요성 올리고 펩타이드를 통해 연결된다.
- [0055] 어구 "항체 또는 이의 항원-결합 단편"은 또한 항체 모방체 (예를 들어, 특정 위치에 도입되는 가변성을 여전히 허용하면서 고도의 안정성을 가지는 비-항체 스캐폴드 구조)를 포괄하는 것으로 의도된다. 생화학 분야의 숙련가는 문헌 Gebauer & Skerra, 2009, *Curr Opin Chem Biol* 13(3): 245-255 (그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)에서 논의된 바와 같은 많은 이러한 분자에 대해 잘 알고 있을 것이다. 예시적인 항체 모방체는 하기를 포함한다: 아피바디(또한 소위 Trinectins; Nygren, 2008, *FEBS J*, 275, 2668-2676); CTLD (또한 소위 Tetranectins; *Innovations Pharmac. Technol.* (2006), 27-30); 아드넥틴 (또한 소위 monobodies; *Meth. Mol. Biol.*, 352 (2007), 95-109); 안티칼린(*Drug Discovery Today* (2005), 10, 23-33); DARPin (ankyrins; *Nat. Biotechnol.* (2004), 22, 575-582); 아비머(*Nat. Biotechnol.* (2005), 23, 1556-1561); 마이크로바디 (*FEBS J*, (2007), 274, 86-95); 펩타이드아타머 (*Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005), 5, 783-797); 쿠니츠도메인 (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2006) 318, 803-809); 아펠린(*Trends. Biotechnol.* (2005), 23, 514-522); 아피머 (Avacta Life Sciences, Wetherby, UK).
- [0056] 당해 분야의 숙련가는 본 발명이 또한 지금 현존하든 미래에 존재하든 이들의 항체 및 항원-결합 단편의 변형된 버전, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 또는 또 다른 적합한 폴리머의 공유결합에 의해 변형된 버전 (하기 참고)을 포괄한다는 것을 추가로 인정할 것이다.
- [0057] 항체 및 항체 단편을 생산하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체는 항체 분자의 생체내 생산의 유도, 면역글로불린 라이브러리의 스크리닝 (Orlandi. *et al*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833-3837; Winter 등, 1991, *Nature* 349:293-299, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨) 또는 배양물에서 세포주에 의해 단클론성 항체 분자의 생성을 이용하는 몇 개의 방법 중 임의의 하나를 통해 생성될 수 있다. 이들은, 비제한적으로, 하이브리도마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술, 및 엠슈타인-바르 바이러스 (EBV)-하이브리도마 기술을 포함한다 (Kohler 등, 1975. *Nature* 256:4950497; Kozbor 등, 1985. *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote 등, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; Cole 등, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0058] 단클론성 항체의 생산에 적합한 방법은 또한 문헌 ["*Monoclonal Antibodies: A manual of techniques*", H Zola (CRC Press, 1988, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)] 및 문헌 ["*Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*", J G R Hurrell (CRC Press, 1982, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)]에 개시되어 있다.
- [0059] 마찬가지로, 항체 단편은 당해 분야에서 잘 알려진 방법 (예를 들어, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Harlow & Lane, 1988, "*Antibodies: A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York] 참고)을 사용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항체 단편은 항체의 단백질을 가수분해에 의해 또는 단편을 인코딩하는 DNA의 E. 콜리 또는 포유동물 세포 (예를 들어 차이니스햄스터 난소 세포 배양 또는 다른 단백질 발현 시스템)에서의 발현에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로, 항체 단편은 종래의 방법에 의한 전체의 항체의 펩신 또는 파파인 소화에 의해 수득될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 항체는 기준 항체 1630/1631 및 2674/2675의 가변 영역을 참고로 하여 정의된다.

- [0061] '1630/1631'으로 지정된 기준항체는 하기를 포함한다:
- [0062] (a) 서열번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역:
- [0063] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGYSYMSWVRQAPGKGLEWVSSIGSGSSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSS
PGIDYWGGTLVTSS
- [0064] [서열번호:1]
- [0065] 및
- [0066] (b) 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역:
- [0067] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYTWVPFTFGQG
TKLEIK
- [0068] [서열번호:2]
- [0069] '2674/2675'로 지정된 기준항체는 하기를 포함한다:
- [0070] (a) 서열번호: 19의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역:
- [0071] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGYSYMSWVRQAPGKGLEWVSSIGSTSSHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSS
PGIDYWGGTLVTSS
- [0072] [서열번호:19]
- [0073] 및
- [0074] (b) 서열번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역:
- [0075] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGSTLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYTWVPFTFGQG
TKLEIK
- [0076] [서열번호:20]
- [0077] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "아미노산"은 표준 20개 유전자적으로-인코딩된 아미노산 및 (천연 'L' 형태에 비교하여) 'D' 형태인 그것의 상응하는 입체 이성질체, 오메가-아미노산 및 다른 자연발생 아미노산, 자유로운 아미노산 (예를들어 α , α -이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 등) 및 화학적으로 유도된 아미노산 (하기 참고)를 포함한다.
- [0078] 아미노산이 "알라닌"또는 "Ala" 또는 "A"와 같이 구체적으로 열거될 때, 본 용어는 명백하게 달리 언급되지 않는 한 L-알라닌 및 D-알라닌 양자를 지칭한다. 다른 자유로운 아미노산이 또한 폴리펩타이드에 의해 원하는 기능적 특성이 유지되는 한 본 발명의 폴리펩타이드에 대해 적합한 성분일 수 있다. 도시된 펩타이드에 대해, 적절한 경우, 각각의 인코딩된 아미노산 잔기는 종래의 아미노산의 통속 명칭에 상응하는 단일글자 지정에 의해 표시된다.
- [0079] 일 구현예에서, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 항체 폴리펩타이드는 L-아미노산을 포함하거나 구성된다.
- [0080] 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 특이성은 구성성분 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 내의 상보성 결정 영역 (CDR), 예컨대 본 명세서에 기재된 이들 CDR의 존재에 의해 부여된다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.
- [0081] 상기 가변 영역을 포함하는 임의의 온전한 IgG 항체가 CD137에 대한 1630/1631 또는 2674/2675 결합을 경쟁적으로 억제하는 본 발명의 항체 폴리펩타이드를 동정하기 위한 기준항체로서 사용될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 추가로 인정될 것이다. 바람직하게는 그러나, 기준항체 1630/1631은 각각 서열번호: 17 및 18에서 정의된 바와 같은 중쇄 및 경쇄로 구성되고, 기준항체 2674/2675는 각각 서열번호: 29 및 30에서 정의된 바와 같은 중쇄 및 경쇄로 구성된다.
- [0082] 경쟁적 결합은 전형적으로 테스트 항체가 기준 항체 (이 경우에, 1630/1631 또는 2674/2675)에 결합하는 항원 상의 에피토프에 결합하거나, 또는 여기에 적어도 아주 근접하기 때문에 발생한다. 그러나, 경쟁적 결합은 또한 입체 간섭의 이점에 의해 일어날 수 있고; 따라서, 테스트 항체는 기준 항체가 결합하지만 여전히 항원에 기준 항체의 결합을 방해하기 위해 충분한 크기 또는 배치형태의 것일 수 있는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다고

당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.

- [0083] 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 이들을 암에 대해 특히 적합한 진단 및 치료제로 만드는 특성을 나타내는 기준으로 항-CD137 항체의 스크리닝 후 확인되었다.
- [0084] 따라서, 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 하기 특성 중 하나 이상을 나타낸다:
- [0085] a) CD137을 자극하고 가교결합 의존적 기전을 통해 T 세포 및 다른 면역 세포를 활성화시키는 능력 (예를 들어 CD8+ T 세포로부터 인터페론-감마의 방출을 유도함; 실시예 참고); 및/또는
- [0086] b) 사이노몰구스 CD137과 교차-반응성 (실시예 참고).
- [0087] 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편은 상기 특성 둘 모두를 나타낼 수 있다.
- [0088] 상기에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체는 가교 결합 의존적 기전을 가질 수 있다. "가교 결합 의존적 기전"에 본 발명자들은 항체가 CD137을 자극하기 위해 CD137 및 Fc 수용체 양자에 결합하는 Fc 가교 결합 의존적 기전을 포함시킨다. 이와 같이, 항체는 CD137 및 Fc 수용체 양자에 결합할 수 있어야 한다.
- [0089] 바람직한 구현예에서, 표적화된 Fc 수용체는 Fc γ R이다. Fc γ R들의 예는 Fc γ RI, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB를 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, Fc γ R은 Fc γ RIIA일 수 있다. Fc γ RIIA에 본 발명자들은 Fc γ RIIA의 R131 및 H131 동종이인자형 둘 모두를 포함시킨다. 따라서, 일 구현예에서, 표적화되는 Fc γ R은 Fc γ RIIA의 R131 동종이인자형이다.
- [0090] 대안적인 구현예에서, 항체는 이것이 Fc 수용체에 대한 결합의 부재에서 CD137을 자극할 수 있도록 Fc 가교 결합 독립적일 수 있다.
- [0091] 따라서, 예시적인 항체 2674/2675 및 1630/1631은 공통자극 CD137 수용체를 표적화하는 Fc γ R-가교결합 의존적 효능적 항체이다. 이들은 따라서 CD137 및 Fc γ R을 발현하는 세포를 함유하는 조직 또는 종양에서만 활성이다. "CD137 및 Fc γ R을 발현하는 세포를 함유하는 종양"에 본 발명자들은 CD137 및 Fc γ R을 발현하는 종양 세포 및/또는 종양 침윤하는 면역 세포 (예컨대 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포, T 세포, B 세포 및 과립구)를 포함하는 종양 또는 종양 배출 림프절을 포함시킨다. CD137 및 Fc γ R은 종양 내의 별개의 세포 상에 발현될 수 있고 및/또는 동일한 세포에서 공-발현될 수 있다고 인정될 것이다. 기준 항체 2674/2675 및 1630/1631은 따라서 종양 미세 환경에서 CD137 및 Fc γ R 양자를 발현하는 세포와 관련된 징후에서 종양 지향된 면역 활성화를 제공할 것이다; 이것은 전신 면역 활성화를 유도할 수 있는 Fc γ R 독립적인 CD137 효능제 (예를 들어 우렐루맵)와 대비된다. 항체 2674/2675 및 1630/1631의 효과를 국소화시키는 종양은 주로 다수의 상이한 Fc γ R들을 발현하는 종양 침윤하는 대식세포/골수세포에 의존할 것이다.
- [0092] IgG4는 Fc γ RI에 고친화도로 그리고 Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIB에 중간 정도/저친화도로 결합한다는 것이 공지되어 있다. Fc γ RI 및 Fc γ RIIA는 단핵구 상에서 발현되고 Fc γ RIIB는 B 세포 상에 고밀도로 발현된다. 항체 2674/2675 및 1630/1631의 가교 결합은 우선적으로 종양내에서 뿐만 아니라 인접한 배출 림프절에서 발생할 것이다. 전신으로 혈청 IgG 수준이 높은 혈액에서, 유리하는 비-차단 Fc γ R들의 이용가능성은 효과적인 가교 결합이 발행하기에 너무 낮은 것으로 여겨진다. 따라서, 전신 면역 활성화에 대한 위험은 너무 낮은 것으로 여겨져 다른 CD137 mAb들에 비교하여 위험-이점 프로파일을 개선한다.
- [0093] 2674/2675 및 1630/1631과 같은 본 발명의 항체로의 치료를 위한 환자 선택 및 바이오마커 근거는 CD137 및 Fc γ R들을 발현하는 침윤하는 세포를 갖는 종양 유형에 의해 유도될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 (즉 동반 진단 시험과 같이) CD137 및 Fc γ R들을 발현하는 세포를 함유하는 종양이 있는 것을 기준으로 선택된 환자에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0094] "침윤하는 세포"에 본 발명자들은 종양 침윤하는 면역 세포 예컨대 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포, T 세포, B 세포 및 과립구를 포함시킨다.
- [0095] 유익하게는, 항체 또는 항원-결합 단편은 종양 면역력을 유도할 수 있다. 종양 면역력은 당해 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어 동일한 종양으로 CD137 항체 치료에 의해 주어진 종양이 치료된 재-도전적 마우스에 의해 실증될 수 있다. 종양 면역력이 항체 요법에 의해 유도된 경우, 종양은 재공격 시에 거부된다.
- [0096] 일 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD137을 발현하는 세포에 결합시에 실질적으로 하기를 유도할 수 있다:

- [0097] a) 항체 의존적 세포의 세포독성 (ADCC);
- [0098] b) 항체-의존적 세포의 식균작용 (ADCP); 및/또는
- [0099] c) 보체-의존적 세포독성 (CDC).
- [0100] 일 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 기준항체 1630/1631 및/또는 2674/2675가 결합할 수 있는 CD137 상의 에피토프와 적어도 부분적으로 중첩하는 CD137의 세포의 도메인 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 따라서, 항체 또는 항원-결합 단편은 CD137의 도메인 2에/그 안에 위치한 에피토프에 결합가능할 수 있다.
- [0101] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 온전한 항체 (예컨대 IgG1 또는 IgG4 항체)를 포함하거나 이들로 구성된다. 바람직한 구현예에서, 항체는 IgG4 항체이다.
- [0102] 대안적인 구현예에서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 Fv 단편 (예를 들어 단일사슬 Fv 및 디설파이드-결합된 Fv), Fab-유사 단편 (예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편 및 F(ab)₂ 단편) 및 도메인 항체 (예를 들어 단일 V_H 가변 도메인 또는 V_L 가변 도메인)으로 구성된 군으로부터 선택된 항원-결합 단편을 포함하거나 이들로 구성된다. 특히, 항체 폴리펩타이드는 scFv일 수 있다.
- [0103] 추가 구현예에서, 상기에 논의된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩타이드는 아피바디, 테트라넥틴 (CTLD), 아드넥틴 (모노바디), 안티칼린, DARPin (안키린), 아비머, iMab, 마이크로바디, 펩타이드 압타머, 쿠니츠 도메인 및 아필린을 포함하거나 구성된 군으로부터 선택된 항체 모방체를 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0104] 일 구현예에서, 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0105] a) 공통서열 G, F, T/N, F, G, Y, S, Y를 갖는 중쇄 CDR1 서열;
- [0106] b) 공통서열 I, G, S, G/T, S, S, Y/H, T를 갖는 중쇄 CDR2 서열; 및
- [0107] c) 서열 ARVYSSPGIDY를 갖는 중쇄 CDR3 서열.
- [0108] 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기를 포함한다:
- [0109] a) 공통서열 Q, S, I, S/G, S, Y/T를 갖는 경쇄 CDR1 서열;
- [0110] b) 공통서열 A/G, A, S를 갖는 경쇄 CDR2 서열; 및
- [0111] c) 서열 QQYYTWVPFT를 갖는 경쇄 CDR3 서열.
- [0112] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0113] a) GFTFGYSY [서열번호: 3] 또는 서열번호: 3에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열;
- [0114] b) IGS GSSYT [서열번호: 4] 또는 서열번호: 4에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열; 및
- [0115] c) ARVYSSPGIDY [서열번호: 5] 또는 서열번호: 5에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열.
- [0116] 따라서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3, 4 및 5의 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0117] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 1630/1631 기준 항체의 상응하는 영역의 아미노산 서열, 즉 서열 번호:1을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0118] 대안적인 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 CDR 들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0119] a) GFNFGYSY [서열번호: 21] 또는 서열번호: 21에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열;
- [0120] b) IGSTSSHT [서열번호: 22] 또는 서열번호: 22에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는

3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열; 및

- [0121] c) ARVYSSPGIDY [서열번호: 23] 또는 서열번호: 23에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열.
- [0122] 따라서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 21, 22 및 23의 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0123] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 2674/2675 기준 항체의 상응하는 영역의 아미노산 서열, 즉 서열번호: 19를 갖는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0124] 그러나, CDR 서열 내의 저수준의 돌연변이 (전형적으로, 1, 2 또는 3개의 아미노산)는 CD137에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 특이성의 손실 없이 용인될 수 있다는 것이 (구현예, 1630/1631 또는 2674/2675 중 어느 하나와 관계하여) 인정될 것이다.
- [0125] 예를 들어, 대안적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기에서 정의된 바와 같은 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 H1 및 H2 CDR들은 각각 서열번호: 3 및 4의 돌연변이된 버전이고, H3 CDR은 서열번호: 5이다.
- [0126] 추가의 대안적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기에서 정의된 바와 같은 CDR들을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 H1 및 H2 CDR들은 각각 서열번호: 21 및 22의 돌연변이된 버전이고, H3 CDR은 서열번호: 23이다.
- [0127] 동일성 퍼센트는, 예를 들어, 파라미터로서 전반적인 정렬 선택, 평점 매트릭스 BLOSUM62, 오프닝 갭 페널티 -14, 연장 갭 페널티 -4를 사용하여 Expasy 설비 사이트 (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)에서 LALIGN 프로그램 (Huang and Miller, *Adv. Appl. Math.* (1991) **12**:337-357, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 2개의 폴리펩타이드 사이의 서열 동일성 퍼센트는 적합한 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 Wisconsin 대학의 유전학 컴퓨팅 그룹의 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있고 동일성 퍼센트는 그 서열이 최적으로 정렬된 폴리펩타이드에 관하여 계산된다는 것이 인정될 것이다.
- [0128] 정렬은 (본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Thompson 등, 1994, *Nucl. Acid Res.* **22**:4673-4680]에서 기재된 바와 같은) Clustal W 프로그램을 사용하여 대안적으로 수행될 수 있다. 사용된 파라미터 아래와 같을 수 있다:
- [0129] - 빠른 쌍으로 정렬 파라미터: K-투스플(워드) 크기; 1, 윈도우 크기; 5, 갭 페널티; 3, 최상부 대각선의 수; 5. 평점 방법: x 퍼센트.
- [0130] - 다중 정렬 파라미터: 갭 오픈 페널티; 10, 갭 연장 페널티; 0.05.
- [0131] - 평점 매트릭스: BLOSUM.
- [0132] 대안적으로, 국소 서열 정렬을 결정하기 위해 BESTFIT 프로그램이 사용될 수 있다.
- [0133] 추가의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제1 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0134] a) QSISSY [서열번호: 6] 또는 서열번호: 6에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열;
- [0135] b) AAS [서열번호: 7] 또는 서열번호: 7에 비교하여 최대 2개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1 또는 2 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열 및
- [0136] c) QQYYTWVPFT [서열번호: 8] 또는 서열번호: 8에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열.
- [0137] 따라서, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 6, 7 및 8의 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0138] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 1630/1631 기준 항체의 상응하는 영역의 아미노산 서열, 즉 서열번호: 2를 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0139] 대안적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기에서 정의된 바와 같은 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 L1 및 L2 CDR들은 각각 서열번호: 6 및 7의 돌연변이된 버전이고, L3 CDR은

서열번호: 8이다.

- [0140] 추가의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0141] a) QSIGST [서열번호: 24] 또는 서열번호: 24에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열;
- [0142] b) GAS [서열번호: 25] 또는 서열번호: 25에 비교하여 최대 2개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1 또는 2 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열 및
- [0143] c) QQYTWVPFT [서열번호: 26] 또는 서열번호: 26에 비교하여 최대 3개 아미노산 돌연변이, 예를 들어 1, 2 또는 3 돌연변이를 함유하는 아미노산 서열.
- [0144] 따라서, 항체 폴리펩타이드는 서열번호 24, 25 및 26의 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0145] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 1630/1631 기준 항체의 상응하는 영역의 아미노산 서열, 즉 서열번호: 20을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0146] 대안적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기에서 정의된 바와 같은 CDR들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 여기서 L1 및 L2 CDR들은 각각 서열번호: 24 및 25의 돌연변이된 버전이고, L3 CDR은 서열번호: 26이다.
- [0147] 인간 요법의 경우, 인간 또는 인간화된 항체가 바람직하게 사용된다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다. 비-인간 (예를 들어 쥐과) 항체의 인간화된 형태는 바람직하게는 비-인간 항체로부터 유래된 최소-부분을 갖는 유전자적으로 조작된 키메라 항체 또는 항체 단편이다. 인간화된 항체는 인간 항체 (수령체 항체)의 상보적 결정 영역이 원하는 기능성을 갖는 비-인간 중 (공여체 항체) 예컨대 마우스, 랫트 또는 토끼의 상보적 결정 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된 항체를 포함한다. 일부 사례에서, 인간 항체의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 인간화된 항체는 또한 수령체 항체 또는 유입된 상보성 결정 영역 또는 프레임워크 서열 어디에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 상보성 결정 영역이 비-인간 항체의 것에 상응하고, 프레임워크 영역의 모두 또는 실질적으로 모두가 관련된 인간 공통 서열의 것에 상응하는, 적어도 하나, 그리고 전형적으로 2개의 가변 도메인의 모두를 실질적으로 포함할 것이다. 인간화된 항체는 최적으로 또한 인간 항체로부터 전형적으로 유래된 항체 불변 영역, 예컨대 Fc 영역의 적어도 일부분을 포함한다 (예를 들어, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Jones 등, 1986, *Nature* **321**:522-525; Riechmann 등, 1988, *Nature* **332**:323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2**:593-596] 참고).
- [0148] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간인 공급원으로부터의 항체 안으로 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 종종 유입된 잔기로 지칭되는 이들 비-인간 아미노산 잔기는 전형적으로 유입된 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 인간 상보성 결정 영역을 상응하는 설치류 상보성 결정 영역으로 대체함에 의해 (예를 들어, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Jones 등, 1986, *Nature* **321**:522-525; Reichmann 등, 1988, *Nature* **332**:323-327; Verhoeyen 등, 1988, *Science* **239**:1534-1536; US 4,816,567] 참고) 기재된 바와 같이 본질적으로 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 인간화된 항체는 키메라성 항체이고, 여기서 실질적으로 온전한 인간 가변 도메인 미만이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 일부 상보성 결정 영역 잔기 및 가능하게는 일부 프레임워크 잔기가 설치류 항체에서의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체일 수 있다. 키메라성 항체는 Neuberger 등 (1998, *8th International Biotechnology Symposium Part 2*, 792-799)에 의해 논의된다.
- [0149] 인간 항체는 또한 파아지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 당업계에서 공지된 다양한 기술을 사용하여 확인될 수 있다 (예를 들어, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* **227**:381; Marks 등, 1991, *J. Mol. Biol.* **222**:581; Cole 등, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner 등, 1991, *J. Immunol.* **147**:86-95] 참고).
- [0150] 본 발명의 인간화된 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 불변 영역, 또는 이들의 일부를 추가로 포함할 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다 (하기 참고).

- [0151] 일 구현예에서, 항체 폴리펩타이드는 IgG 중쇄의 CH1, CH2 및/또는 CH3 영역 (예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄)를 포함한다. 따라서, 항체 폴리펩타이드는 IgG4 중쇄로부터 불변 영역의 일부 또는 모두를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 폴리펩타이드는 각각 임의의 상기-정의된 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 조합된, CH1 및 CL 불변 영역을 포함하는 Fab 단편일 수 있다.
- [0152] 마찬가지로, 본 발명의 상기-정의된 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 불변 영역, 또는 이들의 일부를 추가로 포함할 수 있다 (하기 참고). 예를 들어, 항체 폴리펩타이드는 카파 또는 람다 경쇄로부터의 CL 영역을 포함할 수 있다.
- [0153] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 항체 Fc-영역을 포함한다. Fc 부분은 IgG 항체로부터의 것일 수 있거나, 또는 상이한 부류의 항체 (예컨대 IgM, IgA, IgD 또는 IgE)로부터의 것일 수 있다는 것이 숙련된 사람에게 의해 인정될 것이다. 일 구현예에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체로부터의 것이다. 그러나, 유익하게는, Fc 영역은 IgG4 항체로부터의 것이다.
- [0154] Fc 영역은 자연발생 (예를 들어 내인성으로 생산된 항체의 일부)일 수 있거나 또는 인공적인 것 (예를 들어 자연발생 Fc 영역에 비해 1개 이상의 점 돌연변이를 포함함)일 수 있다. Fc 영역의 변이체는 전형적으로 폴리펩타이드의 개선된 기능 및/또는 반감기를 제공하는 변경된 친화성으로 Fc 수용체, 예컨대 Fc γ R 및/또는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 결합한다. 생물학적 기능 및/또는 반감기는 천연 Fc 영역을 포함하는 폴리펩타이드의 반감기에 비하여 증가되거나 또는 감소될 수 있다. 변이체 Fc 영역의 존재에 의해 조절될 수 있는 이러한 생물학적 기능의 예는 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC), 항체-의존적 세포의 식균작용 (ADCP), 보체-의존적 세포독성 (CDC), 및/또는 세포자멸사를 포함한다.
- [0155] 따라서, Fc 영역은 자연발생 (예를 들어 내인성으로 생산된 인간 항체의 일부)일 수 있거나 또는 인공적인 것 (예를 들어 자연발생 인간 Fc 영역에 비해 1개 이상의 점 돌연변이를 포함함)일 수 있다.
- [0156] 당업계에서 문서로 잘 기록된 바와 같이, 항체의 Fc 영역은 그것의 혈청 반감기 및 효과기 기능, 예컨대 보체-의존적 세포 독성 (CDC), 항체-의존적 세포의 세포독성 (ADCC) 및 항체-의존적 세포 식균작용 (ADCP)을 조정한다.
- [0157] 치료적 단클론성 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 영역을 조작하는 것은 이들에 요구되는 약리학적 활성에 보다 더 적합한 분자의 생성을 허용한다 (Strohl, 2009, *Curr Opin Biotechnol* **20**(6):685-91, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0158] (a) 증가된 반감기를 위해 조작된 Fc 영역
- [0159] 치료적 항체의 효능을 개선하기 위한 하나의 접근법은 그것의 혈청 지속성을 증가시키는 것으로, 그것에 의해 더 높은 순환 수준, 덜 빈번한 투여 및 감소된 용량을 허용한다.
- [0160] IgG의 반감기는 신생아 수용체 FcRn에 대한 그것의 pH-의존적 결합에 좌우된다. 내피 세포의 표면에 발현된 FcRn은 pH-의존 방식으로 IgG에 결합하여 이것이 분해되는 것을 방지한다.
- [0161] pH 7.4가 아닌 pH 6.0에서 FcRn에 선택적으로 결합하는 일부 항체는 다양한 동물 모델에서 더 높은 반감기를 나타낸다.
- [0162] CH2와 CH3 도메인 사이의 계면에 위치한 몇 개의 돌연변이, 예컨대 T250Q/M428L (Hinton 등, 2004, *J Biol Chem.* **279**(8):6213-6, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨) 및 M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (Vaccaro 등, 2005, *Nat. Biotechnol.* **23**(10):1283-8, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)는 생체 내에서 FcRn에 대한 결합 친화도 및 IgG1의 반감기를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0163] (b) 변경된 효과기 기능을 위해 조작된 Fc 영역
- [0164] 치료적 항체 또는 Fc 융합 단백질 적용에 의존하여, 효과기 기능 (예컨대 ADCC)을 증가시키거나 감소시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0165] 세포-표면 분자, 특히 면역 세포 상의 이들 분자를 표적으로 하는 항체의 경우, 특정 임상 징후에 대해 효과기 기능을 무효화하는 것이 필요할 수 있다.
- [0166] 4개의 인간 IgG 아이소타입은 활성화 Fc γ 수용체 (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa), 억제성 Fc γ RIIb 수용체, 및 보체의 제1 성분 (C1q)에 상이한 친화성으로 결합하여, 매우 상이한 효과기 기능을 생성한다 (Bruhns 등,

2009, *Blood*. **113**(16):3716-25, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0167] IgG4 대 IgG2의 Fc γ RI 결합 친화도

[0168] Bruhns 등은 상이한 인간 IgG 서브클래스에 대해 공지된 인간 Fc γ R들, 및 그것의 다형성 변이체의 특이성 및 친화성을 평가한 일련의 실험을 수행했다 (Bruhns 등, 2009, *Blood*. **113**(16):3716-25, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 이 연구에서, IgG2는 Fc γ RI에 대해 검출가능한 친화성을 가지지 않지만, IgG1, IgG3 및 IgG4 모두는 나노몰 범위에서 Fc γ RI에 대해 결합 친화도를 나타냈다는 것을 분명히 실증했다 (Bruhns 등, 2009, *Blood*. **113**(16):3716-25, Lu 등, 2015, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**(3):833-8, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 주요 인간 Fc γ R들 및 그것의 변이체와 IgG 아이소타입 사이의 상대적인 결합 친화도의 요약은 표 A에 요약되어 있다. (Stewart 등 2014, *J Immunother*. **2**(29), 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)

[0169] **표 A.** 인간 Fc γ R들과 IgG 아이소타입 사이의 결합 친화도

Fc γ R	IgG1	IgG2	IgG4
Fc γ RI	++++	-	++++
Fc γ RIIA H131	+++	++	++
Fc γ RIIA R131	+++	+	++
Fc γ RIIB	++	-	++
Fc γ RIIA V158	+++	+	++
Fc γ RIIA F158	++	-	++

[0170]

[0171] 그러나, 세포 활성화는 IgG 면역 복합체에 대한 Fc γ RI의 친화도에 영향을 미치고, Bruhns 논문에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 생성된 데이터는 염증성 부위에서 발생하는 것을 정확하게 재현하지 못할 수도 있다. Hogarth 등에 의한 검토 논문 (Hogarth 등 2012, *Nat Rev Drug Discov* **11**(4):311-31, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)은 이것뿐만 아니라 IgG에 대한 Fc γ R 결합에 대한 초점을 맞춘 다른 연구를 요약한다.

[0172] 골수 세포 서브셋 상에 Fc γ RI 발현

[0173] 인간 Fc γ R들은 주로 순환하는 골수 세포 서브셋에 대한 수많은 연구에서 실증된 골수 계열의 세포에 의해 발현된다. 일반적으로 CD14⁺ CD16⁻으로 확인된 고전적 단핵구는 높은 수준의 Fc γ RII (CD32), 중간 수준의 Fc γ RI 및 낮은 수준의 Fc γ RIII (CD16)을 나타낸다 (Almeida 등 2001, **100**(3):325-38, Cheeseman 등 2016, *PLoS One* **11**(5):e0154656, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). CD14⁻ CD16⁺ 비-고전적 단핵구는 그러나 높은 수준의 Fc γ RIII, 중간 수준의 Fc γ RII 및 낮은 수준의 Fc γ RI를 나타낸다 (Almeida 등 2001). 상이한 골수 세포 서브셋 상에 인간 Fc γ R 유전자의 발현을 나타내는 몇 개의 공개된 마이크로어레이 데이터 세트의 요약 및 편집은 이들 관찰을 확인한다 (Guilliams 등 2014, *Nat Rev Immunol*. **14**(2):94-108, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0174] 일단 조직 내에서, 단핵구가 대식세포로 분화하면, 환경 신호에 의존하여, 이들 대식세포는 특이적 표현형을 수득한다. Roussel 등에 의한 연구 (Roussel 등 2017, *J Leukoc Biol*. **102**(2):437-447, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)에서, 말초 혈액 단핵구는 평가된 이들 세포의 다양한 염증성 자극 및 발현 프로파일을 사용함에 의해 상이한 대식세포 계열로 분극화된다. 여기서, IFN- γ 자극된 단핵구는 구체적으로 CD64의 고도로 상승된 발현을 초래했다. 증가된 CD64 발현이 인터페론-자극된 유전자의 발현과 상관된, 순환하는 CD14⁺ 단핵구 상에서 검출된 SLE 환자에서 유사한 관찰이 이루어 졌다 (Li 등 2010, *Arthritis Res Ther* **12**(3): R90, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0175] 다양한 인간 종양 내에 골수 세포 침윤

[0176] 다양한 골수 세포 서브셋 예컨대 염증성 단핵구, 단구성 골수-유래된 억제 세포 (MDSC) 및 대식세포는 수많은 연구에서 암 환자에 축적된다는 것이 밝혀졌다 (Solito 등 2014, *Ann N Y Acad Sci* **1319**:47-65., Hu 등 2016, *Clin Transl Oncol*. **18**(3):251-8, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 비록 최근 시도는 이들 세포의 특성구명을 표준화하기 위한 전략을 제시하는 것을 목적으로 하지만 (Bronte 등 2016, *Nat Commun*.

7:12150, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨), 이들 세포 모집단의 많은 표현형 정의가 여전히 문헌 전반에 걸쳐 발견될 수 있다 (Elliott 등 2017, Front Immunol. **8**:86, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 가장 통상적으로, 이들 세포는 마커 CD11b, CD14, CD33의 발현과 HLA-DR의 낮은 발현에 의해 정의된다 (단구성 MDSC)(Bronte 등2016). 추가로, 종양-관련된 대식세포 (TAM)는 통상적으로 CD64 및 CD68 (M1-분극된, 항-종양형성), 또는 CD163 및 CD206 (M2-분극된, 프로-종양형성)의 발현에 의해 확인된다 (Elliott 등 2017).

[0177] Elliott 등에 의한 최근 검토 (상기 언급됨)는 암 환자에서 골수 세포 서브셋을 동정하기 위해 사용된 수많은 표현형을 요약한다. 대부분의 이들 연구는 순환하는 세포에 대한 그것의 분석에 집중되었고 골수 CD11b⁺ 세포의 증가된 빈도는 예를 들어 방광, 유방, 결장직장, 간세포, 췌장, 전립선 및 신장 세포 암종이 있는 환자의 혈액에서 관측되었다 (Solito 등 2014, Elliott 등 2017). 다른 연구는 또한 종양 조직 안으로 이들 세포의 침윤 수준을 특징화하기 위해 시도하였다. 결장직장 종양에서, CD14⁺ CD169⁺ 세포의 높은 빈도가 관측되었다. 이들 세포는 또한 CD163 및 CD206을 발현하였고 따라서 M2-분극된 TAM인 것으로 제안되었다 (Li 등 2015, PLoS One **10**(10):e0141817, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 결장직장암 환자에서의 또 다른 연구는 또한 건강한 개체에 비교하여 CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR⁻ 세포의 증가된 수를 검출했다 (Zhang 등 2013, PLoS One **8**(2):e57114, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0178] 유사하게, CD11b⁺ 골수 세포는 또한 모든 유핵 세포의 10-20%를 차지하는 방광 종양에서 확인되었다 (Eruslanov 등 2012, Int J Cancer **130**(5):1109-19, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). CD11b⁺ 세포의 더욱더 높은 빈도는 CD45⁺ 세포의 60% 이상이 CD11b⁺ CD15⁺ CD33⁺인 췌장암에서 관측되었다 (Porembka 등2012, Cancer Immunol Immunother **61**(9):1373-85, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 또한, 하나의 연구는 비-소세포 폐암종 내의 주요 골수 세포 모집단이 CD11b⁺ CD15⁺ CD66b⁺ 중성구-유사 모집단이라는 결론을 내렸다. 흥미롭게도, 일단 이들 세포가 혈액으로부터 종양 조직으로 이주하면, 이들 세포는 상향조절된 FcγRI를 포함하여 변경된 발현 프로파일을 나타낸다 (Eruslanov 등 2014, J Clin Invest. **124**(12):5466-80, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

[0179] 종양-침윤하는 세포 상의 FcγRI 발현

[0180] 비록 수많은 연구가 인간 종양 내에 골수 세포의 높은 침윤을 확인하였지만, 어떤 연구도 이들 세포 상에 FcγRI들의 발현을 상세히 철저하게 탐구하지 않았다. 그러나, 몇 개의 간행물은 종양 조직 내에 FcγRI-발현 세포의 존재를 실증하였다.

[0181] Morimura 등에 의한 연구 (Morimura 등 1990, Acta Neuropathol. **80**(3):287-94, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)는 면역세포화학에 의해 12개 인간 샘플로부터 신경아교종을 평가하고 종양주위 대조군 조직에 이들을 비교했다. 이 연구는 종양주위 조직에 비교하여 신경아교종에서 (마커 CD163, RM3/1을 사용하여) 대식세포의 높은 존재뿐만 아니라 FcγRI 및 FcγRII (CD32)에서의 증가를 실증했다. Griesinger 등에 의한 보다 최근의 연구 (Griesinger 등 2013, J Immunol. **191**(9):4880-8, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)는 다양한 소아 뇌종양 유형의 유세포측정 분석을 수행함에 의해 이들 관찰을 확인하였다. 여기서, CD45⁺ CD11b⁺ 골수 세포의 높은 빈도가 모양세포성 별아교세포종 및 뇌실막세포종 환자로부터의 조직에 대해 관측되었다. 이들 세포는 또한 높은 수준의 FcγRI를 발현하였다.

[0182] 뇌종양에 부가하여, FcγRI 발현은 또한 다른 유형의 종양에 대해서 관찰되었다. Grugan 등 (Grugan 등 2012, J Immunol. **189**(11):5457-66, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨)은 인간 유방 종양 조직 내에서 CD11b⁺ CD14⁺ 세포의 존재를 실증했다. 이들 세포는 높은 수준의 FcγRI 및 FcγRIIa 뿐만 아니라 FcγRIIb 및 FcγRIII를 발현하는 것으로 관찰되었다. 또한, CD45⁺ CD11b⁺ CD14⁺ CD68⁺ TAM은 FcγRI의 발현을 나타내는 위장 간질성 종양에서 확인되었다 (Cavnar 등 2013, J Exp Med. **210**(13):2873-86, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). CD45⁺ CD11b⁺ FcγRI⁺ 세포는 또한 결장직장암 환자에서 확인되었고 이들 세포는 건강한 대조군 조직에 비교하여 종양 조직에서 FcγRI의 더 높은 발현을 나타냈다 (Norton 등 2016, Clin Transl Immunology. **5**(4):e76, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). FcγRI 발현은 흑색종 전이에 대해서 또한 실증되었다 (Hansen 등2006, Acta Oncol **45**(4):400-5, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).

- [0183] Fc γ R들 또는 C1q에 IgG의 결합은 힌지 영역 및 CH2 도메인에 위치한 잔기에 좌우된다. CH2 도메인의 두 영역은 Fc γ R들 및 C1q 결합에 중요하고 IgG2 및 IgG4에 고유의 서열을 갖는다. 위치 233-236에서 IgG2 잔기 및 위치 327, 330 및 331에서 IgG4 잔기의 인간 IgG1로의 치환은 ADCC 및 CDC를 크게 감소시키는 것으로 나타났다 (Armour 등, 1999, *Eur J Immunol.* **29**(8):2613-24; Shields 등, 2001, *J Biol Chem.* **276**(9):6591-604, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 게다가, Idusogie 등은 K322를 포함하여 상이한 위치에서 알려진 치환은 보체 활성화를 상당히 감소시켰다는 것을 실증했다 (Idusogie 등, 2000, *J Immunol.* **164**(8):4178-84, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 유사하게, 젯과 IgG2A의 CH2 도메인에서 돌연변이는 Fc γ RI, 및 C1q에 대한 결합을 감소시키는 것으로 나타났다 (Steurer. 등, 1995. *J Immunol.* **155**(3):1165- 74, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0184] 수많은 돌연변이가 인간 IgG1의 CH2 도메인에서 이루어졌고 ADCC 및 CDC에 대한 그것의 효과가 시험관내에서 시험되었다 (상기에 인용된 참조문헌 참고). 현재, 위치 333에서 알려진 치환은 ADCC 및 CDC 둘 모두를 증가시키는 것으로 보고되었다 (Shields 등, 2001 (상동); Steurer 등, 1995 (상동)). Lazar 등은 향상된 ADCC를 초래하는 Fc γ RIIIa에 대해 더 높은 친화성과 Fc γ RIIb에 대해 더 낮은 친화성을 갖는 삼중 돌연변이체 (S239D/I332E/A330L)를 기재했다 (Lazar 등, 2006, *PNAS* **103**(11):4005-4010, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). 증가된 ADCC를 갖는 항체를 생성하기 위해 동일한 돌연변이가 사용되었다 (Ryan 등, 2007, *Mol. Cancer Ther.* **6**:3009-3018, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨). Richards 등은 대식세포에 의해 표적 세포의 향상된 식균작용을 조정하는 개선된 Fc γ RIIIa 친화성과 Fc γ RIIa/Fc γ RIIb 비를 갖는 약간 상이한 삼중 돌연변이체 (S239D/I332E/G236A)를 연구했다 (Richards 등, 2008. *Mol Cancer Ther.* **7**(8):2517-27, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0185] 그것의 효과기 기능의 결핍에 기인하여, IgG4 항체는 세포 고갈 없이 수용체 조절에 대한 바람직한 IgG 서브클래스를 나타낸다. IgG4 분자는 일명 Fab-아암 교환인 동적 과정에서 절반-분자를 교환할 수 있다. 이 현상은 또한 생체내에서 치료적 항체와 내인성 IgG4 사이에서 발생할 수 있다.
- [0186] S228P 돌연변이는 덜 예측할 수 없는 치료적 IgG4 항체의 디자인을 허용하는 이 재조합 공정을 방지하는 것으로 밝혀졌다 (Labrijn 등, 2009, *Nat Biotechnol.* **27**(8):767-71, 그것의 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입됨).
- [0187] 추가 구현예에서, Fc 영역의 효과기 기능은, 예를 들어, 생산 동안 푸코스, 갈락토스의 상대적인 수준을 변형시키고, N-아세틸글루코사민 및/또는 시알산을 이분시킴에 의해, 그 안의 CH2 도메인 내의 탄수화물 모이어티의 변형을 통해 변경될 수 있다 (그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입됨, 문헌 [Jefferis, 2009, *Nat Rev Drug Discov.* **8**(3):226-34] 및 [Raju, 2008, *Curr Opin Immunol.*, **20**(4):471-8] 참고)
- [0188] 따라서, Fc 영역에서 푸코스 잔기를 결하거나 낮은 치료적 항체는 인간에서 향상된 ADCC 활성을 나타낸다는 것이 공지되어 있다 (예를 들어, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입됨, 문헌 [Peipp 등, 2008, *Blood* **112**(6):2390-9, Yamane-Ohnuki & Satoh, 2009, *MAbs* **1**(3):230-26, Iida 등, 2009, *BMC Cancer* **9**:58] 참고). 낮은 푸코스 항체 폴리펩타이드는 키프넨신과 같은 만노시다제의 억제제를 함유하는 배지에서 배양된 세포에서 발현에 의해 생산될 수 있다 (하기 실시예 I 참고).
- [0189] 낮은 푸코스 형식으로 항체의 당화를 변형시키는 다른 방법은 람노오스를 대사시킬 수 없는 세포에서 박테리아 효소 GDP-6-데옥시-D-리소-4-헥솔로스 환원효소의 사용을 포함한다 (예를 들어 독일 베를린 소재의 ProBioGen AG의 GlymaxX® 기술을 사용함).
- [0190] 낮은 푸코스 항체를 만드는 또 다른 방법은 항체-생산 세포에서 알파-(1,6)-푸코실전달효소의 억제 또는 고갈에 의한다 (예를 들어 스위스 바젤 소재의 Lonza Ltd의 Potelligent® CHOK1SV 기술을 사용함).
- [0191] (완전한 중쇄를 형성하기 위해) 본 명세서에 개시된 임의의 VH 영역 서열과 조합될 수 있는 예시적인 중쇄 불변 영역 아미노산 서열은 여기서 재현된 IgG1 중쇄 불변 영역 서열이다:
- [0192] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKSLSPGK
- [0193] [서열번호:12]
- [0194] 다른 중쇄 불변 영역 서열이 당해 기술에 공지되어 있고 또한 본 명세서에 개시된 임의의 VH 영역과 조합될 수

있다. 예를 들어, 상기에서 나타낸 바와 같이, 바람직한 불변 영역은 예컨대 여기서 재현된 변형된 IgG4 불변 영역이다:

[0195] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSK
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0196] [서열번호:13]

[0197] 이 변형된 IgG4 서열은 IgG4의 코어 힌지의 안정화를 초래하여, IgG4를 보다 안정하게 하고, Fab 아암 교환을 방지한다.

[0198] 또 다른 바람직한 불변 영역은 예컨대 여기서 재현된 변형된 IgG4 불변 영역이다:

[0199] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSK
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCS
VMHEALHNRYTQKSLSLGLGK

[0200] [서열번호: 14]

[0201] 이 변형된 IgG4 서열은 감소된 FcRn 결합을 나타내고 따라서 야생형 IgG4에 비하여 감소된 혈청 반감기를 초래한다. 또한, 이것은 IgG4의 코어 힌지의 안정화를 나타내어 IgG4를 보다 안정하게 하고, Fab 아암 교환을 방지한다.

[0202] 또한 본 발명의 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 것은 예컨대 여기서 재현된 야생형 IgG4 불변 영역이다:

[0203] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKY
GPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSK
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0204] [서열번호:15]

[0205] (완전한 경쇄를 형성하기 위해) 본 명세서에 개시된 임의의 VL 영역 서열과 조합될 수 있는 예시적인 경쇄 불변 영역 아미노산 서열은 여기서 재현된 카파 사슬 불변 영역 서열이다:

[0206] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

[0207] [서열번호:16]

[0208] 다른 경쇄 불변 영역 서열이 당해 기술에 공지되어 있고 또한 본 명세서에 개시된 임의의 VL 영역과 조합될 수 있다.

[0209] 본 발명의 예시적인 구현예에서, 항체 폴리펩타이드는 각각 서열번호: 13 및 16의 IgG4 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0210] 따라서, 본 발명의 예시적인 항체 폴리펩타이드는 하기를 포함한다:

[0211] (a) 서열번호: 13의 불변 영역과 함께 서열번호: 1의 가변 영역을 포함하는 중쇄; 및

[0212] (b) 서열번호: 16의 불변 영역과 함께 서열번호: 2의 가변 영역을 포함하는 경쇄.

[0213] 예를 들어, 항체 폴리펩타이드는 서열번호: 17의 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 서열번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 2개의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 온전한 IgG4 분자일 수 있다.

[0214] 본 발명의 대안적인 예시적 폴리펩타이드는 하기를 포함한다:

[0215] (a) 서열번호: 13의 불변 영역과 함께 서열번호: 19의 가변 영역을 포함하는 중쇄; 및

[0216] (b) 서열번호: 16의 불변 영역과 함께 서열번호: 20의 가변 영역을 포함하는 경쇄.

- [0217] 예를 들어, 항체 폴리펩타이드는 서열번호: 29의 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 서열번호: 30의 아미노산 서열을 갖는 2개의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 온전한 IgG4 분자일 수 있다.
- [0218] 본 발명의 제1 및 제2 양태의 일 구현예에서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 "융합" 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다.
- [0219] 약동학적 특성을 개선하기 위해 모이어티에 융합되는 것에 부가하여, 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 상기 폴리펩타이드의 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩타이드 예컨대 글루타티온-S-전달효소 (GST) 또는 단백질 A에 융합될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 이러한 융합의 예는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다. 유사하게, 상기 폴리펩타이드는 올리고-히스티딘 태그, 예컨대 His6, 또는 항체에 의해 인식되는 에피토프 예컨대 공지된 Myc 태그 에피토프에 융합될 수 있다. 상기 폴리펩타이드의 임의의 변이체 또는 유도체에 대한 융합은 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 바람직한 특성, 예컨대 IL-1R 결합 특성 또는 *생체내* 반감기를 보유하거나 또는 개선하는 융합 (또는 이들의 변이체, 유도체 또는 융합)이 바람직하다는 것이 인정될 것이다.
- [0220] 따라서, 융합은 본 발명의 상기 폴리펩타이드에 바람직한 특성을 부여하는 추가의 부분과 함께 상술한 바와 같은 아미노산 서열을 포함할 수 있다; 예를 들어 상기 부분은 폴리펩타이드를 검출 또는 분리하거나 또는 폴리펩타이드의 세포 흡수를 촉진시키는데 유용할 수 있다. 상기 부분은 예를 들어 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 바와 같은, 바이오틴 모이어티, 방사성 모이어티, 형광 모이어티, 예를 들어 작은 형광단 또는 녹색 형광 단백질 (GFP) 형광단일 수 있다. 상기 모이어티는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같은 면역원성 태그, 예를 들어 Myc 태그 일 수 있거나 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이 폴리펩타이드의 세포 흡수를 촉진할 수 있는 친유성 분자 또는 폴리펩타이드 도메인일 수 있다.
- [0221] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 변형 또는 유도되어 진 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나 또는 이들로 구성될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.
- [0222] 1개 이상의 아미노산의 화학적 유도체는 관능 측면 기와 반응에 의해 달성될 수 있다. 이러한 유도된 분자는, 예를 들어, 유리 아미노기가 아민 하이드로클로라이드, *p*-톨루엔 설폰닐기, 카복시벤즈옥시기, *t*-부틸옥시카보닐기, 클로로아세틸기 또는 포르밀기를 형성하도록 유도된 이들 분자를 포함한다. 유리 카복실기는 염, 메틸 및 에틸 에스테르 또는 다른 유형의 에스테르 및 하이드라자이드를 형성하도록 유도될 수 있다. 유리 하이드록실기는 0-아실 또는 0-알킬 유도체를 형성하도록 유도될 수 있다. 또한 화학적 유도체로서 20가지 표준 아미노산의 자연발생 아미노산 유도체를 함유하는 이들 펩타이드가 포함된다. 예를 들어: 4-하이드록시프롤린은 프롤린에 대해 치환될 수 있다; 5-하이드록실라이신은 라이신에 대해 치환될 수 있다; 3-메틸히스티딘은 히스티딘에 대해 치환될 수 있다; 호모세린은 세린에 대해 치환될 수 있고 오르니틴은 라이신에 대해 된다. 유도체는 또한 필수 활성이 유지되는 한 1개 이상의 첨가 또는 결실을 함유하는 펩타이드를 포함한다. 다른 포함된 변형은 아미드화, 아미노 말단 아실화 (예를 들어 아세틸화 또는 티오글리콜산 아미드화), 말단 카복실아미드화 (예를 들어 암모니아 또는 메틸아민으로), 및 기타 동종의 말단 변형이다.
- [0223] 펩타이드모사체 화합물이 또한 유용할 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 추가로 인정될 것이다. 용어 '펩타이드모사체'는 치료제로서 특정 펩타이드의 형태 및 바람직한 특성을 모방하는 화합물을 지칭한다.
- [0224] 예를 들어, 상기 폴리펩타이드는 아미노산 잔기가 펩타이드 (-CO-NH-) 연결기에 의해 연결된 분자뿐만 아니라 펩타이드 결합이 역전된 분자를 포함한다. 이러한 레트로-인버스 펩타이드모사체는 당해 분야에서 공지된 방법, 예를 들어 예컨대, 문헌 [Mezire 등 (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237]에 기재된 것들을 사용하여 제조될 수 있고, 이것은 본 명세서에 참고로 편입된다. 이 접근법은 측쇄의 배향이 없이 백본을 포함하는 변화를 함유하는 슈도-펩타이드를 제조하는 것을 포함한다. CO-NH 펩타이드 결합 대신에 NH-CO 결합을 함유하는 레트로-인버스 펩타이드가 단백질 분해에 대해 훨씬 더 저항성이다. 대안적으로, 상기 폴리펩타이드는 아미노산 잔기 중 1개 이상이 통상적인 아미드 연결 대신에 -y(CH₂NH)- 결합에 의해 연결된 펩타이드모사체 화합물일 수 있다.
- [0225] 추가의 대안에 있어서, 펩타이드 결합은 아미노산 잔기의 탄소 원자 사이의 간격을 보유하는 적절한 링커 모이어티가 사용된다면 전적으로 분배될 수 있다; 펩타이드 결합과 실질적으로 동일한 전하 분포 및 실질적으로 동일한 평면성을 가지는 것이 링커 모이어티에 유리할 수 있다.
- [0226] 상기 폴리펩타이드는 외부-단백질분해 소화에 대한 감수성을 감소시키기 위해 그것의 N- 또는 C-말단에서 편리하게 차단될 수 있다는 것이 또한 인정될 것이다.
- [0227] D-아미노산 및 N-메틸 아미노산과 같이 다양한 비-코딩된 또는 변형된 아미노산이 또한 포유동물 펩타이드를 변

형식시키기 위해 사용되었다. 또한, 추정된 생물활성 형태는 공유 변형, 예컨대 고리화에 의해 또는 락탐이나 다른 유형의 브릿지의 편입에 의해 안정화될 수 있으며, 예를 들어 본 명세서에 참고로 편입된, 문헌 [Veber 등, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2636] 및 [Thursell 등, 1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111:166]을 참고한다.

[0228] 전형적으로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 '네이키드' 항체 폴리펩타이드, 즉 임의의 추가의 기능적 모이어티 예컨대 세포독성 또는 검출가능한 모이어티가 없을 것이다. 예를 들어, 치료 효과가, 예를 들어 염증을 감소시키기 위해, 면역 세포 상에 본 발명의 항체의 직접적인 효과에 의해 매개되는 경우, 임의의 세포독성 활성을 결하는 것이 항체에 유리할 수 있다.

[0229] 그러나, 대안적인 구현예에서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 예를 들어 진단 (예를 들어 생체내에서 이미징형성) 제제 또는 치료 제제로서 그것의 의도한 용도를 용이하게 하기 위해 작용성 모이어티로 증강될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 항체 폴리펩타이드는 치료적 모이어티에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 적합한 치료적 모이어티는 암 세포 (또는 관련된 줄기세포 또는 선조세포) 성장을 감소 또는 억제할 수 있거나 또는 특히 사멸할 수 있는 것이다. 예를 들어, 치료제는 세포독성 모이어티, 예컨대 방사선동위원소 (예를 들어 ^{90}Y , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, 등) 또는 세포독성 약물 (예를 들어 항대사물질, 독소, 세포증식억제성 약물, 등)일 수 있다.

[0230] 대안적으로, 세포독성 모이어티는 활성화 요법, 예컨대 광자 활성화 요법, 중성자 활성화 요법, 중성자-유도된 오제 전자 요법, 싱크로트론 조사 요법 또는 저에너지 X-선 광자 활성화 요법에 사용하기에 적합한 1개 이상의 모이어티를 포함할 수 있거나 또는 이들로 구성될 수 있다.

[0231] 선택적으로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 검출가능 모이어티를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 검출가능 모이어티는 방사선동위원소, 예컨대 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I 및 ^{201}Tl 로 구성된 군으로부터 선택된 방사선동위원소를 포함할 수 있거나 또는 이들로 구성될 수 있다 선택적으로, 제제는 한 쌍의 검출가능하고 세포독성인 방사선헤중, 예컨대 $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ 또는 $^{124}\text{I}/^{211}\text{At}$ 를 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 항체 폴리펩타이드는 소위 "다양식의 치료진단"을 제공하기 위해 검출가능 모이어티로서 그리고 또한 세포독성 모이어티로서 다중-봉 방식으로 동시에 작용할 수 있는 방사선동위원소를 포함할 수 있다. 결합 모이어티는 따라서 세포독성 약물, 예컨대 방사선헤중 또는 화학요법 제제를 사용한 치료적 능력과 함께 다중-이미지형성 (예를 들어, SPECT, PET, MRI, 광학, 또는 초음파)의 능력을 가지는 나노입자에 커플링될 수 있다.

[0232] 치료적 및/또는 검출가능한 모이어티 (예컨대 방사선동위원소, 세포독성 모이어티 등)은 항체 또는 이의 단편에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 적합한 링커는 당해 기술에 공지되어 있고 그리고, 예를 들어, 보결분자단, 비-페놀계 링커 (N-석시미딜-벤조에이트의 유도체; 도데카보레이트), 거대환화합물 및 비환형 킬레이터 양자의 킬레이팅 모이어티, 예컨대 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10,테트라아세트산 (DOTA)의 유도체, 데페록사민 (DFO), 디에틸렌트리아민펜타아세트산 아비드 (DTPA)의 유도체, S-2-(4-이소티오시아나토벤질)-1,4,7-트리아자사이클로노난-1,4,7-트리아세트산 (NOTA)의 유도체 및 1,4,8,11-테트라아자사이클로도세단-1,4,8,11-테트라아세트산 (TETA)의 유도체, 3,6,9,15-테트라아자바이사이클로[9.3.1]-펜타데카-1(15),11,13-트리엔-4-(S)-(4-이소티오시아나토-벤질)-3,6,9-트리아세트산 (PCTA)의 유도체, 5-S-(4-아미노벤질)-1-옥사-4,7,10- 트리아자사이클로도데칸-4,7,10-트리스(아세트산) (DO3A)의 유도체 및 다른 킬레이팅 모이어티를 포함한다.

[0233] 하나의 바람직한 링커는, 예를 들어 ^{177}Lu -DTPA-[본 발명의 항체 폴리펩타이드]에서 사용된 바와 같은 DTPA이다. 추가의 바람직한 링커는, 예를 들어 ^{89}Zr -DFO-[본 발명의 항체 폴리펩타이드]에서 사용된 바와 같은, 데페록사민인 DFO이다.

[0234] 그러나, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 많은 의료적 용도는 세포독성 또는 진단 모이어티의 존재를 필요로 하지 않을 것이라는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.

[0235] 상기에 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 생산 방법은 당해 기술에 공지되어 있다.

[0236] 편리하게, 항체 폴리펩타이드는 재조합 폴리펩타이드이거나 또는 포함한다. 이러한 재조합 폴리펩타이드의 생산을 위한 적합한 방법은 원핵 또는 진핵생물 숙주 세포에서 발현과 같이 당해 분야에서 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌에서 관련된 개시내용은 참고로 본 명세서에 편입되는, 문헌 [Green & Sambrook, 2012, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Fourth Edition, Cold Spring Harbor, New York] 참고).

- [0237] 항체는 다클론성 항체일 수도 있지만, 항체가 단클론성 항체인 경우, 또는 항원-결합 단편, 변이체, 융합 또는 이의 유도체가 단클론성 항체로부터 유래된 것이 바람직하다.
- [0238] 적합한 단클론성 항체는 공지된 기술, 예를 들어 문헌 [*"Monoclonal Antibodies: A manual of techniques"*, H Zola (CRC Press, 1988)] 및 [*"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application"*, SGR Hurrell (CRC Press, 1982)]에 개시된 것에 의해 제조될 수 있다. 폴리-특이적 또는 모노-특이적인 다클론성 항체가 생산될 수 있다. 바람직하게는, 이들은 모노-특이적이다.
- [0239] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 또한 상업적으로 입수가 가능한 시험관내 번역 시스템, 예컨대 토끼 망상적혈구 용해물 또는 밀맥아 용해물 (Promega로부터 이용가능함)을 사용하여 생산될 수 있다. 바람직하게는, 번역 시스템은 토끼 망상적혈구 용해물이다. 편리하게, 번역 시스템은 전사 시스템, 예컨대 TNT 전사-번역 시스템 (Promega)에 커플링될 수 있다. 이 시스템은 번역과 동일한 반응에서 인코딩 DNA 폴리뉴클레오타이드로부터 적합한 mRNA 전사체를 생산하는 이점을 가진다.
- [0240] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 대안적으로 예를 들어 잘 알려진 액체-상 또는 고상 합성 기술 (예컨대 *t*-Boc 또는 Fmoc 고체상 펩타이드 합성)을 사용하여 인공적으로 합성될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.
- [0241] 본 발명의 제3 양태는 본 발명의 제1 및 제2 양태의 항체 또는 항원-결합 단편 또는 이들의 폴리펩타이드 사슬 성분을 인코딩하는 단리된 핵산분자를 제공한다. "핵산 분자"에 본 발명자들은 단일- 또는 이중-가닥일 수 있는 DNA (예를 들어 게놈 DNA 또는 상보적 DNA) 및 mRNA 분자를 포함시킨다. "단리된"으로는 본 발명자들은 핵산 분자가 세포 내에 위치 또는 달리는 제공되지 않는다는 것을 의미한다.
- [0242] 일 구현예에서, 핵산 분자는 cDNA 분자이다.
- [0243] 바람직하게는, 핵산 분자는 아래에 재현된, 서열번호: 9 및 서열번호: 10 중 어느 하나로부터 선택된 1개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0244] "1630"의 VH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열
- [0245] GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTGGTTACTCTTACATG
TCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGGTCTCATCTATTGGTTCTGTTCTTACACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC
ACCATCTCCCGTGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCGTTTACTCTCT
CCGGGTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCA [서열번호:9]
- [0246] "1631"의 VL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열
- [0247] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGTCACCATCACTTGCCGGGAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTATTACTGTCAACAGTACTACACTTGGGTTCGTTCACTTTGGCCAGGGG
ACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0248] [서열번호:10]
- [0249] 대안적인 바람직한 구현예에 있어서, 핵산 분자는 아래에 재현된, 서열번호: 27 및 서열번호: 28 중 어느 하나로부터 선택된 1개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0250] "2674"의 VH 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열
- [0251] gaggtgcagttgttggaaatctggcggaggattggtgcagcctggcggatctctgagactgtcttgtgccgcctctggcttcaacttcggctactcctacatg
tcttgggtccgacaggtcctggcaaggactggaatgggtgtcctccatcggtccaccagctctcacacctactacgccgatccgtgaagggcagattc
accatcagccgggacaactccaagaacacctgtacctgcagatgaactccctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgtgccagagtgtactcctct
cctggcatcgattattggggccagggcacactgggtcaccgtgtcctctgcttctaccaagggaccctctgtgttccctctggctccttctgctccagatccacc
tctgagctctaccgctgctctgggctgcttgggtcaaggattacttctgagcctgtgaccgtgtcttggaaactccggtgctctgacatccggcgtgcacaca
tttccagctgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctctgtcgtgaccgtgccttctagctctctgggcaccaagacctacacctgtaacgtggac
cacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgctggaatctaagtacggccctccatgtccaccatgtcctgctccagaattcctcggcggaccaagcgtg
ttcctgtttcctccaagcctaaggacacctgatgatctctcggaacctgaagtacgtgcgtgggtggatgtgtctcaagaggaccagaagtgcag
ttcaattggtagctggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagttcaactccacctacagagtgggtgtccgtgctgaccgtg
ctgcaccaggattggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccttcagcatcgaaaagacctctccaaggctaagggccag

cctcggaacctcaggtttacacctgcctccaagccaagaggaatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggtttctaccttccgat
atcgccgtgggaatgggagctaacggccagccagagaacaactacaagacaacccctcctgtgctggactccgacggctctttcttctgtattctcgccgtg
accgtggacaagtctcggtggcaagagggaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcc
ctgggcaag

[0252] [서열번호: 27]

[0253] "2675"의 VL 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열

[0254] gacatccagatgacccagctctccatctctctgtctgcctctgtggcgacagagtgacccatcacctgtcgggtttctcagttccatcggcagcacccctgaac
tgggtatcagcagaagcctggcaaggccctaaagctgctgatctatggcgctagctctctgacgtctggcgtgcctctagattttccggctctggctctggc
accgacttcaccctgacaatcagttccctgcagcctgaggacttcgccacctactactgccagcagtagtactacacctgggtgcctttacctttggccagggc
accaagctggaaatcaagagaaccgtggccgctccttccgtgttcatcttccaccatctgacgagcagctgaagtcggcacagcttctgtcgtgtgcctg
ctgaacaacttctacctcgggaagccaaggtgcagtggaaggtggacaatgcctgcagtcgggcaactccaagagctgtgacccgagcaggactccaag
gactctacctacagcctgtcctccactgacctgtctaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggactgtctagc
cccgtgaccaagtccttcaacagaggcgagtgt

[0255] [서열번호: 28]

[0256] 핵산 분자는 특정 숙주 세포에서 항체 폴리펩타이드의 발현을 위해, 예를 들어 인간 세포에서 발현을 위해 코
돈-최적화될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다 (예를 들어, 그것의 개시내용은 본 명세
서에 참고로 편입되는, 문헌 [Angov, 2011, *Biotechnol. J.* 6(6):650-659] 참고).

[0257] 또한 하기가 본 발명의 범위 내에 포함된다:

[0258] (a) 본 발명의 제4 양태는 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터 (예컨대 발현 벡터)를 제공한
다;

[0259] (b) 본 발명의 제5 양태는 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산 분자 또는 본 발명의 제4 양태에 따른 벡터를 포함
하는 숙주 세포 (예컨대 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포, 또는 차이니즈 햄스터 난소 세포, 예를 들어
CHOK1SV 세포)를 제공한다; 및

[0260] (c) 본 발명의 제6 양태는 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 폴리펩타이드를 제조하는 방법으로, 상기 폴
리펩타이드가 발현되는 조건하에서 본 발명의 제5 양태에 따른 숙주 세포의 모집단을 배양하는 단계 및 이로부
터 폴리펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0261] 본 발명의 제7 양태는 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 항원-결합 단편의 약제학적 유효량 및 약제
학적으로-허용가능한 희석제, 담체, 아쥘란트 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0262] 킬레이트제 예컨대 EDTA, 시트레이트, EGTA 또는 글루타티온을 비롯한 추가의 화합물이 또한 본 약제학적 조성
물에 포함될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.

[0263] 충분히 저장 안정적이고 인간 및 동물에 투여하기에 적합한 약제학적 조성물이 당업계에서 공지된 방식으로 제
조될 수 있다. 예를 들어, 본 약제학적 조성물은, 예를 들어 동결 건조, 분무 건조, 분무 냉각을 통하거나, 또
는 초임계 입자 형성으로부터 입자 형성의 사용을 통해 동결건조될 수 있다.

[0264] "약제학적으로 허용가능한"으로는 본 발명자들은 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 CD137-결합 활성의 유효성을
감소시키지 않는 무독성 물질을 의미한다. 이러한 약제학적으로 허용가능한 완충액, 캐리어 또는 부형제는 당업
계에서 공지되어 있다 (그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Remington's Pharmaceutical
Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) and handbook of
Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참고).

[0265] 용어 "완충액"은 pH를 안정화시킬 목적을 갖는 산-염기 혼합물을 함유하는 수용액을 의미하는 것으로 의도된다.
완충액의 예는 트리즈마, 바이신, 트리신, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 포스페이트, 카보네
이트, 아세테이트, 시트레이트, 글라이콜레이트, 락테이트, 보레이트, ACES, ADA, 타르트레이트, AMP, AMPD,
AMPSO, BES, CABS, 카코딜레이트, CHES, DIPSO, EPPS, 에탄올아민, 글리신, HEPPSO, 이미다졸,
이미다졸락트산, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO 및 TES이다.

[0266] 용어 "희석제"는 약제학적 제제에 항체 폴리펩타이드를 희석시킬 목적을 갖는 수성 또는 비-수성 용액을 의미하

는 것으로 의도된다. 희석제는 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 오일 (예컨대 잇꽃 오일, 옥수수 오일, 땅콩 오일, 목화씨 오일 또는 참깨 오일) 중 1개 이상일 수 있다.

[0267] 용어 "아주반트"는 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 생물학적 효과를 증가시키기 위해 제형에 첨가된 임의의 화합물을 의미하는 것으로 의도된다. 아주반트는 상이한 음이온을 갖는 아연, 구리 또는 은 염, 예를 들어, 비제한적으로 상이한 아실 조성의 플루오라이드, 염화물, 브로마이드, 아이오다이드, 티오시아네이트, 설페이트, 하이드록사이드, 포스페이트, 카보네이트, 락테이트, 글라이콜레이트, 시트레이트, 보레이트, 타르트레이트, 및 아세테이트 중 1개 이상일 수 있다. 아주반트는 또한 양이온성 폴리머 예컨대 양이온성 셀룰로스 에테르, 양이온성 셀룰로스 에스테르, 탈아세틸화된 하이알루론산, 키토산, 양이온성 텐드리머, 양이온성 합성 폴리머 예컨대 폴리(비닐 이미다졸), 및 양이온성 폴리펩타이드 예컨대 폴리히스티딘, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 및 이들 아미노산을 함유한 펩타이드일 수 있다.

[0268] 부형제는 탄수화물, 폴리머, 지질 및 미네랄 중 1개 이상일 수 있다. 탄수화물의 예는 락토스, 글루코스, 수크로스, 만니톨, 및 사이클로덱스트린을 포함하고, 예를 들어 동결건조를 용이하게 하기 위해 조성물에 첨가된다. 폴리머의 예는 전분, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 에틸하이드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 하이알루론산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리설포네이트, 폴리에틸렌 글리콜/폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드 공중합체, 상이한 가수분해도의 폴리비닐알코올/폴리비닐아세테이트, 및 폴리비닐피롤리돈이고, 모두 상이한 분자량으로, 예를 들어, 점도 조절을 위해, 생부착을 달성하기 위해, 또는 화학적 및 단백질분해적 열화로부터 지질을 보호하기 위해 조성물에 첨가된다. 지질의 예는 지방산, 인지질, 모노-, 디-, 및 트리글리세라이드, 세라미드, 스펅고지질 및 당지질로 모두 상이한 아실 사슬 길이 및 포화를 갖는 것, 에그 레시틴, 대두 레시틴, 수소화된 에그 및 대두 레시틴이고, 폴리머에 대한 것과 유사한 이유로 조성물에 첨가된다. 미네랄의 예는 탈크, 산화마그네슘, 산화아연 및 산화티타늄이고, 액체 축적의 감소 또는 유리한 안료 특성과 같은 이점을 얻기 위해 조성물에 첨가된다.

[0269] 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 이들의 전달에 적합한 것으로 당업계에서 공지된 임의의 유형의 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다.

[0270] 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 항체 폴리펩타이드가 다른 약제학적으로 허용가능한 캐리어에 부가하여, 교질입자, 불용성 단일층 및 액체 결정으로 응집된 형태로 존재하는 양친매성 제제 예컨대 지질과 조합된 리포솜의 형태로 될 수 있다. 리포솜 제형에 적합한 지질은, 비제한적으로, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설��파타이드, 라이소레시틴, 인지질, 사포닌, 담즙산, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 적합한 지질은 또한 혈류 순환 시간을 연장하기 위해 극성 머리기에서 폴리(에틸렌 글리콜)에 의해 변형된 상기 지질을 포함한다. 이러한 리포솜 제형의 제조는, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 예를 들어 US 4,235,871에서 발견될 수 있다.

[0271] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 생분해성 마이크로 구형체의 형태로 될 수 있다. 지방족 폴리에스테르, 예컨대 폴리(락트산) (PLA), 폴리(글라이콜산) (PGA), PLA와 PGA의 공중합체 (PLGA) 또는 폴리(카프로락톤) (PCL), 및 폴리무수물이 마이크로구형체의 생산에서 생분해성 폴리머로서 널리 사용되고 있다. 이러한 마이크로구형체의 제조는, 그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, US 5,851,451 및 EP 0 213 303에서 발견될 수 있다.

[0272] 추가의 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 폴리머 겔의 형태로 제공되고, 여기서 폴리머 예컨대 전분, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 에틸하이드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 하이알루론산 및 이들의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리비닐이미다졸, 폴리설포네이트, 폴리에틸렌-글리콜/폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드 공중합체, 상이한 가수분해도의 폴리비닐알코올/폴리비닐아세테이트, 및 폴리비닐피롤리돈이 제제를 함유하는 용액의 증점을 위해 사용된다. 폴리머는 또한 젤라틴 또는 콜라겐을 포함할 수 있다.

[0273] 대안적으로, 본 항체 폴리펩타이드는 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 오일 (예컨대 잇꽃 오일, 옥수수 오일, 땅콩 오일, 목화씨 오일 또는 참깨 오일), 트라가칸쓰 검, 및/또는 다양한 완충액에 단순히 용해될 수 있다.

[0274] 본 발명의 약제학적 조성물은 활성인 항체 폴리펩타이드의 작용의 강화를 위해 이온 및 정의된 pH를 포함할 수 있다는 것이 인정될 것이다. 추가로, 본 조성물은 통상적인 약제학적 조작 예컨대 멸균화를 거칠 수 있고 및/또

는 통상적인 아췌반트 예컨대 보존제, 안정제, 습윤제, 유화제, 완충액, 충전제, 등을 함유할 수 있다.

- [0275] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 적합한 경로를 통해 투여될 수 있다. 따라서, 가능한 투여 경로는 비경구 (정맥내, 피하, 및 근육내), 국소, 안구, 비강, 폐, 볼, 경구, 비경구, 질 및 직장을 포함한다. 또한, 이식물로부터의 투여가 가능하다.
- [0276] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 약제학적 조성물은 비경구로, 예를 들어, 정맥내로, 뇌실내로, 관절내로, 동맥내로, 복강내로, 척추강내로, 심실내로, 흉골내로, 두개내로, 근육내로 또는 피하로 투여되거나, 또는 이들은 주입 기술에 의해 투여될 수 있다. 이들은 혈액과 등장성인 용액을 만들기 위해 다른 서브스텐스, 예를 들어, 충분한 염 또는 글루코스를 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 편리하게 사용된다. 수용액은 필요하면 적당하게 완충되어야 한다 (바람직하게는 3 내지 9의 pH). 멸균 조건 하에서 적합한 비경구 제형의 제조는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 표준 약제학적 기술에 의해 쉽게 달성된다.
- [0277] 비경구 투여에 적합한 제형은 산화방지제, 완충액, 정균제 및 의도된 수형제의 혈액과 등장성인 제형을 부여하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁화제와 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 본 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알로 제시될 수 있고, 사용 직전에 단지 멸균 액체 담체, 예를 들어 주사용 물의 첨가만을 요하는 냉동건조된 (동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0278] 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구, 예를 들어 정맥내, 투여에 특히 적합하다.
- [0279] 대안적으로, 본 약제학적 조성물은 비강내로 또는 흡입에 의해 (예를 들어, 적합한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로-메탄, 디클로로테트라플루오로-에탄, 하이드로플루오로알칸 예컨대 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 (HFA 134A3 또는 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로프로판 (HFA 227EA3), 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스의 사용으로 가압된 용기, 펌프, 스프레이 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제제의 형태로) 투여될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에 있어서, 투약량 단위는 계량된 양을 전달하기 위해 밸브를 제공함에 의해 결정될 수 있다. 가압된 용기, 펌프, 스프레이 또는 분무기는, 예를 들어 윤활제, 예를 들어 소르비탄 트리올레이트를 추가로 함유할 수 있는, 용매로서 에탄올 및 추진제의 혼합물을 사용하여 활성 폴리펩타이드의 용액 또는 현탁액을 함유할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡슐 및 카트리지 (예를 들어, 젤라틴으로부터 제조됨)는 본 발명의 화합물 및 적합한 분말 기재 예컨대 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.
- [0280] 에어로졸 또는 건조 분말 제형은 바람직하게는 환자에게 전달하기 위한 각각 정량 또는 '퍼프'가 적어도 1 mg의 본 발명의 화합물을 함유하도록 배열된다. 에어로졸로 전체적인 1일 용량은 환자에 따라 다변할 것이고, 단일 용량으로 또는 더 일반적으로는 하루 전반에 걸쳐 분할 용량으로 투여될 수 있다는 것이 인정될 것이다.
- [0281] 대안적으로, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 좌약 또는 폐서리의 형태로 투여될 수 있거나, 또는 이들은 로션, 용액, 크림, 연고 또는 더스팅 파우더의 형태로 국소적으로 적용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한, 예를 들어, 피부 패치의 사용에 의해 경피로 투여될 수 있다. 이들은 또한 안구 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0282] 안과 사용을 위해, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는 등장성이고, pH 조정된 멸균 염수에서 마이크로화된 현탁액으로, 또는 바람직하게는, 등장성이고, pH 조정된 멸균 염수에서 용액으로, 선택적으로 보존제 예컨대 벤질알코올 염화물과 조합하여 제형화될 수 있다. 대안적으로, 이들은 연고 예컨대 바셀린으로 제형화될 수 있다.
- [0283] 피부에 국소적으로 적용을 위해, 본 발명의 항체 폴리펩타이드는, 예를 들어, 하기 중 1개 이상을 갖는 혼합물에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유하는 적합한 연고로 제형화될 수 있다: 광유, 액체 바셀린, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 화합물, 에멀션화 왁스 및 물. 대안적으로, 이들은, 예를 들어, 하기 중 1개 이상의 혼합물에 현탁 또는 용해된, 적합한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다: 광유, 소르비탄 모노스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 유동 파라핀, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세타아릴 알코올, 2-옥틸도데칸올, 벤질 알코올 및 물.
- [0284] 약제학적 조성물은 약제학적으로 효과적인 용량으로 환자에게 투여될 것이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 '치료적 유효량', 또는 '유효량', 또는 '치료적으로 효과적인'은 주어진 병태에 대한 치료 효과 및 투여 레지멘을 제공하는 양을 지칭한다. 이것은 요구된 첨가제 및 희석제, 즉 담체 또는 투여 비히클과 회합하여 원하는 치료 효과를 생성하는 활성 물질의 사전결정된 양이다. 또한, 이는 숙주의 활성, 기능 및 반응에서 임상적으로 상당한 결손을 감소시키고 가장 바람직하게는 예방하기에 충분한 양을 의미하는 것으로 의도된다. 대안적으로, 치

료적 유효량은 숙주에서 임상적으로 상당한 조건에서의 개선을 야기하기에 충분하다. 당해 분야의 숙련가에 의해 인정되는 바와 같이, 화합물의 양은 그것의 특정 활성에 따라 변할 수 있다. 적합한 투약량은 필요한 희석제와 희합하여 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 사전결정된 양의 활성 조성물을 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물의 제조 방법 및 용도에 있어서, 치료적 유효량의 활성 성분이 제공된다. 치료적 유효량은 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이 환자의 특성 예컨대 연령, 체중, 성별, 병태, 합병증, 다른 질환, 등에 기초하여 통상적인 숙련된 의료 또는 수의과 작업자에 의해 결정될 수 있다. 약제학적으로 효과적인 용량의 투여는 개체 용량 단위 또는 그렇지 않으면 몇 개의 더 작은 용량 단위의 형태로의 단일 투여에 의해 또는 특정 간격으로 재분할된 용량의 복수 투여에 의한 둘 모두로 수행될 수 있다. 대안적으로, 복용량은 연장된 기간에 걸쳐 연속적 주입으로서 제공될 수 있다

[0285] 본 발명의 항체 폴리펩타이드의 진단적 사용의 맥락에서, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 '약제학적 유효량', 또는 '유효량', 또는 '진단학적으로 효과적인'은 진단, 예를 들어 생체내에서 이미징형성 목적을 위해 검출가능한 신호를 제공하는 그 양을 지칭한다.

[0286] 항체 폴리펩타이드는 사용되는 폴리펩타이드의 효능/독성에 의존하여 다양한 농도로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 본 제형은 0.1 μM 내지 1 mM, 더 바람직하게는 1 μM 내지 500 μM , 500 μM 내지 1mM, 300 μM 내지 700 μM , 1 μM 내지 100 μM , 100 μM 내지 200 μM , 300 μM 내지 300 μM , 300 μM 내지 400 μM , 400 μM 내지 500 μM , 500 μM 내지 600 μM , 600 μM 내지 700 μM , 800 μM 내지 900 μM , 또는 900 μM 내지 1 mM 사이의 농도로 활성인 항체 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 제형은 300 μM 내지 700 μM 사이의 농도로 활성인 항체 폴리펩타이드를 포함한다.

[0287] 전형적으로, 인간 환자에서 (치료적 모이여터를 가지거나 갖지 않는) 항체 폴리펩타이드의 치료적 용량은 투여 당 100 μg 내지 1 g의 범위일 것이다 (70kg의 체중을 기준으로, 예를 들어 투여 당 300 μg 내지 700 mg). 예를 들어, 최대 치료적 용량은 투여 당 0.1 내지 10 mg/kg의 범위, 예를 들어 0.1 내지 5 mg/kg 또는 1 내지 5 mg/kg 또는 0.1 내지 2 mg/kg 사이일 수 있다. 그와 같은 용량은 종양전문의/의사에 의해 결정된 바와 같이 상이한 간격으로 투여될 수 있다는 것이 인정될 것이다; 예를 들어, 용량은 매일, 매주 2회, 매주, 격주 또는 매월 투여될 수 있다.

[0288] 본 발명의 폴리펩타이드 및 약제학적 제형은 의료 및 수의과 분야 둘 모두에서 유용성이 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 추가로 인정될 것이다. 따라서, 본 발명의 방법은 인간 및 비-인간 동물 (예컨대 말, 개 및 고양이) 양자의 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 환자는 인간이다.

[0289] 수의적 용도에 대해, 본 발명의 제제, 약제 및 약제학적 조성물은 통상적인 수의과적 실행에 따라 적합하게 허용가능한 제형으로 투여되고 수의과 외과의사는 특정 동물에 대해 가장 적절한 투약 레지멘 및 투여 경로를 결정할 것이다.

[0290] 본 발명의 제8 양태는 의약에 사용하기 위한 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0291] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 폴리펩타이드 및 제형은 암으로부터 고통받고 있거나 또는 고통받을 위험이 있는 환자 또는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0292] '치료'에 본 발명자들은 환자의 치료적 및 예방적 치료 둘 모두를 포함시킨다. 용어 '예방적'은 환자 또는 대상체에서 암의 가능성, 또는 암 세포의 확산, 전파, 또는 전이를 예방하거나 감소시키는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 제제, 또는 이들의 제형의 사용을 포괄하기 위해 사용된다. 용어 '예방적'은 또한 이전에 신생물성 질환에 대해 치료를 받은 환자에서 암의 재발을 예방하기 위해 본 명세서에서 기재된 바와 같은 제제, 또는 이들의 제형의 사용을 포괄한다.

[0293] 암은 고형종양의 형성과 관련될 수 있거나 또는 혈액성 암일 수 있다. 치료될 수 있는 암 유형은 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 모세포종 및 생식 세포 종양을 포함한다.

[0294] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 전립선암; 유방암; 결장직장암; 신장암; 췌장암; 난소암; 폐암; 자궁경부암; 횡문근육종; 신경교세포종; 골암; 다발성골수종; 백혈병 (예컨대 급성 림프아구성 백혈병 [ALL] 및 급성 골수 백혈병 [AML]), 피부암 (예를 들어 흑색종), 방광암 및 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된 암의 치료에서 사용하기 위한 것일 있다.

[0295] 일 구현예에서, 암은 표 16 또는 표 17에서의 암의 목록으로부터 선택될 수 있다.

- [0296] 전형적으로, 본 발명의 치료제는 비경구 형태로, 예를 들어 주사에 의해 혈류 안으로 또는 종양의 부위에/근처에 투여될 것이다.
- [0297] 일 구현예에서, CD137 및 Fc γ R, 예컨대 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 또는 이들의 조합을 발현하는 세포를 갖는 종양을 가지는 것으로 사전-선별되고 확인된 환자를 치료하기 위한 제제.
- [0298] 본 발명의 관련된 양태는 하기를 제공한다:
- [0299] (i) 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 사용; 및
- [0300] (ii) 암이 있는 개체를 치료하기 위한 방법으로, 상기 방법은 그것이 필요한 개체에게 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0301] 본 발명의 항체-기반 제제는 환자에서 암에 대한 단독 치료로서 또는 (추가적 치료가 약제학적 제제, 방사선요법 및/또는 수술일 수 있는) 병용 치료의 일부로서 사용될 수 있다는 것이 추가로 인정될 것이다.
- [0302] 따라서, 환자는 또한 암에 대해 하나 이상의 추가적 치료, 예를 들어 약제학적 제제 (예컨대 화학치료제), 방사선요법 및/또는 수술을 받을 수 있다.
- [0303] 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 암의 치료에 사용된 다른 치료제, 예컨대 항대사물질, 알킬화제, 안트라사이클린 및 다른 세포독성 항생제, 빈카알칼로이드, 에토포시드, 백금 화합물, 타산, 토포이소머라제 I 억제제, 항증식성 면역억제제, 코르티코스테로이드, 성호르몬 및 호르몬 길항제, 및 다른 치료적 항체 (예컨대 트라스투주맵)와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0304] 일 구현예에서, 1개 이상의 추가적 치료는 통상적인 화학치료제 (예컨대 알킬화제, 항-대사물, 식물성 알칼로이드 및 테르페노이드, 토포이소머라제 억제제 및 항신생물제), 방사선요법 제제, 항체-기반 치료제 (예컨대 켄투주맵, 알렘투주맵, 리툽시맵, 트라스투주맵, 니모투주맵, 세툽시맵, 베바시주맵), 및 스테로이드로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0305] 본 발명의 제9 양태는, 환자가 CD137 및 Fc γ R을 발현하는 세포를 갖는 종양을 가지는지를 확인하기 위해 환자를 스크리닝하는 것을 포함하는, 본 발명의 제1 및 제2 양태에 따른 항체로의 치료에 대해 민감한 환자를 동정하는 방법을 제공한다.
- [0306] 선택적으로, 선별되는 Fc γ R은 Fc γ RIIA이다. 일 구현예에서, Fc γ RIIA는 R131 동종이인자형이다.
- [0307] 적합한 바이오마커 스크리닝 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 종양 생검 샘플이 환자로부터 취해지고 분석되어 그 안에 CD137 및/또는 Fc γ R들의 발현 수준을 (RNA 수준 및/또는 단백질 수준에서); 예를 들어 면역조직화학, 유세포측정 또는 단백질 접근법을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0308] 본 발명의 주어진 양태, 특성 또는 파라미터에 대한 선호 및 옵션은 달리 문맥이 나타내지 않는 한 본 발명의 모든 다른 양태, 특성 및 파라미터에 대해서 임의의 그리고 모든 선호 및 옵션과 조합하여 개시된 것으로 간주되어야 한다.
- [0309] 본 명세서에서 분명하게 이전에 공개된 문서의 열거 또는 논의는 반드시 그 문서가 최첨단 기술 상태의 일부이거나 통상 일반적인 지식이라는 것을 인정하는 것으로 받아들여서는 안된다.
- [0310] 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 관련하여 사용될 때 부정관사의 사용은 "하나"를 의미할 수도 있지만, "1개 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 그 초과"를 의미하는 것과 또한 일치한다.
- [0311] 본 발명의 이들 및 다른 구현예들은 상기 설명 및 수반되는 도면들과 공조하여 고려될 때 더 잘 인식되고 이해될 것이다. 그러나, 다양한 본 발명의 구현예들 및 이들의 수많은 특이적 세부사항이 나타나 있지만, 상기 설명은 제한하기 위해서가 아니라 예시로서 제공된다고 이해되어야 한다. 많은 치환, 변형, 첨가 및/또는 재배열이 본 발명의 사상을 벗어남이 없이 본 발명의 범위 내에서 이루어질 수 있고 본 발명은 모든 이러한 치환, 변형, 첨가 및/또는 재배열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0312] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 그리고 본 발명의 특정 양태를 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에서 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참고로 하여 보

다 잘 이해될 수 있다.

본 발명의 특정 양태를 구현하는 바람직한 비-제한적인 예는 이제 하기 도면과 관련하여 기재될 것이다:

도 1은 CD137 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 결합을 도시한다. 별개의 2 실험으로부터의 데이터를 포함했다.

도 2는 실시예 6에서의 CD137 변이체를 도시한다

도 3은 적정될 때 (좌측으로부터 우측으로 25 μ g/ml) CHO-huCD137 세포에 대한 CD137L 결합으로 CD137 mAb 경쟁의 2회 실험의 요약을 도시한다.

도 4는 기준 REF1에 대해 정규화된 클론의 자극지수를 도시한다.

도 5는 가교결합이 있는 및 없는 항체에 의해 NF- κ B 매개된 신호전달의 유도를 도시한다.

도 6은 마우스 종양 모델에서 종양 용적에 대한 1630/1631 항체로 치료의 효과를 도시한다.

도 7은 슈뢰딩거 분석을 통해 2674/2675뿐만 아니라 친계클론 1630/1631 클론에 대해 결정된 패치 크기와 애그스코어를 도시한다.

도 8은 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 2674/2675의 결합을 도시한다

도 9는 CD137 리포터 검정에서 Fc γ RI 형질감염된 CHO 세포와 2674/2675 및 친계클론 1630/1631의 가교결합을 도시한다.

도 10은 CD137 리포터 검정에서 Fc γ RIIa R131 및 Fc γ RIIb와 2674/2675 및 친계클론 1630/1631의 가교결합을 도시한다.

도 11은 리포터 세포주에서 가교결합 독립적인 활성화를 결정하기 위해 사용된, 빈 벡터 (pcDNA3.1)로 형질감염된 CHO 세포를 도시한다.

도 12는 Fc γ RI 형질감염된 CHO 세포와 가교결합될 때 CD137 mAb로 자극 후 CD8⁺ T 세포의 IFN- γ 생산을 도시한다. CD8⁺ T 세포 효능제 검정에서 2674/2675 효능제 반응에 대해 정규화된 IFN- γ 반응의 요약 (n=5).

도 13은 다양한 인간 암에 대한 TNFRSF9 (CD137, Y 축)와 Fc γ 수용체 (X 축)의 평균 발현 값 사이의 상관관계를 보여주는 도트 플롯을 도시한다. Fc γ 수용체 및 CD137 둘 모두의 상기 평균 발현 (평균 발현 수준 ≥ 10)을 가진 암이 명확한 기호로 강조되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0313]

실시예

[0314]

실시예 1 - Alligator GOLD로부터 CD137 항체의 선택

[0315]

파아지 디스플레이 선택을 인간 항체 (scFv) 라이브러리인 Alligator GOLD를 사용하여 수행하였다. 비드 또는 튜브의 표면 상에 코팅되거나 또는 CD137-형질감염된 세포의 표면에 발현된 가용성 형태인 재조합 CD137에 대한 선택을 수행하였다. CTLA4-Fc 및 무관한 His-태그된 단백질을 선택에서 파잉으로 포함된 비-표적으로 사용하였다. 각각의 선택 라운드에 앞서, 비-표적 단백질, 비드 또는 CD137 음성 세포에 대해 파아지 스톱을 사전-선택하여 비특이적 결합체를 제거하였다.

[0316]

파아지 선택으로부터 특이적 결합체를 동정하기 위해, 대략 4500개 개별 클론을 재조합 표적 (CD137-Fc) 또는 비-표적 단백질로 코팅된 ELISA를 사용하여 파아지 형식으로 선별하고, 이어서 일부 클론에 대해 가용성 scFv로 확인하였다. CD137에 대해 특이적 결합을 나타내는 클론을 서열 분석하고 고유의 클론을 추가의 특성규명을 위해 IgG로서 생산했다.

[0317]

실시예 2 - ELISA에 의해 측정된 인간 CD137에 대한 결합

[0318]

목적

[0319]

본 목적은 CD137 항체의 결합 효력을 결정하기 위한 것이다.

[0320]

물질 및 방법

[0321] 재조합 인간 CD137에 대한 CD137 항체의 결합은 샌드위치 ELISA에 의해 결정되었다. 간단히, 재조합 인간 CD137-Fc (R&D # 838-4B)로 코팅된 ELISA 플레이트를 조사되는 다양한 CD137 항체의 연속 희석으로 인큐베이션 하였다. CD137 항체는 HRP-접합된 염소-항-인간 카파 경쇄 (AbD Serotec # STAR127P)를 사용하여 검출하고 SuperSignal ELISA Pico 화학발광 기관 (Pierce # 37069)에 현상하였다. 다양한 항체의 EC50 값은 2-6개의 별개의 실험에서 결정하였다.

[0322] 공개된 아미노산 서열 정보로부터 합성된, CD137에 대해 특이성을 갖는 2개의 상이한 기준 항체를 이 연구에 사용하였다 ("REF1" 및 "REF2"로 지정됨).

[0323] 사용된 다른 기준 항체, 즉 REF3, REF4 및 REF8은 *Alligator GOLD* 라이브러리로부터 수득된 인간 CD137-특이적 단일특이적 IgG 항체이다. 이들은 CD137에 결합에 의해 효능적이고 T 세포에 자극한다. 기준 항체의 결합 에피토프는 실시예 6-8에서 설명된 바와 같이 확립되었다 (하기 참고).

[0324] 기준 항체는 이들이 이전에 적어도 일부 임상 시험을 거쳤고 그래서 신규한 항-CD137 항체가 개선된 특성 및/또는 기능에 대해 판단될 수 있는 기준점을 제시하기 때문에 선택되었다.

[0325] 결과 및 결론

[0326] 예시적인 항체 1630/1631은 기준 항체의 것과 유사한 범위, 즉 nM 이하로 EC50 값을 나타낸다. 데이터는 표 1에 요약되어 있다.

[0327] [표 1]

[0328] 인간 CD137에 대해 ELISA에 의해 결정된 CD137 항체의 EC50 값 (nM).

항체	평균	SD	n
REF1	0.75	0.137	8
REF2	0.33	0.069	5
REF3	0.39	0.037	3
REF4	0.41	0.050	4
REF8	0.38	0.137	2
1630/1631	0.27	0.078	4

[0329]

[0330] n = 데이터 포인트의 수.

[0331] 실시예 3 - 유세포측정에 의해 측정된 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 결합

[0332] 목적

[0333] 이 연구의 목적은 인간 및 사이노몰구스 (마카카 파스시컬라리스) CD137에 대한 결합을 결정하기 위한 것이었다.

[0334] 물질 및 방법

[0335] 결합 및 EC50은 인간 CD137, 사이노몰구스 CD137 또는 빈 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 유세포측정을 사용하여 결정하였다. 인간 또는 사이노몰구스 CD137의 세포외 부분은 인간 CD40의 막관통 및 세포내 부분에 융합되고 pcDNA3.1 안으로 클로닝되었다. 벡터는 후속으로 CHO 세포 안으로 안정적으로 형질감염되었다. CD137의 발현은 4°C에서 30분 동안 CD137 항체 (인간 CD137-PE, BD Biosciences # 555956)를 사용하여 유세포측정에 의하여 확인되었다. CD137-형질감염 및 빈 벡터-형질감염된 세포는 결합을 포화시키기 위해 4°C에서 적어도 1h 동안 CD137 항체로 인큐베이션하였다. 항체 내재화를 최소화하기 위해, 0.05% 아지드화 나트륨을 인큐베이션 완충액에 사용하였고 모든 작업은 얼음 상에서 수행하였다. CD137 항체는 4°C에서 30분 동안 인큐베이션된 PE-접합된 항-hIgG 항체 (109-115-098, Jackson Immunoresearch laboratories)를 사용하여 검출되었다. 염색 직후 세포를 파라포름알데하이드 용액 (10x 농도 BD CellFIX, BD biosciences #340181)으로 고정시켰다. 세포는 FACSVerse (BD Biosciences)를 사용하여 유세포측정에 의하여 분석하였다. 각각의 샘플에 대한 중앙 형광 강도 (MFI)를 결정하고 용량 반응 데이터를 그래프패드 프리즘을 사용하여 분석하였다.

[0336] MFI 데이터는 각각의 항체에 대해 정규화되고, 여기서 각각의 항체에 대한 용량 적정에서 0%는 최저값으로 정의되고 100%는 최고값이다. EC50 및 95% 신뢰구간은 2회 실험으로부터의 데이터에 기반한 그래프 패드 프리즘으로

계산되었다 (비-선형 회귀 (곡선 적합), 0 및 100으로 설정된 제약조건).

[0337] 결과 및 결론

[0338] CHO-huCD137, CHO-cyCD137 및 CHO-pcDNA에 대한 결합은 2개의 별개의 실험에서 확인되었다 (도 1). 1630/1631은 2개의 기준 항체 REF1 및 REF2와 비교할만한 EC50으로 인간 CD137에 결합한다. 1630/1631은 사이노몰구스 CD137에 잘 결합한다. 기준항체 REF1 및 REF8 (도 1)은 사이노몰구스 CD137에 아주 약하게 결합하거나 또는 전혀 결합하지 않는다. REF8은 약한 결합을 나타내고 완전한 포화에 도달하지 않는다.

[0339] EC50 결정은 내부 및 사이 검정 변형을 포함하도록 시험된 각각의 CD137 항체에 대해 95% 신뢰구간으로 제시된다 (표 2).

[0340] [표 2]

[0341] 정규화된 데이터의 2개의 실험으로부터 평균으로 결정된 각각의 CD137 항체의 EC50에 대한 95% 신뢰구간. Nd: 검출 불가능

항체	인간 CD137 에 대한 결합, EC50 (μg/mL)	사이노 CD137 에 대한 결합, EC50 (μg/mL)	비, 사이노: 인간
REF1	1.00 - 1.99	Nd	Nd
REF2	0.21 - 0.31	0.13 - 0.24	0.69
REF3	0.20 - 0.36	Nd	Nd
REF4	0.16 - 0.27	0.11 - 0.17	0.67
REF8	0.20 - 0.42	>3	>14
1630/1631	0.17 - 0.26	0.12 - 0.16	0.63

[0342] 실시예 4 - 비아코어에 의해 측정된 친화성

[0343] 목적

[0344] 본 목적은 상이한 CD137 항체의 온 속도와 오프 속도에 대해, 친화성을 평가하기 위한 것이다.

[0345] 물질 및 방법

[0346] 인간 CD137 (R&D systems)을 통상적인 아민 커플링을 사용하여 Biacore™ 센서 칩인 CM5에 고정시켰다. 시험된 항체 및 대조군 (연속으로 희석된 1/2 10-0.63 nM)을 30 μl/ml의 유속에서 HBS-P (GE, #BR-1003-68)에서의 결합에 대하여 분석하였다. 5분 동안 회합이 이어졌고 15분 동안 해리했다. 재생은 30초 동안 10 mM 글리신 pH 1.7을 사용하여 2회 수행하였다. 동력학 파라미터 및 친화성 상수는 1:1 랑뮤어 모델을 사용하여 계산하였다.

[0347] 결과 및 결론

[0348] 항체의 친화성은 칩 표면상에 코팅된 CD137 위를 유동하는 2가 항체를 사용하여 측정된 나노몰 내지 하위-나노몰 범위였다 (표 3).

[0349] [표 3]

[0350] 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 동력학 파라미터

항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
REF4	6.76E+05	6.60E-04	9.76E-10
REF8	3.92E+05	5.19E-04	1.32E-09
1630/1631	1.85E+06	1.18E-03	6.41E-10
REF2	1.05E+06	4.45E-04	4.24E-10

[0351] 실시예 5 - CD137 항체의 표적 특이성

[0352] 목적

[0355] 이 연구가 갖는 목적은 임의의 CD137 항체가 CD137 이외의 표적에 결합하는 위험을 평가하기 위한 것이다.

[0356] 물질 및 방법

[0357] ELISA 방법이 이미 확립된 TNFR 슈퍼패밀리 일원 (CD40 및 OX40)에 대한 결합을 평가하여 비-표적 단백질에 대해 교차 반응하는 잠재적인 경향을 검출하였다. 또한, 가장 유사한 서열 (34% 서열 동일성)로 TNFRSF21을 동정하는 BLAST 검색을 수행하였다. 이 서열 유사성은 다소 낮기 때문에, OX40 및 CD40에 대한 비-표적 결합의 결정은 충분한 것으로 간주되었다.

[0358] ELISA 플레이트 (Greiner # 655074)를 37°C에서 1시간 동안 또는 4°C에서 밤새 PBS에서 0.5 μ g/ml의 최종 농도로 희석된, 50 μ l/웰의 재조합 인간 OX40 (R&D # 1493-CD), CD40-Fc (Ance11 # 504-820) 또는 CD137 (R&D # 838-4B)로 코팅하였다. 플레이트를 PBS+0.05% TWEEN20 (PBST)로 세정하고, 이어서 PBST+1% 소과 혈청 알부민 (BSA)으로 차단시켰다. 항체 샘플을 PBST+1% BSA에서 10 - 0.01 μ g/ml로부터 연속 1/10 희석으로 제조하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 겨자무 페록시다아제-접합된 항-인간 카파 경쇄 항체 (AbD Serotec # STAR127P)를 사용하여 검출하고 SuperSignal ELISA Pico 화학발광 기판 (Pierce ThermoScientific #37069)을 사용하여 전개하였다.

[0359] 결과 및 결론

[0360] [표 4]

[0361] OX40 및 CD40에 대한 CD137 항체 비특이적 결합의 요약

항체	OX40 및 CD40 에 대한 결합	EC50 CD137
REF3	없음	
REF4	약; EC50 > 6 μ g/ml (40 nM)	0.4 nM
REF8	없음	
1630/1631	없음	0.4 nM
2674/2675	없음	0.3 nM

[0362]

[0363] 두 실험으로부터의 결과는 유사하였다. 일 항체 (REF4)는 OX40 및 CD40에 대해 약한 결합을 나타낸, 반면에 나머지 항체의 어느 것도 OX40 또는 CD40에 임의의 검출가능한 결합을 나타내지 않았다. 분석된 항체의 개요와 두 실험으로부터의 결과는 표 4에 나타나 있다.

[0364] 또한, 다중 혈액 공여체로부터 주요 PBL에 대한 결합이 시험되었다. PBL에 대한 1630/1631 및 2674/2675의 결합은 기준 항체에 유사하였다. 비-표적 단백질에 대한 관련된 비특이적 결합은 검출되지 않았다.

[0365] **실시예 6 - CD137에 대한 항체 결합의 도메인 맵핑**

[0366] 목적

[0367] 본 목적은 에피토프 특이성의 구별되는 부류를 정의하고 기준 항체의 특성에 비교하기 위한 것이다.

[0368] 물질 및 방법

[0369] 형질감염된 세포의 표면에 발현된 인간/마우스 CD137 키메라의 패널에 결합하는 각각의 항체의 능력을 유세포 측정에 의하여 분석하였다.

[0370] 키메라는 인간 CD137의 도메인 또는 모듈을 상응하는 마우스 도메인과 교환함에 의해 설계하였다. CD137 인간/마우스 키메라의 유전자를 합성하고 (GenScript) 컨스트럭트를 pcDNA3.1 벡터 (Invitrogen) 안으로 클로닝하고 그리고 FreeStyle 293-F 세포 (Invitrogen) 안으로 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 CD137 항체 및 대조군 항체로 인큐베이션하고, 이어서 검출을 위해 항-인간 IgG-PE (Jackson Immunoresearch)으로 인큐베이션하고 FACS Verse (BD Biosciences)로 분석하였다. 상이한 키메라성 컨스트럭트에 대한 결합은 아이소타입 대조군의 결합에 비교한 상대적인 MFI로 계산되고, 이어서 개별 항체 사이의 친화성 차이의 효과를 최소화하기 위해 전장 인간 CD137 컨스트럭트에 정규화하였다.

[0371] 결과 및 결론

[0372] 하기 도 2에 기재된 바와 같이 3가지 결합 패턴이 관측되었다. 데이터는 표 5에 요약되어 있다.

[0373] 패턴 A

[0374] 항체 REF1은 인간 CD137에 결합에 대해 도메인 1에 의존한다.

[0375] 패턴 B

[0376] 항체 REF3, REF4, 2674/2675 및 1630/1631은 인간 CD137에 결합에 대해 도메인 2에 주로 의존적이다.

[0377] 패턴C

[0378] 항체 REF2 (기준 항체) 및 REF8은 인간 CD137에 결합에 대해 도메인 3B-4A에 주로 의존적인 것으로 나타났다.

[0379] [표 5]

[0380] 전장 인간 CD137에 정규화된, 항체 샘플/아이소타입 대조군에 대한 중앙 형광 강도 (MFI).

도메인		1	2				3B-4A	
클론	설명	REF1	1630/ 1631	2674/ 2675	REF3	REF4	REF2	REF8
1550	마우스도메인 1, 2A 및 2B (aa 24-86)를 갖는 인간 CD137	0.12	0.11	0.13	0.05	0.05	0.22	0.17
1551	마우스도메인 2A, 2B 및 3A (aa 47-96)를 갖는 인간 CD137	0.41	0.10	0.15	0.04	0.05	0.37	0.33
1552	마우스도메인 2B, 3A 및 3B (aa 64-118)를 갖는 인간 CD137	0.76	0.25	0.13	0.05	0.06	0.19	0.18
1553	마우스도메인 3A, 3B 및 4A (aa 87-133)를 갖는 인간 CD137	1.07	0.91	1.08	0.65	0.65	0.17	0.17
1554	마우스도메인 3B, 4A 및 4B (aa 97-159)를 갖는 인간 CD137	0.82	0.85	0.88	0.84	0.51	0.16	0.17
1555	마우스도메인 1 및 4B 및 미공지원 기능의 영역 (aa 24-46 및 aa 139-186)을 갖는 인간 CD137	0.11	0.35	0.38	0.24	0.26	0.26	0.32
1030*	인간전장 CD137	1	1	1	1	1	1	1

[0381]

[0382] 실시예 7 - CD137 리간드 차단

[0383] 목적 및 배경

[0384] 본 목적은 CD137 항체가 CD137 리간드 결합을 차단하는지를 결정하기 위한 것이다.

[0385] CD137 항체가 리간드 결합 영역에 근접한 에피토프에 결합하는 경우, 항원에 대한 결합은 리간드 결합의 부분적 또는 전체 차단으로 이어질 수 있다. CD137 리간드 결합 에피토프에 근접한 결합은 또한 CD137 리간드 결합 에피토프의 입체 장에 또는 형태적 변화에 기인하여 리간드 결합에 영향을 줄 수 있다. 모든 CD137 항체는 리간드 차단 특성의 평가를 위하여 CD137L의 고정된 농도에 대해 적정되었다.

[0386] 물질 및 방법

[0387] 리간드 경쟁에 대해 인간 CD137로 형질감염된 CHO-세포를 사용하였다. 인간 CD137의 세포외 부분을 hCD40의 막 관통 및 세포내 부분에 융합하고 pcDNA3.1 안으로 클로닝하였다. 벡터는 후속으로 CHO 세포 안으로 안정적으로 형질감염되었다. CD137의 발현은 상업적 항체 표적화 CD137로 염색에 의하여 확인되었다.

[0388] CHO-huCD137을 1시간 동안 +4C에서 사전결정된 포화 농도 (0.25 $\mu\text{g/ml}$)로 적정한 CD137 단클론성 항체로 사전-인큐베이션하고, 그 후 EC50에서의 농도로 CD137 리간드의 첨가를 하였다. +4C에서 또 다시 30분 동안 공동-인큐베이션 후, 세포를 세정하고 결합된 CD137 리간드는 항-FLAG-APC (Cell signaling technology)로 검출하였다. 분석 전 세포는 파라포름알데하이드 (10x 농도 BD CellFIX, BD biosciences)로 고정시켰다. 분석은 FACSverse로 수행하고 MFI (중앙 형광 강도)는 FlowJo 소프트웨어로 계산하였다.

[0389] 결과 및 결론

[0390] 시험된 모든 CD137 mAb들은 CD137 리간드 결합을 차단하지 않았다고 귀결되어 질 수 있다 (표 6, 도 3). 도메인 2B-4A에 결합하는, 그룹 B 및 C에 속하는 CD137 mAb들은 (2674/2675 및 1630/1631을 포함하여) CD137L을 차단하였다. 도메인 1에 결합된 그룹 A에 속하는 REF1은 CD137 리간드를 차단하지 않았다. REF1은 CD137L의 결합을 증가했다.

[0391] [표 6]

[0392] CD137 항체의 최대 CD137 리간드경쟁

그룹 (도메인맵핑)	CD137 mAb	CD137L, 최대 억제
A	REF1	-167%
B	1630	69%
B	2674/2675	66%
C	REF2	-26%

[0393]

[0394] **실시예 8 - 경쟁 ELISA**

[0395] 목적 및 배경

[0396] 각각의 CD137 항체를 서로 경쟁시킴에 의해, 그것의 차단 패턴에 기초하여 유사한 에피토프에 결합하는 항체를 결정하는 것이 가능하다. 경쟁 ELISA는 코팅된 CD137-Fc에 결합할 때 비-바이오티닐화된 CD137 항체와 함께 바이오티닐화된 CD137 항체를 공동-인큐베이션에 의해 수행된다. 경쟁은 바이오티닐화된 CD137 항체로부터 신호의 손실로 정의된다. 낮은 경쟁값은 항체 사이의 경쟁이 없거나 항체의 결합 동력학 중 어느 하나에 기인할 수 있다. 일 항체의 결합은 또한 다른 CD137 항체의 결합에 영향을 미치는 항원에 결합할 때 입체장에 또는 형태적 변화로 이어질 수 있다.

[0397] 물질 및 방법

[0398] CD137 항체는 바이오티닐화되고 (EZ-link NHS-LC-Biotin, ThermoFisher) 그리고 CD137-Fc에 대한 온전한 결합 특성은 바이오티닐화된 것과 비-바이오티닐화된 항-CD137 mAb들 사이의 EC50을 비교함에 의해 ELISA로 확인되었다. 비-바이오티닐화된 항-CD137 (항-CD137-bio)을 결정된 EC50보다 30배 더 높은 농도에서 0.5시간 동안

CD137-Fc에 사전-인큐베이션하였다. 세정하지 않고, 항-CD137-bio를 첨가하고 또 다른 1h 동안 공동-인큐베이션 하였다. 항-CD137-bio의 결합은 스트렙타비딘-HRP (Pierce)로 검출하였다. 경쟁은 (자체와 경쟁하는) 그것의 최대 경쟁에 비하여 다른 항체에 대해 측정된 결합을 나눔에 의해 비례 수로 계산되었다. 수득된 상대적인 값은 최대 차단 용량에 대해 정규화되었다 (표7).

[표 7]

두 실험으로부터 CD137 항체 경쟁 ELISA의 요약.

	REF1	REF4	1630/1631	REF2	REF8
REF1	100	7	5	5	4
REF2	15	41	70	94	61
REF4	18	58	91	63	50
REF8	4	49	91	100	82
1630/1631	14	31	56	23	16

결과 및 결론

경쟁 ELISA는 2회 반복되었다. 양 실험에서, 몇 개의 CD137 mAb들은 자체적으로 완전하게 경쟁하지 않았다 (표 7). 도메인 맵핑 그룹 A에 속하는 항체 REF1는 경쟁 ELISA에서 고유의 패턴을 나타냈다. 분석된 다른 CD137 항체는 유사한 차단 패턴을 나타냈다. 이들 항체들 사이의 결합 동력학에서의 차이는, 비록 그룹들 내의 작은 변형이 결합 에피토프에서의 실제의 차이를 반영한다는 것이 배제될 수는 없지만, 이들 항체들 중에서 결합 패턴에서의 일부 사소한 변형을 설명할 수 있다.

실시예 9 - CD137 항체의 시험관내 효능

목적

본 목적은 효능적 활성을 갖는 CD137 항체를 동정하기 위한 것이다.

물질 및 방법

CD137 항체의 효능적 활성은 원발성 인간 CD8⁺ T 세포에 기반하여 T 세포 검정에서 평가되었다. 간단히, CD8⁺ T 세포는 제조자의 프로토콜에 따라 MACS 분리 (Miltenyi# 130-096-495)에 의해 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리되었다. 세포는 96-웰 미세적정 플레이트 (NuncThermo Scientific #268200)에서 인큐베이션되고, 항-CD3 항체 (클론 OKT3, Affymetrix eBioscience # 16-0037)로 사전-코팅되고 그리고 시험되는 CD137 항체의 농도로 적정되었다. 72 또는 96-시간 인큐베이션에 이어, 배양 배지를 수확하고 IFN- γ 수준을 ELISA (BD #555142)에 의해 결정하였다.

각각의 클론을 적어도 6개 공여체에서 분석하고 기준 CD137 항체 REF1 및 음성 대조군 항체에 대해 비교했다.

큰 공여체-간 변형에 기인하여 자극 지수 (SI, 음성 대조군에 비교된 항체에 의한 배수 유도)는 각각의 샘플에 대해 결정되고 기준 항체 REF1에 대한 자극 지수로 정규화되었다.

결과 및 결론

기준 REF1에 비교할만한 효능을 갖는 몇 개의 클론이 확인되었다. 데이터는 도 4에 요약되어 있다.

표 8은 CD137 자극에 의해 유도된 절대 IFN- γ 수준을 나타낸다. 그러나, 모든 항체가 모든 공여체에서 일 대일로 분석되지 않았고 정규화된 SI는 효능의 비교에 대해 더 관련된다.

[표 8]

[0415] 다양한 항체에 의해 유도된 IFN- γ 생산 수준.

클론 명칭	평균 IFN- γ (pg/ml)	최소 IFN- γ (pg/ml)	최대 IFN- γ (pg/ml)	n
Ctrl IgG	2502	337	8526	13
REF1	42268	2256	136802	12
REF4	26749	11952	51832	8
REF8	52448	7727	123127	8
1630/1631	51236	3361	145055	8

[0416]

[0417] **실시예 10 - 시험관내 NF κ B 리포터 검정**

[0418] 293T 세포(3천만)를 NF- κ B 프로모터 및 레닐라 하에서 개뿔벌레 루시퍼라아제, 인간 CD137에 대해 인코딩하는 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 5시간 후, 항체를 3가지 상이한 농도로 첨가하였다. 18시간 이 후, 세포를 수확하고 루시퍼라아제 리포터 검정 (Promega)을 수행했다. 세포는 가교결합 없이 뿐만 아니라, 항-IgG 항체를 사용한 가교결합으로 5 μ g/ml에서, 가교결합을 갖는 가용성 항체로 배양하였다.

[0419] 결과

[0420] 1630/1631은 가교결합될 때 NF- κ B 매개된 신호전달을 유도하는 CD137을 자극하지만 가교결합제의 부재에서는 그렇지 않았다. 그에 반해서, REF1은 가교결합제의 부재에서도 또한 CD137 신호전달을 유도한다.

[0421] **실시예 11- HT-29 결장암 모델에서 생체내 항-종양 효과**

[0422] 요약

[0423] 1630/1631의 항-종양 효과는 HT-29 결장 암종의 피하 종양 모델과 hPBMc 인간화된 면역결핍 마우스를 사용하여 조사하였다.

[0424] 1630/1631은 통계적으로 상당한 종양 용적 억제를 실증했다.

[0425] 물질 및 방법

[0426] 백혈구 농축물을 룬드 대학 병원으로부터 수득하였다.

[0427] Taconic's Denmark로부터 암컷 SCID-Beige 마우스 (7-8w)를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 말뚝/룬드 윤리 위원회의 승인하에 수행하였다.

[0428] HT-29 결장암은 ATCC로부터 수득하고 ATCC 권고에 따라 배양하였다. 대수 증식으로 배양한 HT-29 세포주를 피하로 주사하였다 (0일째 (D0)에 200 μ L 내 4×10^6 세포). 백혈구 농축물로부터 분리된 인간 PBMc (100 μ L 내 7×10^6)는 같은 날에 복강내로 주사하였다. 복강내 치료 (100 μ g)는 6, 13, 및 20일째에 수행하였다.

[0429] 종양은 종양 용적이 계산되는 폭, 길이 및 높이로 캘리퍼로 측정하였다 (w/2x l/2xh/2x pi x (4/3)). 동물은 상처부위에서 종양 용적이 2cm³에 도달되기 전에 또는 마우스의 건강에 영향을 미치기 전에 종결되었다.

[0430] 데이터는 그래프패드 프리즘 프로그램을 사용하여 Mann-Whitney 테스트에 의해 분석하였다.

[0431] 결과

[0432] 4개 상이한 공여체로 이식된 마우스로부터 풀링된 데이터는 비히클 그룹에 비교하여 1630/1631 항체로 처리될 때 종양 성장의 억제의 형태에서 12-16일째에서 통계적으로 상당한 항-종양 효능을 실증했다 (p= 0.0675 내지 p=0.0132, Mann-Whitney 비 매개변수, 2-테일). 종양 용적 억제의 백분율은 10 내지 21일째 사이에서 1630/1631로 29-42%의 범위였다 (도 6 및 표 9 참고).

[0433] 결론적으로, 1630/1631의 항-종양 효과는 hPBMc 인간화된 면역결핍 마우스와 HT-29 결장 암종의 피하 종양 모델을 사용하여 조사되었다. 1630/1631은 통계적으로 상당한 종양 용적 억제를 실증했다.

[0434] [표 9]

[0435] 통계적인 분석 및 중앙 억제 퍼센트

중앙 집중 후 일수	비히클에 비교된 중앙 성장 억제 (중앙 용적) (%)	p-값 (Mann-Whitney 2-테일)
D12	42.1	0.0132
D14	32.6	0.0675
D16	38.7	0.0304
D19	32.7	0.1918
D21	29.5	0.0911

[0436]

[0437] **실시예 12 - CD137 친제 항체 클론 1630/1631의 최적화**

[0438] 최적화의 목적은 친화성 및 생체물리학적 특성에 관하여 1630/1631 항체의 개선된 변이체를 생성하기 위한 것이다. 비드의 표면 상으로 코팅된 재조합 CD137에 대한 파아지 선택이 수행되고, 각각의 선택 라운드에 앞서 파아지 스톱은 비-표적 단백질뿐만 아니라 비드에 대해 사전-선택되었다. 선택의 제4 라운드에 앞서 65℃에서의 열적 인큐베이션 단계가 수행되었다. 전체적인 선택 전략은 세정 단계를 신장하고 파아지 풀과 CD137 사이의 인큐베이션 시간을 감소시킴에 의해 느린 오프-레이트뿐만 아니라 빠른 온-레이트로 클론의 단리를 증진하도록 설계되었다.

[0439] 파아지 선택 후, 스크리닝은 표적 결합 클론을 동정하기 위해서뿐만 아니라 다양성을 평가하기 위해 가용성 scFv 형식을 수행되었다. 연장된 주된 스크리닝은 개선된 온도 안정성, 사이노몰구스 반응성뿐만 아니라 친화성 또는 오프-레이트를 갖는 클론을 동정하기 위해 수행되었다. 총 50개 클론이 S228P 안정화 돌연변이를 갖는 최종 IgG4 형식으로 다시 클로닝되었다. 최적화된 변이체의 추가의 평가는 최종 형식으로 수행하였고, 그리고 ELISA 설정에서의 결합, FACS에 의해 결정된 세포-결합, 친화성, ELISA 설정뿐만 아니라 DSF 양자에 의해 결정된 온도 안정성, SE-HPLC, 슈뢰딩거 모델링 및 특이성에 초점을 맞추었다.

[0440] **실시예 13 - 클론 2674/2675의 개선된 안정성**

[0441] DSF 분석이 갖는 목적은 최적화 후 온도 안정성에서의 개선을 평가하기 위해 친제 클론 1630/1631에 비교된 클론 2674/2675의 T_m을 결정하기 위한 것이다.

[0442] 물질 및 방법

[0443] 모든 항체는 SARomics Biostructure에서 시차주사 형광분석법 (DSF)으로 분석되었다. 샘플은 멸균 여과된 PBS에 0.1 mg/ml로 희석되고 150 μ l의 용적이 SARomics에 전달되었다.

[0444] DSF 측정을 위한 샘플 (PBS 완충액 내 0.1 mg/ml)은 63 μ l 샘플 + 7 μ l PBS 완충액, 1:100 배 희석된 SYPRO 오렌지로 구성되었다. 전체에서, SYPRO 오렌지는 1:1000-배 희석되었다. Stratagene MX3000P, qPCR 기계를 사용하여 각각의 컨스트럭트에 대해 중복 측정을 하였다. 측정은 25℃ - 95℃의 온도 범위에서 수행하였다. 평균 용융 온도 T_m은 모든 샘플에 대해 계산하였다.

[0445] 결과 및 결론

[0446] 모든 샘플에 대한 용융 곡선을 얻었고 2674/2675 및 친제 클론 1630/1631에 대해 결정된 T_{m1}뿐만 아니라 T_{m2}는 하기 표 10에서 볼 수 있다. 2674/2675는 친제 클론 1630/1631에 비교하여 1-2℃ 개선된 T_{m2}를 가졌다.

[0447] [표 10]

[0448] DSF에 의해 측정될 때 1630/1631 친제 클론에 비교하여 2674/2675의 결정된 T_{m1}뿐만 아니라 T_{m2} 값 및 평균 T_{m2} 차이.

	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	개선된 T _{m2} (°C)
2674	66.3	73.4	2
1630	66.3	71.4	-

[0449]

[0450] **실시예 14 - 슈뢰딩거에서 항체 응집 예측에 의해 분석된 클론 2674/2675의 감소된 응집경향.**

[0451] 최적화된 변이체의 슈뢰딩거 분석이 갖는 목적은 소수성 패치의 크기뿐만 아니라 친제 클론 1630에 비교하여 2674/2675의 응집 경향을 평가하기 위한 것이다.

- [0452] 물질 및 방법
- [0453] 상이한 변이체에 대한 서열을 슈뢰딩거로 보내 3D 구조를 생성했다. 3D 모델은 단백질 표면 분석기로 분석하고 애그스코어로 등급화했다. REF9-24는 인간 CD137에 대한 결합능에 기초한 최적화 동안 수득된 클론이다.
- [0454] 결과 및 결론
- [0455] 클론 2674/2675 및 REF9-24 (선택 동안 수득된 클론)뿐만 아니라 친계 클론 1630/1631에 대한 정의된 패치 크기 및 애그스코어는 도 7에서 볼 수 있다. 도입된 돌연변이는 분명히 소수성 패치를 파괴하고 모델링 분석에 따른 응집 경향을 감소시켰다고 귀결될 수 있다.
- [0456] 실시예 15 - ELISA에 의해 측정된 인간 및 사이노물구스 CD137에 대한 2674/2675의 결합
- [0457] 목적 및 배경
- [0458] 본 평가의 목적은 인간 및 사이노물구스 CD137 양자에 대해 ELISA에서 친계 클론 1630/1631과 비교된 2674/2675의 결합을 결정하기 위한 것이다.
- [0459] 물질 및 방법
- [0460] 제조합 인간 CD137에 대한 CD137 항체의 결합은 샌드위치 ELISA에 의해 결정되었다. 간단히, 제조합 인간 CD137-Fc (R&D # 838-4B)로 코팅된 ELISA 플레이트 (Greiner # 655074)를 조사되는 다양한 CD137 항체의 연속 희석으로 인큐베이션하였다. CD137 항체는 HRP-접합된 염소-항-인간 카파 경쇄 (AbD Serotec # STAR127P)로 검출하고 SuperSignal ELISA Pico 화학발광 기관 (Pierce # 37069)으로 현상하였다. 다양한 항체의 EC50 값은 2-6개 별개의 실험으로 결정되었다.
- [0461] 결과 및 결론
- [0462] 2674/2675은 친계 클론 1630/1631과 유사한 범위, 즉 nM 이하로 EC50 값을 나타낸다. 데이터는 하기 표 11에 요약되어 있다.
- [0463] [표 11]
- [0464] 2674/2675 및 친계 클론 1630/1631에 대해 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 결정된 EC50 값.

	EC50 (nM) 인간	EC50 (nM) 사이노
	CD137	CD137
2674/2675	0.34	0.57
1630/1631	0.41	0.85

- [0465]
- [0466] 실시예 16 - 인간 및 사이노물구스 CD137에 대한 2674/2675의 결합, 옥텟
- [0467] 목적
- [0468] 본 목적은 옥텟 플랫폼을 사용하여 인간 및 사이노물구스 CD137에 2674/2675 및 1630/1631에 대한 상대적인 결합 친화성을 비교하기 위한 것이다.
- [0469] 물질 및 방법
- [0470] CD137 친화성은 옥텟 레드 96 플랫폼 (ForteBio)을 사용하여 결정하였다. 2674/2675, 1630/1631, REF1, REF 2 및 1188 아이소타입 대조군이 EDC 및 NHS와 함께 아민 커플링에 의해 ARG2 바이오센서 (ForteBio #18-5092)에 10 μ g/ml로 커플링되었다. 1x 동적 완충액 (ForteBio #18-1092)에 100nM에서 7 2-배 연속 희석의 CD137 (Acro Biosystems # 41B-H5227 및 # 41B-C52H4)을 제조하였다. 1x 동적 완충액에서 180초 동안 회합을 측정하고 이어서 180초 동안 해리를 측정하였다. 10mM 글리신 pH 2.2를 재생을 위해 사용하였다.
- [0471] 생성된 데이터는 기준 웰 차감 (1188)에 의해 참조되었고, 기준선은 y-축으로 정렬되었고, 회합에 대한 정렬에 의한 단계-간 상관관계가 수행되었고 그리고 데이터는 데이터 분석 소프트웨어 (v.9.0.0.14)에서 Savitzky-Golay 필터링에 의해 평활화되었다. 가공된 데이터는 적합화 정확도의 측정으로서 χ^2 으로 1:1 랑뮤어 결합 모델을 사용하여 적합화되었다.

[0472] 결과 및 결론

[0473] 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 2674/2675, 1630/1631 및 REF 항체의 결합 친화성은 표 12에 제시되어 있다. 인간 CD137에 대한 2674/2675의 친화성은 1630/1631에 비교하여 인자 2에 의해 개선되었다. 사이노몰구스 CD137에 대한 2674/2675의 친화성은 1630/1631과 동일한 범위에 있었다.

[0474] [표 12]

[0475] 고정된 2674/2675, 1630/1631 및 REF 항체에 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 친화성

고정된 항체	인간 CD137			사이노몰구스 CD137		
	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)	kon (1/Ms)	koff (1/s)
2674/2675	6.9E-09	3.5E+05	2.4E-03	2.5E-08	1.6E+05	4.0E-03
1630/1631	1.4E-08	1.6E+05	2.3E-03	1.8E-08	1.4E+05	2.5E-03
REF1	3.0E-09	4.6E+05	1.4E-03	no binding		
REF 2	6.1E-09	6.8E+05	4.1E-03	1.0E-08	5.2E+05	5.3E-03

[0476]

[0477] 실시예 17 - 인간 FcγR들에 대한 2674/2675의 결합 친화도

[0478] 목적

[0479] 본 목적은 옥텟 플랫폼을 사용하여 인간 FcγR들에 2674/2675에 대한 상대적인 결합 친화성을 결정하기 위한 것이다.

[0480] 물질 및 방법

[0481] FcγR 친화성은 항-인간 Fab-CH1 (FAB2G) 센서 팁 (ForteBio)이 구비된 옥텟 RED96 플랫폼을 사용하여 결정되었다. 항체는 1X 동적 완충액 (ForteBio)에 200nM로 희석되고 >1.5nm의 고정화 반응에 도달하도록 300초 동안 8개 평행한 센서의 세트에 장입되었다. 고정된 항체는 그 다음 100nM에서 시작하는, 7개 2-배 희석의 FcγR들에 대해 분석되었다. 일 고정된 센서는 기준으로 하기 위해 1X 동적 완충액에 대해 분석되었고 전체 검정은 이중 기준화를 허용하도록 항체의 고정화 없이 반복되었다. 포함된 FcγR들은 R&D Systems (인간 FcγRI, #1257-FC-050; 인간 FcγRIIa, #1330-CD-050; 인간 FcγRIIb, #1460-CD-050; 인간 FcγRIIIa (V158), #4325-FC-050; 인간 FcγRIIIa (F158), #8894-FC-050)으로부터 획득되었다. FcγR들에 대한 결합은 60초 동안 수행되었고, 1X 동적 완충액에서 60초 동안 해리 및 10 mM 글리신, pH 1.7을 사용한 센서 팁의 재생이 이어졌다. 생성된 데이터는 표준 이중 기준화에 참고되었고, 기준선은 y-축으로 정렬되었고, 해리에 대한 정렬에 의한 단계-간 상관관계가 수행되었고 그리고 데이터는 데이터 분석 소프트웨어 (v.9.0.0.14)에서 Savitzky-Golay 필터링에 의해 평활화되었다. 가공된 데이터는 적합화 정확도의 측정으로서 χ^2 으로 1:1 랑뮤어 결합 모델을 사용하여 적합화되었다. 매우 빠른 해리 속도를 갖는 FcγR들에 대해 생성된 해리 곡선의 곡선 적합화 품질을 개선하기 위해, 단지 해리 곡선의 초기 10초가 곡선 적합화에 포함되었다.

[0482] 결과 및 결론

[0483] 2674/2675 및 REF 항체의 결합 친화성 인간 FcγR들이 표 13에 제시되어 있다. 2674/2675는 고친화도 수용체 FcγRI에 결합하는 IgG4 항체의 기대된 바와 같이, 모든 다른 분석된 Fc 수용체보다 인간 FcγRI에 대해 보다 강한 결합을 가졌다. 2674/2675는 인간 FcγR들에 대해 REF1 항체와 비교할만한 결합을 가졌다.

[0484] [표 13]

[0485] 2674/2675 및 REF 항체에 대해 인간 FcγR들에 대한 결정된 결합 친화성, KD (M)

KD (M)	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa 176V	FcγRIIIa176F
2674/2675	2.11E-09	1.00E-06	7.79E-07	< 측정 한계	< 측정 한계
REF1	1.88E-09	6.74E-07	6.23E-07	< 측정 한계	< 측정 한계
REF2	< 측정 한계	5.87E-07	2.70E-06	< 측정 한계	< 측정 한계

[0486]

[0487] **실시예 18 - FACS에 의해 측정된 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 2674/2675의 결합**

[0488] 이 연구의 목적은 인간 및 사이노몰구스 CD137에 대한 결합을 결정하기 위한 것이다.

[0489] 물질 및 방법

[0490] 결합 및 EC50은 인간 CD137, 사이노몰구스 CD137 또는 빈 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 유세포측정을 사용하여 결정되었다. 인간 또는 사이노몰구스 CD137의 세포의 부분은 인간 CD40의 막관통 및 세포내 부분에 융합되고 pcDNA3.1 안으로 클로닝되었다. 벡터는 후속으로 CHO 세포 안으로 안정적으로 형질감염되었다. CD137의 발현은 4°C에서 30분 동안 CD137 항체 (인간 CD137-PE, BD Biosciences # 555956)를 사용하여 유세포측정에 의하여 확인되었다. CD137-형질감염 및 빈 벡터-형질감염된 세포는 결합을 포화시키기 위해 4°C에서 적어도 1h 동안 CD137 항체로 인큐베이션하였다. 항체 내재화를 최소화하기 위해, 0.05% 아지드화 나트륨을 인큐베이션 완충액에 사용하였고 모든 작업은 얼음 상에서 수행하였다. CD137 항체는 4°C에서 30분 동안 인큐베이션된 PE-접합된 항-hIgG 항체 (109-115-098, Jackson ImmunoResearch laboratories)를 사용하여 검출되었다. 염색 직후 세포를 파라포름알데하이드 용액 (10x 농도 BD CellFIX, BD biosciences #340181)으로 고정시켰다. 세포는 FACSVerse (BD Biosciences)를 사용하여 유세포측정에 의하여 분석하였다. 각각의 샘플에 대한 중앙 형광 강도 (MFI)를 결정하고 용량 반응 데이터를 그래프패드 프리즘을 사용하여 분석하였다.

[0491] MFI 데이터는 각각의 항체에 대해 정규화되고, 여기서 각각의 항체에 대한 용량 적정에서 0%는 최저값으로 정의되고 100%는 최고값이다. EC50 및 95% 신뢰구간은 2회 실험으로부터의 데이터에 기반한 그래프 패드 프리즘으로 계산되었다 (비-선형 회귀 (곡선 적합), 0 및 100으로 설정된 제약조건).

[0492] 결과 및 결론

[0493] 2674/2675는 인간 CD137에 대해 친계 클론 1630 및 REF1 및 REF2 CD137 mAb들과 비교할만한 결합을 가졌다 도 8 및 표 14. 2674/2675 및 1630/1631은 사이노몰구스 CD137에 대해 비교할만한 결합을 가진 반면 REF1은 사이노몰구스 CD137에 전혀 결합하지 않았다.

[0494] [표 14]

[0495] 정규화된 데이터의 3 실험으로부터 평균으로 결정된 각각의 CD137 항체의 EC50에 대한 95% 신뢰구간. Nd: 검출 불가능

	Hu CD137 EC50 (nM) 95% 신뢰 구간	Cy CD137 EC50 (nM) 95% 신뢰 구간
2674/2675	0.26 - 0.37	0.46 - 0.77
1630/1631	0.23 - 0.34	0.55 - 0.87
REF1	0.33 - 0.73	n.d.
REF2	0.16 - 0.27	0.41 - 0.56

[0496] **실시예 19 - CD137 mAb의 가교결합에 대한 FcγR 발현 세포로 CD137 리포터검정**

[0498] 목적 및 배경

[0499] FcγR 형질감염된 CHO 세포와 CD137 mAb들이 가교결합할 때 CD137 리포터 검정에서 친계 클론 1630/1631으로 2674/2675의 기능적 평가.

[0500] 물질 및 방법

[0501] 인간 FcγRI, FcγRIIa R131, FcγRIIb 또는 빈 벡터 (pcDNA3.1)로 형질감염된 CHO-세포를 가교결합을 위해 사용하였다. FcγR 유전자는 pcDNA3.1 안으로 클로닝되었다. 벡터는 후속으로 CHO 세포 안으로 안정적으로 형질감염되었다. FcγR들의 발현은 상업적 항체 표적화 CD32 또는 CD64로 염색에 의해 확인되었다.

[0502] CD137 mAb들의 효능적 기능은 CD137 리포터 검정 (Promega, CD137 Bioassay Kit CS196005)을 사용하여 평가되었다. 검정은 제조자의 프로토콜에 따라 수행되었다. 간단히 말해서, FcγR 형질감염된 CHO 세포 및 CD137 mAb들의 적정 농도를 10% FCS를 함유하는 RPMI에 희석하고 CD137 (Jurkat/CD137 세포) 리포터 세포의 첨가 전에 검정플레이트에 첨가하였다. 검정 플레이트는 Bio-GloTM 루시퍼라아제 검정 검출의 부가와 BMG 판독기에서 플레이트를 판독할 때까지 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다.

- [0503] 결과 및 결론
- [0504] Fc γ RI 형질감염된 CHO 세포로 CD137 리포터 검정에서 CD137 mAb들의 가교결합은 2674/2675뿐만 아니라 친계 클론 1630/1631이 리포터 세포주에서 NF- κ B의 CD137 의존적 활성화를 유도한다는 것을 입증한다 (도 9). CD137 항체가 가교결합 의존적인 경우, Fc γ RI, Fc γ RIIa R131 및 Fc γ RIIb에 대한 결합 친화성 (이전의 실시예에 나타남)은 Fc γ R 가교 결합 후 CD137 리포터 검정에서 유도된 효능적 활성과 매우 관련이 있다고 귀결될 수 있다 (도 10). 2674/2675, 1630/1631 또는 REF2가 아닌 REF1의 Fc γ R 가교결합 독립적 활성화는 빈 벡터로 형질감염된 CHO 세포를 사용하여 결정되었다 (도 11).
- [0505] **실시예 20 - CD137 항체의 가교결합에 대한 Fc γ RI 발현 CHO 세포로 CD8⁺ T 세포 효능제 검정**
- [0506] 목적 및 배경
- [0507] Fc γ RI 발현 세포와 CD137 mAb들이 가교결합할 때 CD8⁺ T 세포 효능제 검정에서 친계 클론 1630/1631으로 2674/2675의 기능적 평가.
- [0508] 물질 및 방법
- [0509] 인간 Fc γ RI로 형질감염된 CHO-세포를 가교결합을 위해 사용하였다. Fc γ RI 유전자는 pcDNA3.1 안으로 클로닝되었다. 벡터는 후속으로 CHO 세포 안으로 안정적으로 형질감염되었다. Fc γ RI의 발현은 상업적 항체 표적화 CD64로 염색에 의해 확인되었다.
- [0510] CD137 항체의 효능적 활성은 원발성 인간 CD8⁺ T 세포에 기반한 T 세포 검정에서 평가되었다. 간단히, CD8⁺ T 세포는 제조자의 프로토콜에 따라 MACS 분리 (Miltenyi# 130-096-495)에 의해 인간 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리되었다. 세포는 Fc γ RI로 형질감염된 CHO 세포로 사전-인큐베이션된 96-웰 미세적정 플레이트 (NuncThermo Scientific #268200)에서 인큐베이션되고, 그리고 항-CD3 항체 (클론 OKT3, Affymetrix eBioscience # 16-0037)로 코팅된 토실 비드로 인큐베이션되고 그리고 시험되는 CD137 항체의 농도로 적정되었다. 72-시간 인큐베이션에 이어, 배양 배지를 수확하고 IFN- γ 수준을 ELISA (BD #555142)에 의해 결정하였다.
- [0511] 각각의 클론을 적어도 5개 공여체에서 분석하고 기준 CD137 항체 REF2에 대해 비교했다. 큰 공여체-간 변형에 기인하여, IFN- γ 수준은 비교를 위해 각각의 공여체 내의 2674/2675로 정규화되었다.
- [0512] 결과 및 결론
- [0513] REF2가 아닌 CD137 mAb 2674/2675 및 친계 클론 1630/1631의 CD8 T 세포 효능제 검정에서 Fc γ RI 발현 CHO 세포와 가교결합은 72시간 후 IFN- γ 생산에서의 증가로 측정될 때 T 세포 활성화를 유도한다 (도 12). 2674/2675, 1630/1631 및 REF2의 Fc γ R들에 대한 IgG 결합 친화성은 이전의 실시예에서 결정되고 나타내어졌다. Fc γ R에 대한 IgG 결합 친화성은 CD8⁺ T 세포에서 유도된 효능적 활성과 상관된다고 귀결될 수 있다.
- [0514] **실시예 21 - HT-29 결장암 모델에서 생체내 항-종양 효과**
- [0515] 목적
- [0516] 2674/2675의 항-종양 효과는 hPBMc 인간화된 면역결핍 마우스와 HT-29 결장 암종의 피하 종양 모델을 사용하여 조사하였다.
- [0517] 물질 및 방법
- [0518] 백혈구 농축물을 룬드 대학 병원으로부터 수득하였다. Taconic's Denmark로부터 암컷 SCID-Beige 마우스 (7-8w)를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 말뚝/룬드 윤리 위원회의 승인하에 수행하였다.
- [0519] HT-29 결장암은 ATCC로부터 수득하고 ATCC 권고에 따라 배양하였다. 대수 증식으로 배양한 HT-29 세포주를 피하로 주사하였다 (0일째 (D0)에 200 μ L 내 4x10⁶ 세포). 백혈구 농축물로부터 단리된 인간 PBMc (100 μ L 내 10x10⁶)는 같은 날에 복강내로 주사하였다. 복강내 치료 (100 μ g)는 7일째에 시작하여 3주 동안 매주 2회 수행하였다.
- [0520] 종양은 종양 용적이 계산되는 폭, 길이 및 높이로 캘리퍼로 측정하였다 (w/2x l/2xh/2x pi x (4/3)). 동물은 상처부위에서 종양 용적이 2cm³에 도달되기 전에 또는 마우스의 건강에 영향을 미치기 전에 종결되었다.

[0521] 결과 및 결론

[0522] 2674/2675는 비히클 그룹에 비교하여 인간화된 마우스 모델에서 항종양 효능을 실증했다. 종양 용적 억제의 백분율은 19 내지 28일째 사이에서 2674/2675로 0-35% 범위였다 (표 15).

[0523] 결론적으로, 2674/2675의 항-종양 효과는 hPBMc 인간화된 면역결핍 마우스와 HT-29 결장 암종의 피하 종양 모델을 사용하여 조사되었다. 2674/2675는 종양 용적 억제를 실증했다.

[0524] [표 15]

[0525] 종양 억제 퍼센트

종양 접종 후 일수	비히클에 비교된 종양 성장 억제 (종양 용적) (%)
D19	9.4
D21	24.0
D24	27.4
D26	24.7
D28	35.1

[0526]

[0527] **실시예 22 - 인간 종양 조직에서 FcγR 및 CD137 공동 발현의 유전자 발현 분석**

[0528] 목적

[0529] 마이크로어레이 및 RNA-seq 데이터세트의 관리된 및 품질-제어된 데이터베이스를 사용한 광범위한 인간 암에서 다양한 Fcγ 수용체뿐만 아니라 CD137의 유전자 발현을 분석한다.

[0530] 방법

[0531] FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb 및 CD137에 대한 평균 발현 값은 인간 조직에 대한 RNA 마이크로어레이 연구의 관리된 및 품질-제어된 데이터베이스인 Genevestigator를 사용하여 유전자 발현 프로파일링을 수행함에 의해 획득되었다 (그것의 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입되는, 문헌 [Hruz 등 2008, *Adv Bioinformatics* 2008:420747]). 상관관계 플롯은 다양한 Fcγ 수용체 유전자 대 CD137의 평균 발현 값을 플롯팅함에 의해 획득되었다 (도 13). Fcγ 수용체 및 CD137 양자의 평균 발현 이상 (평균 발현 수준 ≥ 10)을 나타내는 암이 확인되었고 상부 10개 고형 종양 유형 및 혈액 악성종양이 각각 표 16 및 표 17에 제시되어 있다.

[0532] 결과 및 결론

[0533] Fcγ 수용체의 높은 발현과 CD137의 평균 이상 발현을 갖는 몇 개의 인간 종양이 이 방법을 사용하여 확인되었다. 하기 표는 본 발명에서 정의된 항체에 대해 고도로 감수성일 수 있는 징후의 예를 제공한다. 이 접근법은 효능적 CD137 항체로의 치료로부터 이점이 있을 수 있는 환자 집단 또는 개별 환자를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 사실상, 이러한 유형의 접근법은 치료로부터 이점이 있을 수 있는 개체 수준에서의 환자를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 또한 면역조직화학, 유세포측정 또는 단백질 접근법과 같은 단백질 분석에 기반한 차세대서열 분석 또는 방법과 같이, 종양을 분자적으로 특성화하기 위해 사용되는 다른 방법을 고안할 수도 있다.

[0534] [표 16]

[0535] 도 13에서 확인된 바와 같이 Fcγ 수용체 및 CD137 (TNFRSF9) 양자의 평균 발현 이상 (평균 발현 수준 ≥ 10)을 갖는 고형 인간 종양의 평균 발현 값. 6개 Fcγ 수용체의 최고 발현을 갖는 10개 종양이 나타나 있다.

FcγRIA 및 TNFRSF9를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
섬유질조직구종, 악성, 전이성	13.43	10.22
선편평세포암종	12.78	10.80
미분화된육종	12.67	10.16
투명세포선암종, NOS, 전이성	12.66	10.62
샘파리세포암종	12.47	10.82
탈분화된지방육종	12.45	10.67
신장세포암종, 언급되지 않은 행동	12.44	10.38
도관내미세유두상암종	12.36	10.68
섬유질조직구종, 악성	12.35	11.05
대세포신경내분비암종	12.35	10.29

[0536]

FcγRIIA 및 TNFRSF9를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
랑게르한스-세포조직구종, 단조절	14.58	13.85
샘파리세포암종	13.55	10.82
섬유질조직구종, 악성, 전이성	13.54	10.22
미분화된육종	13.48	10.16
혼합된 하위유형이 있는 선암종	13.43	10.77
탈분화된 지방육종	13.32	10.67
미분화된육종	13.22	10.52
섬유질조직구종, 악성	13.10	11.05
선편평세포암종	13.01	10.80
탈분화된 지방육종	12.95	10.36

[0537]

FcγRIIB 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIB (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
랑게르한스-세포조직구종, 단초점	13.23	13.85
섬유질조직구종, 악성, 전이성	12.64	10.22
혼합된 하위유형이 있는 선암종	12.42	10.77
선편평세포암종	12.22	10.80
샘꽂리세포암종	12.19	10.82
호지킨 질환, NOS	12.01	10.88
신장세포암종, 언급되지 않은 행동	12.00	10.38
탈분화된지방육종	11.98	10.67
유두상선암종, NOS	11.81	10.02
미분화된육종	11.76	10.16

[0538]

FcγRIIC 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIC (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
랑게르한스-세포조직구종, 단초점	12.72	13.85
FcγRIIIA 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
섬유질조직구종, 악성, 전이성	14.14	10.22
샘꽂리세포암종	13.14	10.82
대세포신경내분비암종	12.97	10.29
혼합된 하위유형이 있는 선암종	12.91	10.77
신장세포암종, 언급되지 않은 행동	12.85	10.38
도관내미세유두상암종	12.83	10.68
암종, NOS	12.70	10.19
암종, NOS	12.68	10.06
미분화된육종	12.52	10.16

[0539]

FcγRIIIB 및 TNFRSF9를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIIB (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
암종, NOS	13.09	10.19
암종, NOS	12.66	10.06
암종, NOS	12.61	10.10
관형선암종	12.06	10.18
암종, NOS, 마이크로-해부됨	12.00	10.92
선암종, 장내유형	11.97	10.26
섬유질조직구종, 악성, 전이성	11.89	10.22
신생물, 악성	11.81	10.05
선암종, NOS	11.74	10.06
신장세포암종, 언급되지 않은 행동	11.61	10.38

[0540]

[0541]

[0542]

[표 17]

도 13에서 확인된 바와 같이 Fcγ 수용체 및 CD137 양자의 평균 발현 이상 (평균 발현 수준 ≥ 10)을 갖는 혈액 악성종양의 평균 발현 값. 6개 Fcγ 수용체의 최고 발현을 갖는 10개 악성종양이 나타나있다.

FcγRIA 및 TNFRSF9를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
(결절의) NK/T-세포림프종, 비강 및 비강-유형	13.97	11.56
호지킨 질환, NOS	13.65	10.88
악성림프종, 큰 B-세포, 확산	12.15	12.23
원발성종격동 B-세포림프종	12.13	12.43
역형성대세포림프종, T-세포 및 무호세포유형 (ALCL), 언급되지 않은 행동	12.11	11.38
혈관면역모세포 T-세포림프종	11.93	13.85
성숙한 T-세포림프종, NOS	11.86	12.53
성숙한 T-세포림프종, NOS, 언급되지 않은 행동	11.69	11.72
역형성대세포림프종, T-세포및무호세포유형 (ALCL)	11.67	11.43
혈관면역모세포 T-세포림프종, 언급되지 않은 행동	11.63	12.98

[0543]

FcγRIIA 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
군상식육종	13.27	11.34
호지킨 질환, NOS	12.33	10.88
(결절의)NK/T-세포림프종, 비강 및 비강-유형	12.26	11.56
성숙한 T-세포림프종, NOS	11.76	12.53
혈관면역모세포 T-세포림프종	11.69	13.85
악성림프종, 큰 B-세포, 확산	11.37	12.23
혈관면역모세포 T-세포림프종, 언급되지 않은 행동	11.34	12.98
성숙한 T-세포림프종, NOS, 언급되지 않은 행동	11.33	11.72
성인 T-세포백혈병/림프종 (HTLV-1 양성), 언급되지 않은 행동	11.28	11.13
역형성대세포림프종, T-세포및무호세포유형 (ALCL), 언급되지 않은 행동	11.23	11.38

[0544]

FcγRIIB 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIB (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
만성림프구성 B-세포백혈병, 언급되지 않은 행동, 마이크로-해부됨	14.69	10.46
외투세포림프종	14.06	10.11
(결절의) 변연부 B-세포림프종, NOS	12.73	11.85
악성림프종, 결절성, NOS, 언급되지 않은 행동	12.69	12.97
악성림프종, 결절성, NOS	12.16	12.02
호지킨 질환, NOS	12.01	10.88
악성림프종, 큰 B-세포, 확산	11.97	12.23
혈관면역모세포 T-세포림프종	11.89	13.85
군상식육종	11.76	11.34
호지킨 질환, NOS, 마이크로-해부됨	11.38	11.32

[0545]

FcγRIIC 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIC (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
유년골수단핵구성백혈병	10.00	10.00

[0546]

FcγRIIIA 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIIA (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
유년골수단핵구성백혈병	13.19	10.00
(결절의)NK/T-세포림프종, 비강및비강-유형	12.09	11.56
근상식육종	11.71	11.34
성숙한 T-세포림프종, NOS	11.16	12.53
역형성대세포림프종, T-세포및무호세포유형 (ALCL)	10.80	11.43
혈관면역모세포 T-세포림프종	10.65	13.85
호지킨 질환, NOS	10.51	10.88
역형성대세포림프종, T-세포 및 무호세포유형 (ALCL), 언급되지 않은 행동	10.38	11.38
악성림프종, 큰 B-세포, 확산	10.31	12.23
원발성종격동 B-세포림프종	10.26	12.43

[0547]

FcγRIIIB 및 TNFRSF9 를 발현하는 세포를 갖는 암	FcγRIIIB (평균 발현수준)	TNFRSF9 (평균 발현수준)
유년골수단핵구성백혈병	15.03	10.00
(결절의)NK/T-세포림프종, 비강및비강-유형	11.95	11.56
역형성대세포림프종, T-세포및무호세포유형 (ALCL), 언급되지 않은 행동	11.85	11.38
성숙한 T-세포림프종, NOS	11.57	12.53
성숙한 T-세포림프종, NOS, 언급되지 않은 행동	11.56	11.72
혈관면역모세포 T-세포림프종, 언급되지 않은 행동	11.54	12.98
원발성종격동 B-세포림프종	11.44	12.43
혈관면역모세포 T-세포림프종	11.30	13.85
성인 T-세포백혈병/림프종 (HTLV-1 양성), 언급되지 않은 행동	11.08	11.13
(결절의) 변연부 B-세포림프종, NOS	10.95	11.85

[0548]

[0549]

참고문헌

- Almeida J, Bueno C, Alguero MC et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol*. 2001 Sep;100(3):325-38.
- Akhmetzyanova, I., Zelinskyy, G., Littwitz-Salomon, E., Malyshkina, A., Dietze, K. K., Streeck, H., Brandau, S., and Dittmer, U. (2016) CD137 Agonist Therapy Can Reprogram Regulatory T Cells into Cytotoxic CD4+ T Cells with Antitumour Activity. *J. Immunol*. 196, 484-492.
- Ascierto, P. A., Simeone, E., Sznol, M., Fu, Y. X., and Melero, I. (2010) Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin. Oncol*. 37, 508-516.
- Baessler T, Charton JE, Schmiedel BJ, Grünebach F, Krusch M, Wacker A, Rammensee HG, Salih HR. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3058-69. doi: 10.1182/blood-2009-06-227934. Erratum in: *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6152. PubMed PMID: 20008791.
- Bartkowiak, T. and Curran, M. A. (2015) 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumour Immunity. *Front Oncol*. 5, 117.
- Bronte V, Brandau S, Chen SH et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016 Jul 6;7:12150.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716-25.
- Bulliard Y, Jolicoeur R, Zhang J, Dranoff G, Wilson NS, Brogdon JL. OX40 engagement depletes intratumoural Tregs via activating FcγRs, leading to antitumour efficacy. *Immunol Cell Biol*. 2014 Jul;92(6):475-80. doi: 10.1038/icb.2014.26. PubMed PMID: 24732076.
- Cavna MJ, Zeng S, Kim TS et al. KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization. *J Exp Med*. 2013 Dec 16;210(13):2873-86.
- Cheeseman HM, Carias AM, Evans AB et al. Expression Profile of Human Fc Receptors in Mucosal Tissue: Implications for Antibody-Dependent Cellular Effector Functions Targeting HIV-1 Transmission. *PLoS One*. 2016 May 10;11(5):e0154656.
- Curran, M. A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A., and Allison, J. P. (2011) Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumour rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS. ONE*. 6, e19499.
- Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J. L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevello, J. L., Ochoa, M. C., Hervas-Stubbs, S., Prieto, J., Jure-Kunkel, M., Chen, L., and Melero, I. (2010) Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumour immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol. Immunother*. 59, 1223-1233.

[0550]

Gauttier, V., Judor, J. P., Le, G., V, Cany, J., Ferry, N., and Conchon, S. (2014) Agonistic anti-CD137 antibody treatment leads to antitumour response in mice with liver cancer. *Int. J. Cancer* 135, 2857-2867.

Gray, J. C., French, R. R., James, S., Al-Shamkhani, A., Johnson, P. W., and Glennie, M. J. (2008) Optimising anti-tumour CD8 T-cell responses using combinations of immunomodulatory antibodies. *Eur. J. Immunol.* 38, 2499-2511.

Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y et al. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2014 Feb;14(2):94-108.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013) Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *J. Transl. Med.* 11, 215.

Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K et al. Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. *Front Immunol.* 2017 Feb 6;8:86

Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest.* 2014 Dec;124(12):5466-80.

Eruslanov E, Neuberger M, Daurkin I et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J Cancer.* 2012 Mar 1;130(5):1109-19.

Griesinger AM, Birks DK, Donson AM et al. Characterization of distinct immunophenotypes across pediatric brain tumor types. *J Immunol.* 2013 Nov 1;191(9):4880-8.

Grugan KD, McCabe FL, Kinder M et al. Tumor-associated macrophages promote invasion while retaining Fc-dependent anti-tumor function. *J Immunol.* 2012 Dec 1;189(11):5457-66.

Hansen BD, Schmidt H, von der Maase H et al. Tumour-associated macrophages are related to progression in patients with metastatic melanoma following interleukin-2 based immunotherapy. *Acta Oncol.* 2006;45(4):400-5.

Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Mar 30;11(4):311-31.

Holbrook E, Kohrt, A, Dimitrios Colevas, Roch Houot,1,2,3 Kipp Weiskopf, Matthew J. Goldstein, Peder Lund, Antonia Mueller, Idit Sagiv-Barfi, Aurelien Marabelle, Ruth Lira, Emily Troutner, Lori Richards,1 Amanda Rajapaska, Jonathan Hebb, Cariad Chester, Erin Waller,Anton Ostashko, Wen-Kai Weng,Lieping Chen, Debra Czerwinski, Yang-Xin Fu, John Sunwoo, and Ronald Levy. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 124 Number 6 June 2014

Horton HM, Bennett MJ, Peipp M, Pong E, Karki S, Chu SY, Richards JO, Chen H, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA. Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent in vitro and in vivo antitumour activity against hematologic malignancies. *Blood.* 2010 Oct 21;116(16):3004-12.
doi: 10.1182/blood-2010-01-265280. PubMed PMID: 20616215.

[0551]

- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P: Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008, **2008**:420747.
- Hu W, Li X, Zhang C et al. Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol*. 2016 Mar;18(3):251-8.
- Kim, J. A., Averbook, B. J., Chambers, K., Rothchild, K., Kjaergaard, J., Papay, R., and Shu, S. (2001) Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumour immunity and on tumour-reactive T-cell generation. *Cancer Res* 61, 2031-2037.
- Kwong, B., Gai, S. A., Elkhader, J., Wittrup, K. D., and Irvine, D. J. (2013) Localized immunotherapy via liposome-anchored Anti-CD137 + IL-2 prevents lethal toxicity and elicits local and systemic antitumour immunity. *Cancer Res*. 73, 1547-1558.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., and Kwon, B. S. (2002) 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169, 4882-4888.
- Lee, S. J., Myers, L., Muralimohan, G., Dai, J., Qiao, Y., Li, Z., Mittler, R. S., and Vella, A. T. (2004) 4-1BB and OX40 dual costimulation synergistically stimulate primary specific CD8 T cells for robust effector function. *J. Immunol*. 173, 3002-3012.
- Li Y, Lee PY, Kellner ES et al. Monocyte surface expression of Fcγ receptor RI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R90
- Li C, Luo X, Lin Y et al. A Higher Frequency of CD14+ CD169+ Monocytes/Macrophages in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015 Oct 28;10(10):e0141817.
- Li, F. and Ravelch, J. V. (2011) Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumour activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.
- Lu J, Chu J, Zou Z et al. Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 20;112(3):833-8
- McMillin, D. W., Hewes, B., Gangadharan, B., Archer, D. R., Mittler, R. S., and Spencer, H. T. (2006) Complete regression of large solid tumours using engineered drug-resistant hematopoietic cells and anti-CD137 immunotherapy. *Hum. Gene Ther* 17, 798-806.
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellstrom, K. E., Mittler, R. S., and Chen, L. (1997) Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumours. *Nat Med* 3, 682-685.
- Melero I, Daniel Hirschhorn-Cymerman, Aizea Morales-Kastresana, et al. Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK cells *Clin Cancer Res* 2013;19:1044-1053. Published online March 3, 2013.
- Melero I, Antonio M. Grimaldi, Jose L. Perez-Gracia, et al. Clinical Development of Immunostimulatory Monoclonal Antibodies and Opportunities for Combination. *Clin Cancer Res* 2013;19:997-1008.
- Miller, R. E., Jones, J., Le, T., Whitmore, J., Boiani, N., Gliniak, B., and Lynch, D. H. (2002) 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumour-specific immune

responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner. *J Immunol* 169, 1792-1800.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M. F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervás-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., Azpilikueta, A., Bolanos, E., Jure-Kunkel, M., Gutgemann, I., and Melero, I. (2013) Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin. Cancer Res.* 19, 6151-6162.

Morimura T, Neuchrist C, Kitz K et al. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol.* 1990;80(3):287-94.

Norton SE, Dunn ET, McCall JL et al. Gut macrophage phenotype is dependent on the tumor microenvironment in colorectal cancer. *Clin Transl Immunology.* 2016 Apr 29;5(4):e76.

Niu, L., Strahotin, S., Hewes, B., Zhang, B., Zhang, Y., Archer, D., Spencer, T., Dillehay, D., Kwon, B., Chen, L., Vella, A. T., and Mittler, R. S. (2007) Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. *J. Immunol.* 178, 4194-4213.

Overdijk MB, Verploegen S, Ortiz Buijsse A, Vink T, Leusen JH, Bleeker WK, Parren PW. Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells. *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3430-8. PubMed PMID: 22956577.

Palazón A, Iván Martínez-Forero, Alvaro Teijeira, et al. The HIF-1a Hypoxia Response in Tumour-Infiltrating T Lymphocytes Induces Functional CD137 (4-1BB) for Immunotherapy *Cancer Discovery* 2012;2:608-623, Published OnlineFirst June 19, 2012.

Palazón A, Teijeira A, Martínez-Forero I, Hervás-Stubbs S, Roncal C, Peñuelas I, Dubrot J, Morales-Kastresana A, Pérez-Gracia JL, Ochoa MC, Ochoa-Callejero L, Martínez A, Luque A, Dinchuk J, Rouzaut A, Jure-Kunkel M, Melero I. Agonist anti-CD137 mAb act on tumour endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):801-11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1733. PubMed PMID: 21266358.

Pan, P. Y., Zang, Y., Weber, K., Meseck, M. L., and Chen, S. H. (2002) OX40 ligation enhances primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses in an immunotherapy for hepatic colon metastases. *Mol Ther* 6, 528-536.

Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Sep;61(9):1373-85.

Pulle, G., Vidric, M., and Watts, T. H. (2006) IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* 176, 2739-2748.

Rabu, C., Quemener, A., Jacques, Y., Echasserieau, K., Vusio, P., and Lang, F. (2005) Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity. *J Biol Chem* 280, 41472-41481.

Roussel M, Ferrell PB Jr, Greenplate AR et al. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol.* 2017 Aug;102(2):437-447

[0553]

Sallin, M. A., Zhang, X., So, E. C., Burch, E., Cai, L., Lin, W., Chapoval, A. I., and Strome, S. E. (2014) The anti-lymphoma activities of anti-CD137 monoclonal antibodies are enhanced in FcγRIII(-/-) mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 947-958.

Sanmamed, M. F., Pastor, F., Rodriguez, A., Perez-Gracia, J. L., Rodriguez-Ruiz, M. E., Jure-Kunkel, M., and Melero, I. (2015) Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin. Oncol.* 42, 640-655.

Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., and Mittler, R. S. (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp. Med.* 186, 47-55.

So, T., Lee, S. W., and Croft, M. (2008) Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 253-262.

Solito S, Marigo I, Pinton L et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun;1319:47-65.

Stewart R, Hammond S, Oberst M, Wilkinson R. (2014) The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J Immunother.* 2:29

St Rose, M. C., Taylor, R. A., Bandyopadhyay, S., Qui, H. Z., Hagymasi, A. T., Vella, A. T., and Adler, A. J. (2013) CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-γ maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. *Immunol. Cell Biol.* 91, 173-183.

Sun Y, Subudhi SK, Fu YX. Co-stimulation agonists as a new immunotherapy for autoimmune diseases. *Trends Mol Med.* 2003 Nov;9(11):483-9. Review. PubMed PMID: 14604826.

Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Chan, H. T., Haswell, L. E., Green, M. H., Tutt, A. L., Glennie, M. J., and Al-Shamkhani, A. (2002) Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumour immune responses. *Eur J Immunol* 32, 3617-3627.

Uno, T., Takeda, K., Kojima, Y., Yoshizawa, H., Akiba, H., Mittler, R. S., Gejyo, F., Okumura, K., Yagita, H., and Smyth, M. J. (2006) Eradication of established tumours in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat. Med.* 12, 693-698.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520. Review. PubMed PMID: 25368619; PubMed Central PMCID: PMC4202688.

Vinay, D. S. and Kwon, B. S. (2012) Immunotherapy of cancer with 4-1BB. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1062-1070.

Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015 Jul 27;6:368. doi: 10.3389/fimmu.2015.00368. Review. PubMed PMID: 26284063; PubMed Central PMCID: PMC4515552.

[0554]

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., and Guo, Y. (2013) Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS ONE*. 8, e84927.

Westwood, J. A., Darcy, P. K., Guru, P. M., Sharkey, J., Pegram, H. J., Amos, S. M., Smyth, M. J., and Kershaw, M. H. (2010) Three agonist antibodies in combination with high-dose IL-2 eradicate orthotopic kidney cancer in mice. *J. Transl. Med.* 8, 42.

Westwood, J. A., Matthews, G. M., Shortt, J., Faulkner, D., Pegram, H. J., Duong, C. P., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Sharp, L. L., Huhn, R. D., Darcy, P. K., Johnstone, R. W., and Kershaw, M. H. (2014a) Combination anti-CD137 and anti-CD40 antibody therapy in murine myc-driven hematological cancers. *Leuk. Res.* 38, 948-954.

White AL, Chan HT, French RR, Willoughby J, Mockridge CI, Roghanian A, Penfold CA, Booth SG, Dodhy A, Polak ME, Potter EA, Ardern-Jones MR, Verbeek JS, Johnson PW, Al-Shamkhani A, Cragg MS, Beers SA, Glennie MJ. Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell*. 2015 Jan 12;27(1):138-48. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.001. PubMed PMID: 25500122; PubMed Central PMCID:PMC4297290.

Westwood, J. A., Potdevin Hunnam, T. C., Pegram, H. J., Hicks, R. J., Darcy, P. K., and Kershaw, M. H. (2014b) Routes of delivery for CpG and anti-CD137 for the treatment of orthotopic kidney tumours in mice. *PLoS ONE*. 9, e95847.

Wilcox, R. A., Flies, D. B., Zhu, G., Johnson, A. J., Tamada, K., Chapoval, A. I., Strome, S. E., Pease, L. R., and Chen, L. (2002) Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumours. *J Clin Invest* 109, 651-659.

Wilson, N. S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J. M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G., and Ashkenazi, A. (2011b) An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* 19, 101-113.

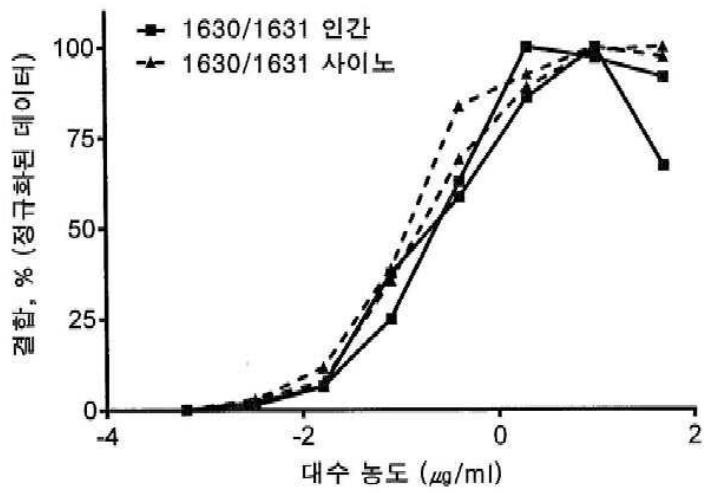
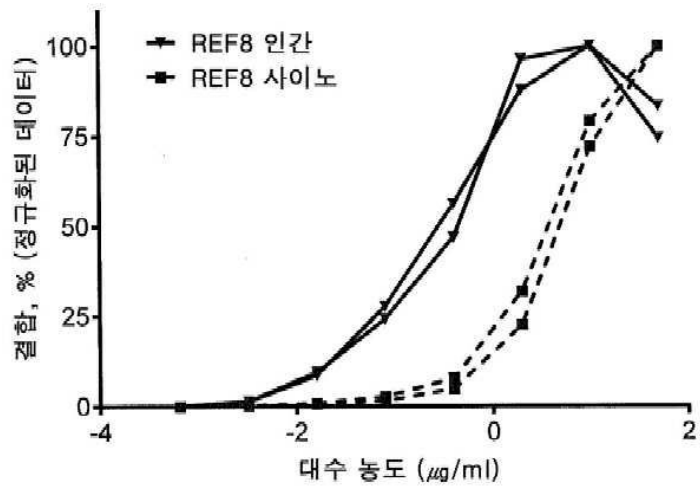
Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G. U., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2009) Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol* 183, 1851-1861.

Zhang, N., Sadun, R. E., Arias, R. S., Flanagan, M. L., Sachsman, S. M., Nien, Y. C., Khawli, L. A., Hu, P., and Epstein, A. L. (2007) Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumours. *Clin. Cancer Res.* 13, 2758-2767.


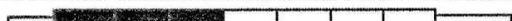





Zhang B, Wang Z, Wu L et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e57114

도면

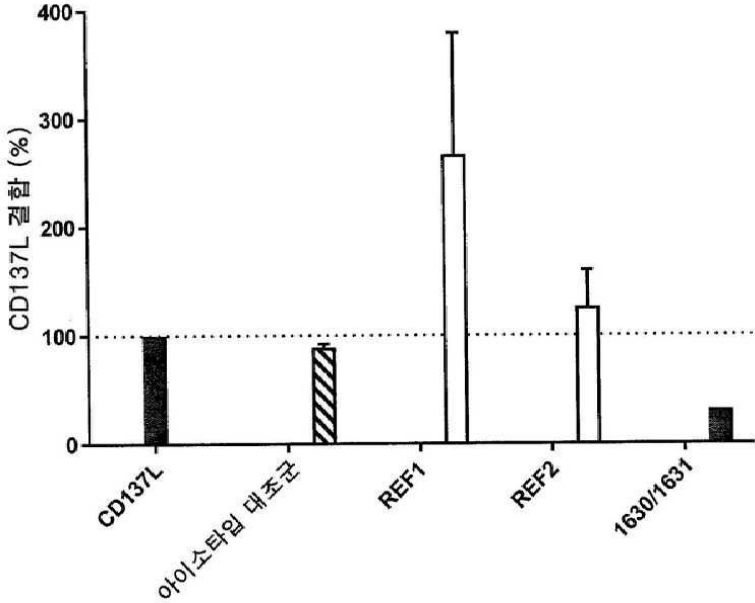
도면1



도면2

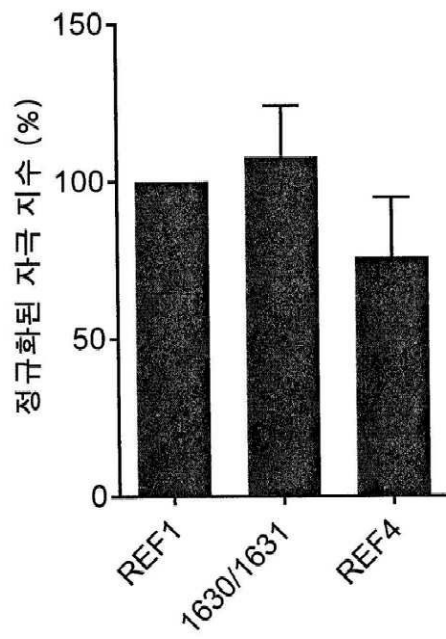
유전자 ID	도메인:	1	2	3	4			
	모듈:		A	B	A	B	A	B
	신호							
	펩타이드							
1550								
1551								
1552								
1553								
1554								
1555								

도면3

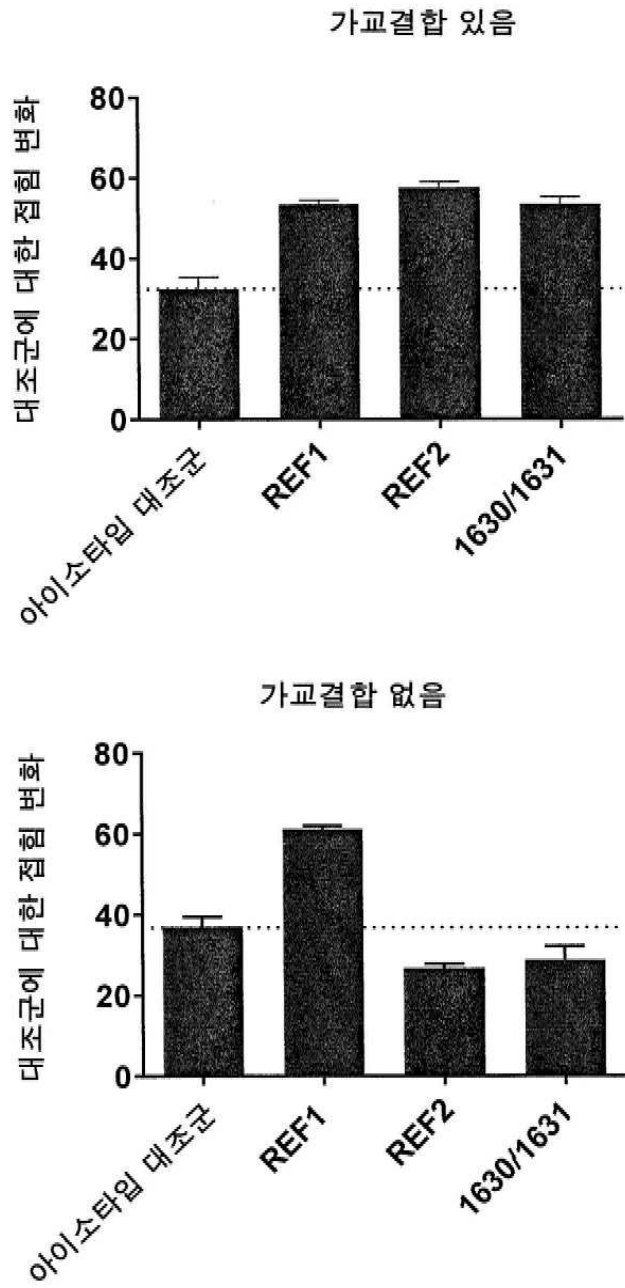


도면4

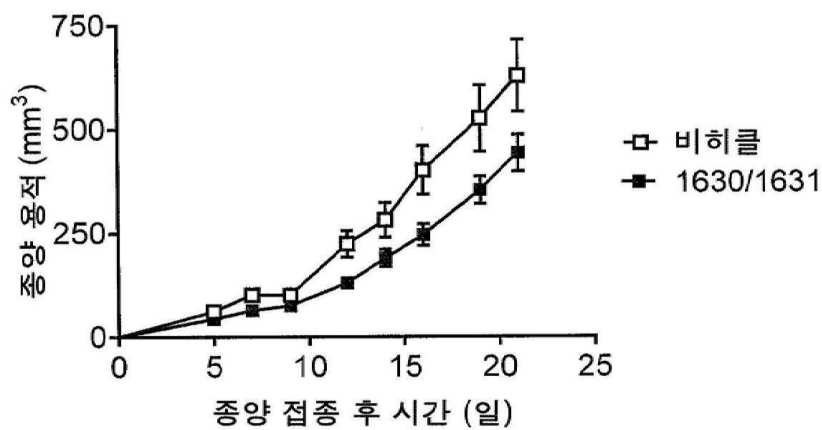
INF γ 방출에 의해 측정된 CD8 T 세포 자극



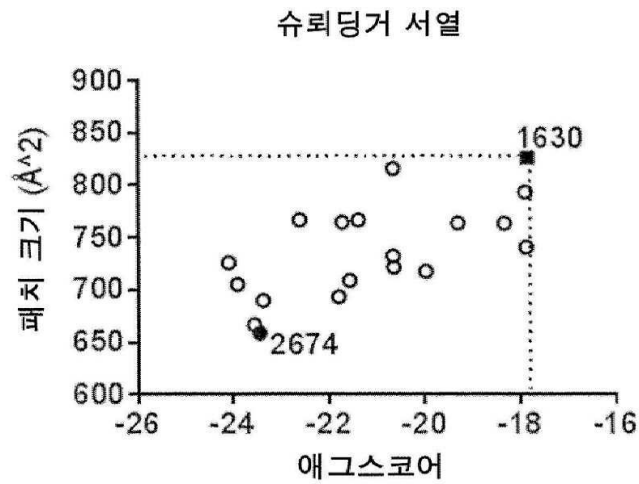
도면5



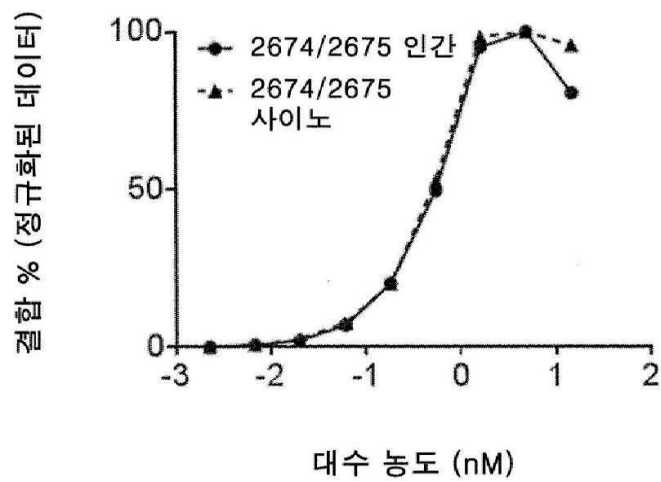
도면6



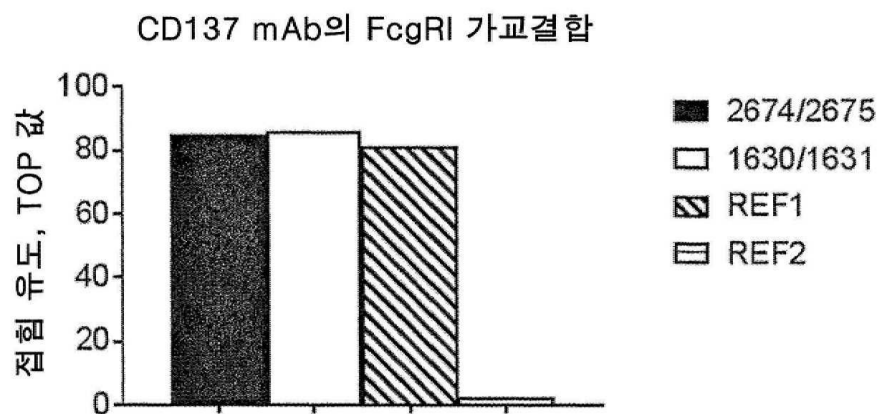
도면7



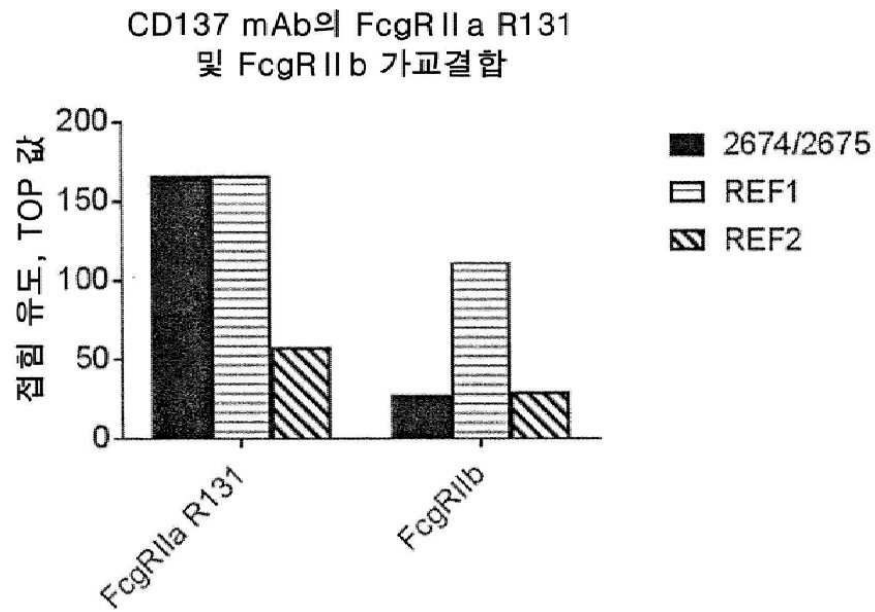
도면8



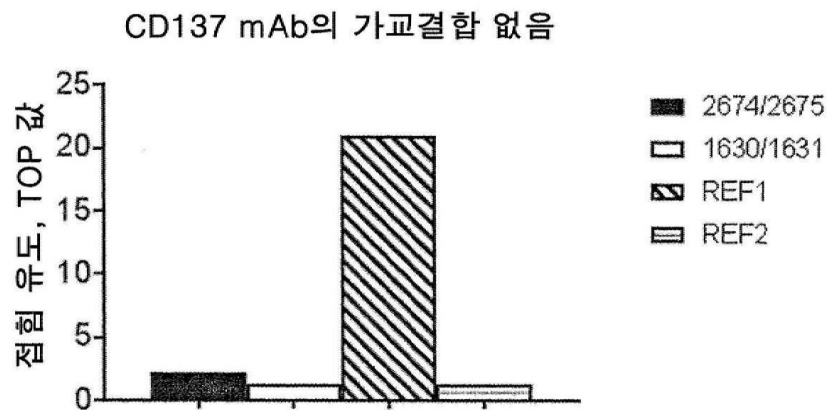
도면9



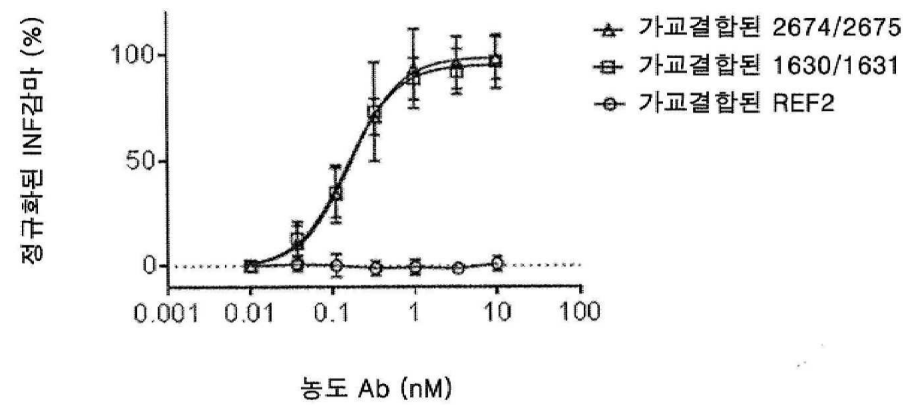
도면10



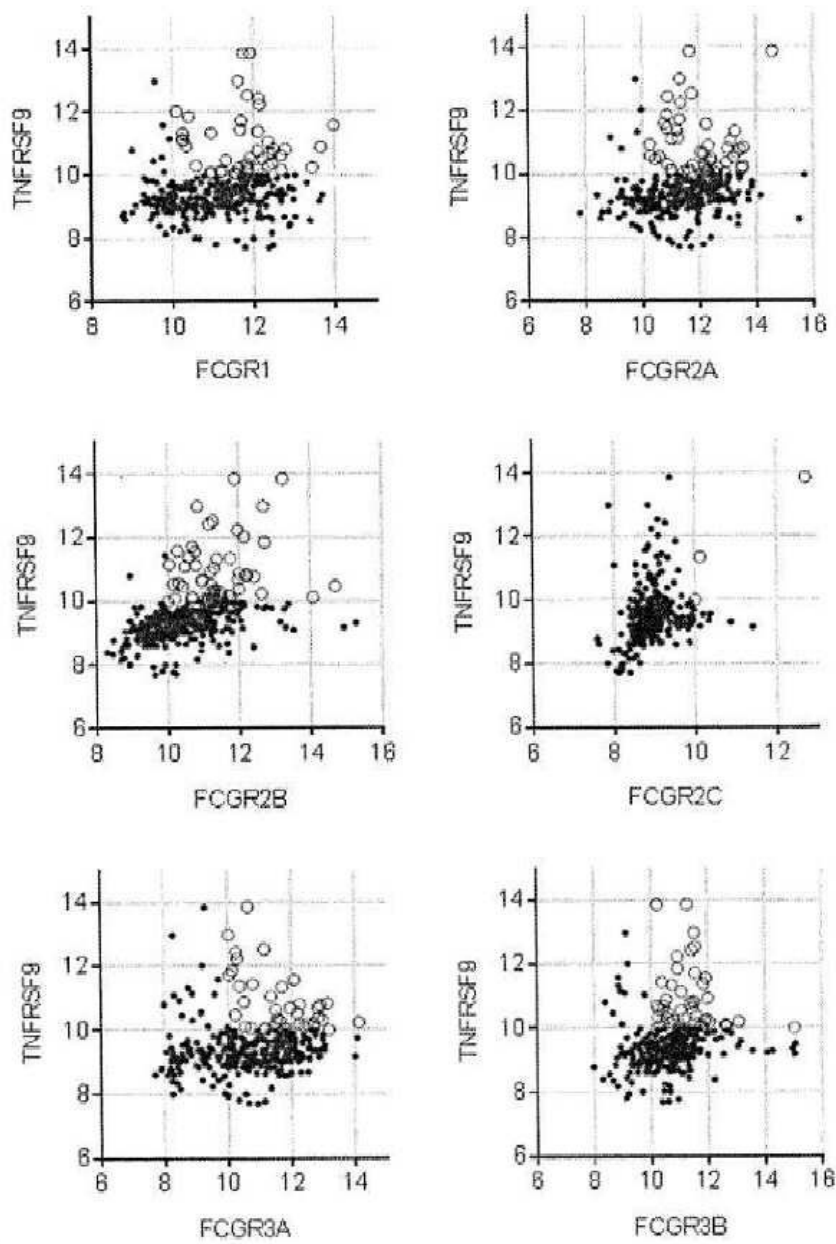
도면11



도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Alligator Bioscience AB
- <120> NOVEL ANTIBODIES AND USES THEREOF
- <130> ALLBA/P64652PC
- <140> EPPCT/2017/079930
- <141> 2017-11-21
- <150> GB1619648.7
- <151> 2016-11-21
- <160> 30

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1630/1631 heavy chain variable region

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1630/1631 light chain variable region

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Trp Val Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region CDR

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Gly Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region CDR

<400> 4

Ile Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 5

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Heavy chain variable region CDR
 <400> 5
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Pro Gly Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Light chain variable region CDR
 <400> 6
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 7
 <400> 7
 000
 <210> 8
 <211> 10
 <212>
 > PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Light chain variable region CDR
 <400> 8
 Gln Gln Tyr Tyr Thr Trp Val Pro Phe Thr
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> 1630 VH

<400> 9

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgcctc	60
tcctgtgcag ccagcggatt cacctttggt tactcttaca tgtcttgggt cgcgcaggct	120
ccaggaagg ggcctggagt ggtctcatct attggttctg gttcttctta cacatactat	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtgaca attccaagaa cacgtgtat	240

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcgtttac	300
tcttctccgg gtattgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca	354

<210> 10

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1631 VL

<400> 10

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc	60
atcacttgcc gggcaagta gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
cgtttcagt gcatgggaag cgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct	240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tactacactt gggttccgtt cacttttggc	300
caggggacca agctggagat caaa	324

<210> 11

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20	25	30
----	----	----

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35

40

45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255
<210> 12
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

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

<210> 13

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified IgG4 constant region

<400> 13

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

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

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

115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified IgG4 constant region

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225						230						235						240	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp				
					245						250						255		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys				
					260						265						270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser				
					275						280						285		
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser				
					290						295						300		
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser				
					305						310						315		
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys											320		
					325														
<210> 15																			
<211> 327																			
<212> PRT																			
<213> Homo sapiens																			
<400> 15																			
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg				
1						5						10						15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr				
					20						25						30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser				
					35						40						45		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser				
					50						55						60		
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr				
					65						70						75		
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
					85						90						95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro				

100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

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

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

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

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

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

<210> 17

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 1630/1631- Full sequence Heavy chain

<400> 17

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

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

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

35 40 45

Ser Ser Ile Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

 85 90 95
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Pro Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

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

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

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 18
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 1630/1631 - Full sequence Light chain
<400> 18

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

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

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

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

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

65				70				75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Trp	Val	Pro
85				90				95							
Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
100				105				110							
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
115				120				125							
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
130				135				140							

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> 2674/2675 heavy chain variable region

<400> 19

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

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

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2674/2675 light chain variable region

<400> 20

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

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

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

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Heavy chain variable region CDR
 <400> 21
 Gly Phe Asn Phe Gly Tyr Ser Tyr
 1 5
 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Heavy chain variable region CDR
 <400> 22
 Ile Gly Ser Thr Ser Ser His Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Heavy chain variable region CDR
 <400> 23
 Ala Arg Val Tyr Ser Ser Pro Gly Ile Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Light chain variable region CDR
 <400> 24

Gln Ser Ile Gly Ser Thr

1 5

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region CDR

<400> 26

Gln Gln Tyr Tyr Thr Trp Val Pro Phe Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2674, VH

<400> 27

gaggtgcagt tgttggaaac tggcggagga ttggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgtgccg cctctggctt caacttcggc tactcctaca tgtcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaaag gactggaatg ggtgtcctcc atcggctcca ccagctctca cacctactac 180
gccgattccg tgaagggcag attcaccatc agccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagagtgtac 300

tcctctctctg gcatcgatta ttggggccag ggcacactgg tcaccgtgtc ctctgcttct 360
accaagggac cctctgtgtt ccctctggct ccttgtcca gatccacctc tgagtctacc 420
gtgtgtcttg gctgccttgt caaggattac ttctctgagc ctgtgaccgt gtcttggaaac 480
tccgggtgtc tgacatccgg cgtgcacaca ttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540
tactctctgt cctctgtcgt gaccgtgcct tctagctctc tgggcaccaa gacctacacc 600
tgtaacgtgg accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agcgcgtgga atctaagtac 660

ggccctccat gtccaccatg tctgctcca gaattctctg gcggaccaag cgtgttcctg 720

tttctccaa agcctaagga caccctgatg atctctcgga cccctgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggatg tgtctcaaga ggaccagaa gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt tcaactccac ctacagagtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 960

gtgtccaaca agggcctgcc ttccagcatc gaaaagacca tctccaaggc taagggccag 1020

cctcgggaac ctacagttta caccctgcct ccaagccaag aggaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgcctcgt gaagggattc tacccttccg atatcgccgt ggaatgggag 1140

tctaacggcc agccagagaa caactacaag acaaccctc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

tctttcttc tgtattctcg cctgaccgtg gacaagtctc ggtggcaaga gggcaacgtg 1260

ttctctgct ctgtgatga cgaggccctg cacaaccact acacacagaa gtccctgtct 1320

ctgtccctgg gcaag 1335

<210> 28

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2675, VL

<400> 28

gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcct ctgtggcgca cagagtgacc 60

atcacctgtc gggctttctc gtccatcggc agcacctga actggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctatggc gctagctctc tgcagtctgg cgtgccctct 180

agattttccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga caatcagttc cctgcagcct 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactacacct gggtgccctt tacctttggc 300

cagggcacca agctggaaat caagagaacc gtggccgctc cttccgtgtt catcttccca 360

ccatctgacg agcagctgaa gtccggcaca gcttctgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

taccctggg aagccaaggt gcagtggaag gtggacaatg cctgcagtc cggcaactcc 480

caagagtctg tgaccgagca ggactccaag gactctacct acagcctgtc ctccacactg 540

acctgtcta aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccatcag 600

ggactgtcta gcccgtgac caagtccttc aacagaggcg agtgt 645

<210> 29

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2674/2675 - Full sequence heavy chain

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 30

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 2674/2675 - Full sequence light chain

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Trp Val Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215