



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049829
(43) 공개일자 2024년04월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7009916
- (22) 출원일자(국제) 2022년08월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/115536
- (87) 국제공개번호 WO 2023/030258
국제공개일자 2023년03월09일
- (30) 우선권주장
PCT/CN2021/115621 2021년08월31일 중국(CN)
- (71) 출원인
라노바 메디신즈 리미티드 컴파니
중국 상하이 201210 푸둥 뉴 디스트릭트 창타이 스퀘어 진커 로드 2889 빌딩 10 3층 스위트 티씨-318
- (72) 발명자
리 룬셴
중국 상하이 201315 푸둥 뉴 디스트릭트 강차오 타운 렌난 빌리지 그룹 6 넘버 177
- 후양 웬타오
중국 상하이 201315 푸둥 뉴 디스트릭트 강차오 타운 렌난 빌리지 그룹 6 넘버 177
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

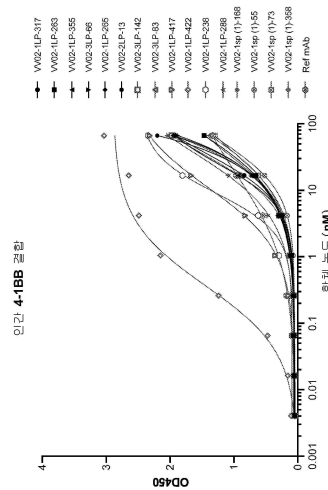
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 항-4-1BB 나노바디

(57) 요약

항-4-1BB 나노바디 및 나노바디를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 제공된다. 암과 같은 질환을 치료하고 진단하기 위해 항체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단일 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체를 포함하는 폴리펩타이드로서, 단일 도메인 항체는 인간 4-1BB 단백질에 대한 결합 특이성을 갖고 상보성 결정 영역 1 (CDR1), CDR2 및 CDR3을 포함하며, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각

- (a) 서열 번호: 18, 58 및 32의 아미노산 서열;
- (b) 서열 번호: 18, 59 및 38의 아미노산 서열;
- (c) 서열 번호: 17, 24 및 31의 아미노산 서열;
- (d) 서열 번호: 18, 25 및 32의 아미노산 서열;
- (e) 서열 번호: 18, 26 및 33의 아미노산 서열;
- (f) 서열 번호: 18, 27 및 34의 아미노산 서열;
- (g) 서열 번호: 18, 28 및 35의 아미노산 서열;
- (h) 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열;
- (i) 서열 번호: 20, 28 및 35의 아미노산 서열;
- (j) 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열;
- (k) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열;
- (l) 서열 번호: 22, 29 및 36의 아미노산 서열;
- (m) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열;
- (n) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열;
- (o) 서열 번호: 19, 26 및 33의 아미노산 서열;
- (p) 서열 번호: 18, 28 및 37의 아미노산 서열;
- (q) 서열 번호: 23, 30 및 38의 아미노산 서열; 또는
- (r) 서열 번호: 18, 28 및 39의 아미노산 서열

을 포함하는, 단일 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체를 포함하는 폴리펩타이드.

청구항 2

제1 항에 있어서, CDR1은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하고, CDR3은 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 3

제2 항에 있어서, 서열 번호: 40 내지 48 및 60 내지 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 4

제1 항에 있어서, CDR1은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하고, CDR3은 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 5

제4 항에 있어서, 서열 번호: 49 내지 57 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 6

제1 항에 있어서, 서열 번호: 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 7

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩타이드는 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 4-1BB와 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가진 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 항체 또는 폴리펩타이드.

청구항 8

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항의 항체 및 4-1BB가 아닌 표적 항원에 대한 결합 특이성을 가진 제2 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 9

제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항의 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들).

청구항 10

제9 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포.

청구항 11

제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항의 항체 또는 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 12

암 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 환자에게 제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항의 항체 또는 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 항-4-1BB 나노바디 및 나노바디를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 제공된다. 암과 같은 질환을 치료하고 진단하기 위해 항체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

배경 기술

[0002] 4-1BB (CD137, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 9)는 TNF-수용체 슈퍼패밀리 (TNFRSF)의 구성원이고 면역 세포, 선천성 및 적응성 면역 세포 둘 다의 활성화 이후 발현되는 동시 자극 분자이다. 4-1BB는 다양한 면역 세포의 활성을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 4-1BB 아고니스트(agonist)는 면역 세포 증식, 생존, 사이토카인의 분비 및 CD8 T 세포의 세포 용해 활성을 향상시킨다. 많은 다른 연구에서 4-1BB의 활성화가 마우스에서 종양을 제거하기 위한 면역 반응을 향상시키는 것으로 나타났다. 그러므로, 4-1BB가 암 면역학에서 유망한 표적 분자인 것으로 제안되었다.

[0003] 나노바디로도 알려져 있는 단일 도메인 항체 (sdAb)는 단일 모노머 가변 항체 도메인으로 이루어진 항체 단편이다. 낙타과(camelid) 및 특정 다른 동물로부터 생산된 나노바디는 VH8 단편이라고도 불린다. 전체 항체와 유사하게, 나노바디는 특이적 항원에 선택적으로 결합할 수 있다. 단지 12 내지 15 kDa의 분자량을 갖는 단일 도메인 항체는 일반적인 항체 (150 내지 160 kDa)보다 훨씬 더 작다. 단일 도메인 항체는, 그것들의 작은 크기 및 1 사슬 성질을 고려하면, 다른 단백질, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 이중특이적 항체에서 단편으로 포함하기에 특히 적합할 수 있다.

발명의 내용

- [0004] 이중특이적 또는 삼중특이적 항체에 포함하기에 적합한 항-인간 4-1BB 나노바디가 제공된다. 따라서, 본 발명의 한 구체예에서, 단일 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체를 포함하는 폴리펩타이드가 제공되며, 단일 도메인 항체는 인간 4-1BB 단백질에 대한 결합 특이성을 갖고 상보성 결정 영역 1 (CDR1), CDR2 및 CDR3을 포함하며, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 (a) 서열 번호: 18, 58 및 32의 아미노산 서열; (b) 서열 번호: 18, 59 및 38의 아미노산 서열; (c) 서열 번호: 17, 24 및 31의 아미노산 서열; (d) 서열 번호: 18, 25 및 32의 아미노산 서열; (e) 서열 번호: 18, 26 및 33의 아미노산 서열; (f) 서열 번호: 18, 27 및 34의 아미노산 서열; (g) 서열 번호: 18, 28 및 35의 아미노산 서열; (h) 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열; (i) 서열 번호: 20, 28 및 35의 아미노산 서열; (j) 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열; (k) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열; (l) 서열 번호: 22, 29 및 36의 아미노산 서열; (m) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열; (n) 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열; (o) 서열 번호: 19, 26 및 33의 아미노산 서열; (p) 서열 번호: 18, 28 및 37의 아미노산 서열; (q) 서열 번호: 23, 30 및 38의 아미노산 서열; 또는 (r) 서열 번호: 18, 28 및 39의 아미노산 서열의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0005] 일부 구체예에서, CDR1은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 포함하고, CDR3은 서열 번호: 32의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 단일 도메인 항체 또는 폴리펩타이드는 서열 번호: 40 내지 48 및 60 내지 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0006] 일부 구체예에서, CDR1은 서열 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 포함하고, CDR3은 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 단일 도메인 항체 또는 폴리펩타이드는 서열 번호: 49 내지 57 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0007] 일부 구체예에서, 단일 도메인 항체 또는 폴리펩타이드는 서열 번호: 1 내지 16 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0008] 또한 항체 또는 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 제공된다. 또한 항체 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드, 항체 또는 그것의 단편을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 세포가 제공된다.
- [0009] 치료 방법 및 용도가 또한 제공된다. 한 구체예에서, 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법이 제공되며, 환자에게 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 암은 고체 종양이다. 일부 구체예에서, 암은 방광암, 간암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 백혈병, 림프종, 췌장암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 유방암, 요도암, 두경부암, 위장암, 위암, 식도암, 난소암, 신장암, 흑색종, 전립선암 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 방법은 환자에게 제2 암 치료제를 투여하는 단계를 더 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0010] **도 1A 내지 B**는 항-41BB 나노바디가 가용성 인간 및 게막이 원숭이(cynomolgus) 4-1BB에 용량 의존적으로 결합되었다는 것을 나타낸다.
- 도 2**는 항-41BB 나노바디가 4-1BB에 대한 4-1BB 리간드 결합을 농도 의존적 방식으로 차단할 수 있다는 것을 나타낸다.
- 도 3A 내지 B**는 항-41BB 나노바디가 Fc 교차결합의 존재시 4-1BB-매개된 NF-κB 활성을 효율적으로 유도했다는 것을 나타낸다.
- 도 4A 내지 B**는 모 클론 VV02-1LP-263으로부터의 항-41BB 인간화된 나노바디가 세포 표면 인간 또는 게막이 원숭이 4-1BB에 농도 의존적 방식으로 결합했다는 것을 나타낸다.
- 도 5**는 모 클론 VV02-1SP (1)-73으로부터의 항-41BB 인간화된 나노바디가 세포 표면 인간 4-1BB에 농도 의존적 방식으로 결합했다는 것을 나타낸다.
- 도 6**은 최적화된 항-4-1BB 서열이 4-1BB-함유 CHO-K1 세포에 대해 모 서열과 비슷한 결합 활성을 유지했다는 것을 나타낸다.
- 도 7**은 최적화된 항-4-1BB 기반 이중특이적 항체가 표적 세포의 존재시 4-1BB 활성화를 유도하는데 있어서 모

항체 TAA-263-1-3과 비슷한 효능을 갖는다는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

"하나(a)" 또는 "하나(an)"의 실체물은 하나 이상의 상기 실체물을 나타낸다는 것에 주의해야 한다. 예를 들어, "하나의 항체"는 하나 이상의 항체를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "하나" (또는 "하나"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 교체 가능하게 사용될 수 있다.

폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 영역 (또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 영역)은 또 다른 서열에 대해 특정 퍼센트 (예를 들어, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 %)의 "서열 동일성"을 가지며 이는, 정렬될 때, 두 서열을 비교하는데 있어서 상기 퍼센트의 염기 (또는 아미노산)가 동일하다는 것을 의미한다. 이 정렬 및 퍼센트 상동성 또는 서열 동일성은 해당 분야에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, Ausubel *et al.* eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology에서 기재된 것들을 사용하여 결정될 수 있다. 바람직하게는, 초기 설정 파라미터가 정렬에 사용된다. 하나의 정렬 프로그램은 BLAST이며, 초기 설정 파라미터를 사용한다. 특히, 프로그램은 BLASTN 및 BLASTP이며, 다음의 초기 설정 파라미터를 사용한다: 유전 암호 = 표준; 필터 = 없음; 가닥 = 둘 다; 컷 오프(cutoff) = 60; 예상치 = 10; 행렬 = BLOSUM62; 설명 = 50개 서열; 분류 기준 = 높은 점수; 데이터베이스 = 비-다중, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 번역 + SwissProtein + SPupdate + PIR. 생물학적으로 동등한 폴리뉴클레오타이드는 상기 언급된 명시된 퍼센트의 상동성을 갖고 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 가진 폴리펩타이드를 암호화하는 것들이다.

용어 "동등한 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드"는 핵산 또는 그것의 보체의 뉴클레오타이드 서열과의 특정 정도의 상동성, 또는 서열 동일성을 가진 뉴클레오타이드 서열을 가진 핵산을 나타낸다. 이 중 가닥 핵산의 상동체는 그것의 보체와의 특정 정도의 상동성을 가진 뉴클레오타이드 서열을 가진 핵산을 포함하도록 의도된다. 한 양태에서, 핵산의 상동체는 핵산 또는 그것의 보체와 혼성체화할 수 있다. 유사하게, "동등한 폴리펩타이드"는 참조 폴리펩타이드의 아미노산 서열과의 특정 정도의 상동성, 또는 서열 동일성을 가진 폴리펩타이드를 나타낸다. 일부 양태에서, 서열 동일성은 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%이다. 일부 양태에서, 동등한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 참조 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 추가, 결실, 치환 및 그것들의 조합을 갖는다. 일부 양태에서, 동등한 서열은 참조 서열의 활성 (예를 들어, 에피토프-결합) 또는 구조 (예를 들어, 염 다리(salt-bridge))를 유지한다.

본원에서 사용된 바와 같이, "항체" 또는 "항원-결합 폴리펩타이드"는 항원을 특이적으로 인식하고 항원에 결합하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 복합체를 나타낸다. 항체는 전체 항체 및 그것의 임의의 항원 결합 단편 또는 단일 사슬일 수 있다. 따라서, 용어 "항체"는 항원에 결합하는 생물학적 활성을 가진 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩타이드를 포함한다. 이러한 것들의 예는 중쇄 또는 경쇄 또는 그것들의 리간드 결합 부분의 상보성 결정 영역 (CDR), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 (framework: FR) 영역, 또는 이것들의 임의의 부분, 또는 결합 단백질의 적어도 하나의 부분을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

용어 "항체 단편" 또는 "항원-결합 단편"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 항체의 일부, 예컨대 F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv 등이다. 구조에 관계없이, 항체 단편은 온전한 항체에 의해 인식되는 동일한 항원과 결합한다. 용어 "항체 단편"은 aptamer, 스피겔머(spiegelmer), 및 디아바디(diabody)를 포함한다. 용어 "항체 단편"은 또한 특이적 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체와 유사하게 작용하는 임의의 합성 또는 유전적으로 조작된 단백질을 포함한다.

"단일 사슬 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역글로불린의 중쇄 (V_H) 및 경쇄 (V_L)의 가변 영역의 융합 단백질을 나타낸다. 일부 양태에서, 영역은 10 내지 약 25개의 아미노산의 짧은 링커 펩타이드와 연결된다. 링커는 유연성을 위해 글리신이 풍부할 뿐만 아니라, 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부할 수 있고, V_H의 N-말단과 V_L의 C-말단을 연결할 수 있거나, 또는 그 반대로 가능하다. 이 단백질은, 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도, 원래의 면역글로불린의 특이성을 유지한다. ScFv 분자는 해당 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 5,892,019에 기재되어 있다.

용어 항체는 생화학적으로 구별될 수 있는 다양한 클래스의 폴리펩타이드를 포함한다. 당업자는 중쇄가 감마

(gamma), 뮤(mu), 알파(alpha), 델타(delta), 또는 엡실론(epsilon) (γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되며 그것들 중에서 일부 하위클래스 (예를 들어, $\gamma 1$ 내지 $\gamma 4$)를 갖는다는 것을 인정할 것이다. 그것은 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE로서 항체의 "클래스"를 결정하는 이 사슬의 성질이다. 면역글로불린 서브클래스 (아이소타입 (isotype)), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅, 등은 잘 특성화되어 있고 기능적인 특수화를 부여하는 것으로 알려져 있다. 이들 클래스 및 아이소타입 각각의 변형된 버전은 본 발명을 고려하면 당업자에게 쉽게 구별 가능하며, 따라서 본 발명의 범위 내에 있다. 모든 면역글로불린 클래스는 분명히 본 발명의 범위 내에 있고, 다음 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 클래스와 관련이 있을 것이다. IgG에 관하여, 표준 면역글로불린 분자는 대략 23,000 달톤(Dalton)의 분자량의 2개의 동일한 경쇄 폴리펩타이드, 및 53,000 내지 70,000의 분자량의 2개의 동일한 중쇄 폴리펩타이드를 포함한다. 4개의 사슬은 전형적으로 이황화 결합에 의해 "Y" 구성형태로 결합되며 경쇄는 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통해 계속되는 중쇄를 묶는다.

[0019] 본 발명의 항체, 그것의 항원-결합 폴리펩타이드, 변이체, 또는 유도체는 다클론성, 단클론성, 다중특이적, 인간, 인간화된, 영장류화된(primatized), 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fv, 단일 사슬 Fv (scFv), 단일 사슬 항체, 이황화-연결된 Fv (sdFv), VK 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산되는 단편, 및 항-이디오타입(idiotypic) (항-Id) 항체 (예를 들어, 본원에서 개시된 LIGHT 항체에 대한 항-Id 항체 포함)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 것일 수 있다.

[0020] "특이적으로 결합하다" 또는 "~에 대한 특이성을 갖다"는 일반적으로 항체가 그것의 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고, 결합은 항원-결합 도메인과 에피토프 사이에서 일부 상보성을 수반한다는 것을 의미한다. 이 정의에 따르면, 항체는 무작위의 무관한 에피토프에 결합하는 것보다 그것의 항원-결합 도메인을 통해 더 쉽게 에피토프에 결합할 때, 상기 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 한다. 용어 "특이성"은 특정 항체가 특정 에피토프에 결합하는 상대적 친화도를 한정하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, 항체 "A"는 항체 "B"보다 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 간주될 수 있거나, 또는 항체 "A"는 관련된 에피토프 "D"에 대해 갖는 것보다 더 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합한다고 할 수 있다.

[0021] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치료적 처치 및 예방적(prophylactic) 또는 예방적(preventative) 수단 둘 다를 나타내며, 목적은 암의 진행과 같은 원치않는 생리학적 변화 또는 장애를 예방하거나 둔화시키는 (줄이는) 것이다. 유익한 또는 원하는 임상 결과는, 검출 가능한지 검출 불가능한지 여부에 관계없이, 증상의 완화, 질환의 정도의 축소, 질환의 안정화된 (즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 차도 (부분적이든 전체적이든)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우 예상되는 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미한다. 치료가 필요한 것들은 이미 병태 또는 장애에 걸린 것들, 뿐만 아니라 병태 또는 장애에 걸리기 쉬운 것들 또는 병태 또는 장애가 예방되어야 하는 것들을 포함한다.

[0022] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유동물"은 진단, 예후, 또는 요법이 요구되는 임의의 대상체, 특히 포유류 대상체를 의미한다. 포유류 대상체는 인간, 가축, 경작용 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완용 동물, 예컨대 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 소, 암소, 등을 포함한다.

[0023] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료를 필요로 하는 환자에게" 또는 "치료를 필요로 하는 대상체에게"와 같은 구절은, 예를 들어, 검출, 진단 절차 및/또는 치료에 사용되는 본 발명의 항체 또는 조성물의 투여로부터 이익을 얻는 대상체, 예컨대 포유류 대상체를 포함한다.

[0024] **항-4-1BB 나노바디**

[0025] 본 발명은 인간 4-1BB 단백질에 대한 나노바디를 제공하며, 인간화된 것을 포함한다. 이들 항체는 4-1BB에 대해 높은 결합 친화도를 가지며 4-1BB와 그 리간드 사이의 상호작용을 효과적으로 차단할 수 있다. 실시예 4에서 입증된 바와 같이, 이들 항체는 Fc 교차결합의 존재시에만 4-1BB-매개된 NF- κ B 활성을 유도하는 강력한 능력을 나타냈다. 그러므로, 이들 항체는 그 자체로 4-1BB 신호전달을 활성화시키지 않는 비-아고니스트 항체이다. 하지만, 제2 항체와 조합될 때, 결과로 발생한 이중특이적 항체는 제2 항체의 표적 항원의 존재시 4-1BB 신호전달을 활성화시킬 수 있다. 다시 말해서, 본 나노바디는 이중특이적 또는 다중특이적 항체로의 발달에 특히 적합하다.

- [0026] 따라서, 본 발명의 한 구체예에서, 단일 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체를 포함하는 폴리펩타이드가 제공되며, 단일 도메인 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 이것들은 각각 표 1의 항체 중 어느 하나의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 갖는다.
- [0027] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-317 (서열 번호: 1)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 17, 24 및 31의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 1에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0028] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-263 (서열 번호: 2)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 25 및 32의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0029] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-355 (서열 번호: 3)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 26 및 33의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 3에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0030] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-3LP-66 (서열 번호: 4)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 27 및 34의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0031] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-265 (서열 번호: 5)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 28 및 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 5에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0032] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-2LP-13 (서열 번호: 6)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0033] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-3LP-142 (서열 번호: 7)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 20, 28 및 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 7에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0034] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-3LP-83 (서열 번호: 8)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 19, 28 및 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0035] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-417 (서열 번호: 9)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 9에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0036] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-422 (서열 번호: 10)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 22, 29 및 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 10에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0037] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-238 (서열 번호: 11)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 11에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열

동일성을 갖는다.

- [0038] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1LP-288 (서열 번호: 12)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 21, 29 및 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 12에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0039] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1SP (1)-168 (서열 번호: 13)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 19, 26 및 33의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 13에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0040] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1SP (1)-55 (서열 번호: 14)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 28 및 37의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 14에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0041] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1SP (1)-73 (서열 번호: 15)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 23, 30 및 38의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 15에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0042] 일부 구체예에서, CDR1, CDR2, 및 CDR3은 항체 VV02-1SP (1)-358 (서열 번호: 16)의 것들이다. 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 28 및 39의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 16에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0043] 인간화된 항체, 예컨대 항체 VV02-1LP-263에 대해서 서열 번호: 40 내지 48 및 60 내지 62 및 항체 VV02-1SP (1)-73에 대해서 서열 번호: 49 내지 57에서 제공되는 것들이 또한 제공된다. VV02-1LP-263 (서열 번호: 18에서 CDR1, 서열 번호: 25에서 CDR2 및 서열 번호: 32에서 CDR3)에 대해, CDR2는 돌연변이 (D54G 및 D61E, Kabat 넘버링(numbering)) 중 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 58 및 32의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 40 내지 48 및 60 내지 62 중 어느 하나를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 40 내지 48 또는 60 내지 62 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0044] 이들 인간화된 서열 중에서, 263 huNb-1-3_1 (서열 번호: 60), 263 huNb-1-3_2 (서열 번호: 61), 및 263 hnNb-1-3_3 (서열 번호: 62)이 더 최적화된 것들이며, 이것들은 추가의 임상 개발을 위해 적합한 것으로 입증되었다 (**실시예 7 및 도 6 내지 7**). 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 60을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 60에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 61을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 61에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 62를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 62에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0045] VV02-1SP (1)-73 (서열 번호: 23에서 CDR1, 서열 번호: 30에서 CDR2 및 서열 번호: 38에서 CDR3)에 대해, 돌연변이 (N31S, Kabat 넘버링) 또는 2개의 돌연변이 (D54S 및 D61E, Kabat 넘버링) 중 하나는 각각 CDR1 및 CDR2에 포함될 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 18, 59 및 38의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 49 내지 57 중 어느 하나를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 나열된 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 서열 번호: 49 내지 57 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0046] 또한, 일부 구체예에서, 나노바디 또는 나노바디를 포함하는 폴리펩타이드가 제공되며, 이것은 서열 번호: 17 내지 23으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 CDR1, 서열 번호: 24 내지 30 또는 58 내지 59로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 CDR2, 및 서열 번호: 31 내지 39로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 CDR3을 포함한다.
- [0047] 또한, 일부 구체예에서, 나노바디 또는 나노바디를 포함하는 폴리펩타이드가 제공되며, 이것은 서열 번호: 21

내지 22로부터 선택된 아미노산 서열을 가진 CDR1, 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 가진 CDR2, 및 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 가진 CDR3을 포함한다.

- [0048] 또한, 일부 구체예에서, 인간 4-1BB에 대한 결합에 있어서 본원에서 개시된 항체 중 어느 것과 경쟁하는 항-4-1BB 항체 및 항원 결합 단편이 제공된다. 또한, 일부 구체예에서, 본원에서 개시된 항체 중 어느 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항-4-1BB 항체 및 항원 결합 단편이 제공된다. 또한, 일부 구체예에서, 본원에서 개시된 항체의 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 항-4-1BB 항체 및 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0049] 또한 항체 또는 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0050] 본원에서 개시된 항체가 그것들이 유래된 자연 발생 결합 폴리펩타이드와 아미노산 서열이 달라지도록 변형될 수 있다는 것이 또한 당업자에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, 지정된 단백질로부터 유래된 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열은 유사할 수 있는데, 예를 들어, 시작 서열에 대해 특정 퍼센트의 동일성을 가질 수 있으며, 예를 들어, 그것은 시작 서열과 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 일부 구체예에서, 변형된 항체 또는 단편은 지정된 CDR 서열을 유지한다.
- [0051] 특정 구체예에서, 항체는 항체와 정상적으로 회합되지 않는 아미노산 서열 또는 하나 이상의 모이어티를 포함한다. 예시의 변형은 하기 더 상세히 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 유연한 링커 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기능적 모이어티 (예를 들어, PEG, 약물, 독소, 또는 라벨)를 추가하도록 변형될 수 있다.
- [0052] 본원에서 개시된 단일 도메인 항-4-1BB 항체의 1, 2, 3 또는 4개의 유닛, 및 하나 이상의 다른 특이성 (4-1BB 아님)을 포함하는 이중특이적 및 다중특이적 항체가 또한 제공된다.
- [0053] **이중특이적 및 다중특이적 항체, 및 키메라 항원 수용체 (CAR)**
- [0054] 제공된 바와 같이, 본원에서 개시된 항-4-1BB 항체는 이중특이적 및 다중특이적 항체, 뿐만 아니라 키메라 항원 수용체 (CAR)를 제조하는데 특히 유용하다. 이것은 적어도 이들 항체의 향상된 치료 지수 및 그것들의 작은 크기 때문이다.
- [0055] 따라서, 한 구체예에서, 본 발명의 항-4-1BB 나노바디, 또는 그것의 항원-결합 단편, 및 4-1BB가 아닌 표적 항원에 대한 결합 특이성을 가진 제2 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 이중특이적 항체가 제공된다. 일부 구체예에서, 제3 또는 제4 특이성이 추가로 포함된다.
- [0056] 일부 구체예에서, 4-1BB가 아닌 표적 항원은 종양 항원이다. 종양 항원의 풍부함은 해당 분야에 공지되어 있고 신규한 종양 항원은 스크리닝에 의해 쉽게 확인될 수 있다. 종양 항원의 비-제한적 예는 ABL, ALK, B4GALNT1, BAFF, BCL2, BRAF, BTK, CD19, CD20, CD30, CD38, CD52, CD73, 클라우딘(Claudin) 18.2, CTLA-4, EGFR, FOLR1, FLT3, HDAC, HER2, IDH2, IL-1 β , IL-6, IL-6R, JAK1/2, JAK3, KIT, LAG-3, MEK, 넥틴(Nectin) 4, ROR1, mTOR, PARP, PD-1, PDGFR, PDGFR α , PD-L1, PI3K δ , PIGF, PTCH, RAF, RANKL, 스무던드(Smoothened), VEGF, VEGFR, 및 VEGFR2를 포함한다. 다른 예는 Her2, EpCAM, CD33, CD47, CD133, CEA, gpA33, 뮤신(Mucin), TAG-72, CIX, PSMA, GD2, GD3, GM2, 인테그린(Integrin), α V β 3, α 5 β 1, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP 및 테나신(Tenascin)이다.
- [0057] 본 발명의 나노바디를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 또한 제공된다. CAR에서, 나노바디는 항원 인식 도메인의 역할을 할 수 있다. 이에 더하여, 일부 구체예에서, CAR은 또한 세포외 힌지(hinge) 영역, 막관통 도메인, 및 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0058] 스페이서(spacer)라고도 불리는 힌지는 항원 인식 영역과 세포외 외막 사이에 있는 작은 구조 도메인이다. 적합한 힌지는 scFv 수용체 헤드(head)의 유연성을 향상시켜, CAR과 그것의 표적 항원 사이에서 공간적 제약을 감소시킨다. 예시의 힌지 서열은 면역 분자, 예컨대 IgG, CD8, 및 CD28로부터의 막 근위 영역을 기반으로 한다.
- [0059] 막관통 도메인은 세포막에 걸쳐 있는 소수성 알파 나선(helix)으로 이루어진 구조적 구성요소이다. 그것은 CAR을 원형질막에 고정하여, 세포외 힌지 및 항원 인식 도메인을 세포내 신호전달 영역과 연결한다. 전형적으로, 엔도도메인(endodomain)의 막 근위 구성요소로부터의 막관통 도메인, 예컨대 CD28 막관통 도메인이 사용될 수 있다.
- [0060] 세포내 T-세포 신호전달 도메인은 세포 내부에서 수용체의 엔도도메인에 있다. 항원이 외부 항원 인식 도메인에 결합된 후, CAR 수용체는 함께 군집을 형성하고 활성화 신호를 전송한다. 그 다음에 수용체의 내부 세포질 말단이 T 세포 내부에서 신호전달을 영구화시킨다. 이 과정을 모방하기 위해, CD3-제타의 세포질 도메인이 주요 CAR

엔도도메인 구성요소로서 흔히 사용된다.

[0061] T 세포는 또한 활성화 이후에도 지속시키기 위해 CD3 신호전달에 더하여 동시 자극 분자를 필요로 한다. 일부 구체예에서, CAR 수용체의 엔도도메인은 또한 동시 자극 단백질의 하나 이상의 키메라 도메인, 예컨대 CD28, CD27, CD134 (OX40), 및 CD137 (4-1BB)을 포함한다.

[0062] **항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 항체를 제조하는 방법**

[0063] 본 발명은 또한 본 발명의 항체, 그것의 변이체 또는 유도체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 동일한 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드 분자 상에서 항원-결합 폴리펩타이드, 그것의 변이체 또는 유도체의 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화할 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 동일한 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드 분자 상에서 항원-결합 폴리펩타이드, 그것의 변이체 또는 유도체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 일부를 암호화할 수 있다.

[0064] 항체를 제조하는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있고 본원에서 기재되어 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드의 가변 및 불변 영역 둘 다는 완전한 인간의 것이다. 완전한 인간 항체는 해당 분야에서 기재된 기술을 사용하여 및 본원에서 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 예를 들어, 특이적 항원에 대한 완전한 인간 항체는 항원 시험에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되었지만, 내인성 유전자좌가 손상된 트랜스제닉(transgenic) 동물에게 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 이러한 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 예시의 기술은 미국 특허 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140에서 기재되어 있으며 이것들은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0065] **암 치료**

[0066] 본원에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체, 이중특이적 항체, 폴리펩타이드, 변이체 또는 유도체는 특정 치료 및 진단 방법에서 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명은 본원에서 기재된 장애 또는 병태 중 하나 이상을 치료하기 위해 환자, 예컨대 동물, 포유동물, 및 인간에게 본 발명의 항체를 투여하는 단계를 수반하는 항체-기반 요법과 추가로 관련이 있다. 본 발명의 치료 화합물은 본 발명의 항체 (본원에서 기재된 바와 같이 그것의 변이체 및 유도체를 포함함) 및 본 발명의 항체 (본원에서 기재된 바와 같이 그것의 변이체 및 유도체를 포함함)를 암호화하는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 일부 구체예에서, 필요로 하는 환자에서 암을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 방법은 본 발명의 항체의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 수반한다. 일부 구체예에서, 환자에서 암 세포 (예를 들어, 간질 세포) 중 적어도 하나는 종양 항원을 과발현한다.

[0069] 세포 요법, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) T-세포 또는 NK 세포 요법이 또한 본 발명에서 제공된다. 본 발명의 항체 또는 CAR과 접촉된 (또는 대안으로 본 발명의 항체 또는 CAR을 발현하도록 조작된) 적합한 세포가 사용될 수 있다. 이러한 접촉 또는 조작시, 세포는 치료를 필요로 하는 암 환자에 도입될 수 있다. 암 환자는 본원에서 개시된 유형 중 어느 것의 암에 걸릴 수 있다. 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)는, 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, 종양-침윤성 T 림프구, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 또는 이것들의 조합일 수 있다.

[0070] 일부 구체예에서, 세포는 암 환자 자체로부터 단리되었다. 일부 구체예에서, 세포는 공여자에 의해 또는 세포 은행으로부터 제공되었다. 세포가 암 환자로부터 단리될 때, 원치않는 면역 반응이 최소화될 수 있다.

[0071] 본 발명의 항체 또는 그것의 변이체, 또는 유도체로 치료, 예방, 진단 및/또는 예측될 수 있는, 증가한 세포 생존과 관련된 추가적인 질환 또는 병태는 악성 종양 및 관련된 장애, 예컨대 백혈병 (급성 백혈병 (예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병을 포함함)) 및 만성 백혈병 (예를 들어, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함함), 진성다혈구증(polycythemia vera), 림프종 (예를 들어, 호지킨 병(Hodgkin's disease) 및 비-호지킨 병(non-Hodgkin's disease)), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 증쇄병, 및 육종 및 암종, 제한되는 것은 아니지만, 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 갑상선암, 자궁내막암, 흑색종, 전립선암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암

중, 유두상 선암종, 낭선 암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신장세포 암종, 간 종양, 담관 암종, 음모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름스 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경집종, 뱀지교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막아종을 포함하는 고체 종양의 진행, 및/또는 전이를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] **진단 방법**

[0073] 4-1BB의 과발현은 특정 종양 샘플에서 관찰되고, 4-1BB-과발현 세포를 가진 환자는 본 발명의 항-4-1BB 항체의 처리에 반응성일 가능성이 크다. 따라서, 본 발명의 항체는 또한 진단 및 예측 목적으로 사용될 수 있다.

[0074] 바람직하게는 세포를 포함하는 샘플은 암 환자 또는 진단을 요구하는 환자일 수 있는 환자로부터 얻어질 수 있다. 세포는 종양 조직 또는 종양 블록, 혈액 샘플, 소변 샘플 또는 환자의 임의의 샘플의 세포이다. 샘플의 선택적 전처리시, 샘플은 항체가 샘플에 잠재적으로 존재하는 4-1BB 단백질과 상호작용할 수 있게 하는 조건 하에서 본 발명의 항체와 함께 인큐베이션될 수 있다. 샘플에서 4-1BB 단백질의 존재를 검출하기 위해, 항-4-1BB 항체를 이용하는 ELISA와 같은 방법이 사용될 수 있다.

[0075] 샘플 내 4-1BB 단백질의 존재 (선택적으로 양 또는 농도와 함께)는 환자가 항체로의 치료에 적합하다는 표시로서, 또는 환자가 암 치료에 반응했다는 (또는 하지 않았다는) 표시로서 암의 진단에 사용될 수 있다. 예측 방법에 대해, 치료의 진행을 나타내기 위해 암 치료의 시작시 특정 단계에서, 1회, 2회 또는 그 이상 검출이 실행될 수 있다.

[0076] **조성물**

[0077] 본 발명은 또한 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 항체의 유효량, 및 허용 가능한 담체를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 제2 항암제 (예를 들어, 면역 체크포인트(checkpoint) 억제자)를 더 포함한다.

[0078] 특정 구체예에서, 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 동물, 및 더 구체적으로는 인간에서의 사용에 대해 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 또는 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 나열된 것을 의미한다. 또한, "약학적으로 허용 가능한 담체"는 일반적으로 임의의 유형의 비-독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제제화 보조제일 것이다.

[0079] 용어 "담체"는 치료제가 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비히클(vehicle)을 나타낸다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일, 등과 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것을 포함하는 오일일 수 있다. 물은 약학적 조성물이 정맥내로 투여될 때 바람직한 담체이다. 식염수 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서, 특히 주사용액으로 이용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다. 원하는 경우, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 에멀전화제, 또는 pH 완충제, 예컨대 아세트이트, 시트레이트 또는 포스페이트를 함유할 수 있다. 항세균제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 나트륨 비설파이트; 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 및 장성의 조절을 위한 작용제, 예컨대 나트륨 클로라이드 또는 텍스트로스가 또한 구상된다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 타블렛, 알약, 캡슐, 분말, 지속 방출형(sustained-release) 제제, 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 바인더(binder) 및 담체, 예컨대 트리글리세리드와 함께 좌제로서 제제화될 수 있다. 경구용 제제는 표준 담체, 예컨대 약학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 마그네슘 카보네이트, 등을 포함할 수 있다. 적합한 약학적 담체의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin (본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 이러한 조성물은, 환자에게 적절한 투약을 위한 형태를 제공하기 위해, 적합한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태로, 항원-결합 폴리펩타이드의 치료적 유효량을 함유할 것이다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다. 모 조성물은 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 1회용 주사기 또는 다회수 용량 바이알에 동봉될 수 있다.

[0080] 한 구체예에서, 조성물은 인간으로의 정맥내 투여에 맞춰 조정된 약학적 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제제화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 완충액 중의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위의 통증을 완화하기 위해 리그노카인과 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사체(sachette)와 같은 밀봉된 용기 내에서 단위 투약 형태로, 예를 들어, 동결건조된 분말 또는 무수 농축물로서 별도로 공급되거나 함께 혼합된다. 조성물이 투입에 의해 투

여되어야 하는 경우, 멸균 약학적 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 투입 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분이 투여 전에 혼합될 수 있도록 멸균 주사용수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[0081] 실시예

[0082] 실시예 1: 인간 4-1BB에 대한 나노바디의 생성

[0083] 이 실시예는 인간 4-1BB 단백질에 대한 나노바디의 생성을 기재한다.

[0084] 라마를 인간 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 인간 4-1BB의 제조함 ECD로 면역화하였다. 혈청에 충분한 역가의 항-4-1BB 항체가 함유된 라마를 파지 라이브러리의 생성을 위해 선택하였다. 간략히 말하면, 림프구를 면역화된 라마로부터 수거된 말초 혈액으로부터 단리시켰다. 림프구 RNA를 추출하고 VHH 도메인을 암호화하는 cDNA를 PCR로 증폭시키고 M13 파지 디스플레이-기반 나노바디 라이브러리의 구성에 사용하였다. 여러 라운드의 패닝(panning)을 적용하여 항-4-1BB 나노바디를 발현하는 파지 라이브러리를 스크리닝하였다.

[0085] 모든 양성 클론을 시퀀싱하기 전에 ELISA 및 FACS 검정을 통해 스크리닝하였다. 서열 다양성에 기초하여, 16개의 고유한 클론을 선택하였으며, 그 서열은 표 1에 나타나있다. C-말단에서 N297A 돌연변이를 가진 인간 IgG1 Fc 단편과 융합된 항-4-1BB 나노바디를 결합, 리간드 경쟁 및 4-1BB 신호 활성화를 포함한 일련의 기능적 검정을 통해 그것들의 특이성 및 활성에 대해 특성화하였으며 이것은 추가의 인간화를 위한 선도(lead) 나노바디를 확인하였다.

표 1

표 1. 선택된 16 개의 고유한 클론의 서열.

항제	서열	서열 번호
VV02-1LP-317	EVDLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>RSAMS</u> SWARQAPGKGF EWVSG <u>IYSGGSTYYVDSVEGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAT <u>WGS</u> <u>QQIGVWHEDDY</u> WGQGTQVTVSS	1
VV02-1LP-263	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SSAMS</u> SWARQTPGKGF EWVSG <u>IYSDGSTYYTDSVKDR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAT <u>WGT</u> <u>LRFGVWAEYDH</u> WGQGTQVTVSS	2
VV02-1LP-355	QVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SSAMS</u> SWARQAPGKDF EWVSY <u>IYSDGNTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAT <u>WHT</u> <u>LRVGVWDEYDY</u> WGQGTQVTVSS	3
VV02-3LP-66	QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SSAMS</u> SWARQAPGKEF EWVSY <u>IYSDGNTYYTDSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAT <u>WNS</u> <u>LQVGVWDEYDY</u> WGQGTQVTVSS	4
VV02-1LP-265	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SSAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDEYDH</u> WGQGTQVTVSS	5
VV02-2LP-13	AVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SYAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDEYDH</u> WGQGTQVTVSS	6
VV02-3LP-142	AVQLVESGGGLVQRGSLKLSVCGSGDFDS <u>DHAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDEYDH</u> WGQGTQVTVSS	7
VV02-3LP-83	EVDLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFR <u>SYAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDEYDH</u> WGQGTQVTVSS	8
VV02-1LP-417	QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFALDY <u>SAIG</u> WFRQAPGKEREGVLC <u>ISSSGDVTIYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCV <u>APR</u> <u>ICSTYSSDDY</u> WGQGTQVTVSS	9
VV02-1LP-422	QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTLADY <u>YAIG</u> WFRQAPGKEREGVLC <u>ISSSGDVTIYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCV <u>APR</u> <u>ICSTYSSDDY</u> WGQGTQVTVSS	10
VV02-1LP-238	QVQLVESGGGLVQAGGALRRLSCAASGFTLDY <u>SAIG</u> WFRQAPGKEREGVLC <u>ISSSGDVTIYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCV <u>APR</u> <u>ICSTYSSDDY</u> WGQGTQVTVSS	11
VV02-1LP-288	EVQVVEGGGLVQPGGSLRRLSCAASGSGLDY <u>SAIG</u> WFRQAPGKEREGVLC <u>ISSSGDVTIYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCV <u>APR</u> <u>ICSTYSSDDY</u> WGQGTQVTVSS	12
VV02-1SP (1)-168	QVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SYAMS</u> SWARQAPGKDF EWVSY <u>IYSDGNTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAT <u>WHT</u> <u>LRVGVWDEYDY</u> WGQGTQVTVSS	13
VV02-1SP (1)-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSS <u>SAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDEYDY</u> WGQGTQVTVSS	14

[0086]

VV02-1SP (1)-73	EVDLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAVSGFTFSS <u>NSAMS</u> SWARQAPGKEF EWVSS <u>IYSDGKTYYYVDSVKGR</u> FTISRDNAKNTVYLQMS SLKPEDTAVYYCAT <u>WKT</u> <u>LRVGVWDESDY</u> WGQGTQVTVSS	15
VV02-1SP (1)-358	EVQLVESGGGLVQPGGSLMISCAASGFTFSS <u>SSAMS</u> SWARQVPGKGF EWVAY <u>IYSDGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNAKDTVYLHMNSLKFEDMAVYYCAT <u>WRS</u> <u>QQVGRWDKYDY</u> WGQGTQVTVSS	16

[0087]

[0088]

그것들의 CDR 서열은 하기 표 1A에 요약되어 있다.

[0089] [표 1A]

표 1A. 선택된 16 개의 고유한 클론의 서열.

항체	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
VV02-1LP-317	RSAMS	17	GIYSGGSTYYVDSVEG	24	WGSQQIGVWHEDDY	31
VV02-1LP-263	SSAMS	18	GIYSDGSTYYTDSVKD	25	WGTLRFVWAEYDH	32
VV02-1LP-355	SSAMS	18	YIYSDGNTYYADSVKG	26	WHTLRVGVWDEYDY	33
VV02-3LP-66	SSAMS	18	YIYSDGNTYYTDSVKG	27	WNSLVGVWDEYDY	34
VV02-1LP-265	SSAMS	18	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDEYDH	35
VV02-2LP-13	SYAMS	19	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDEYDH	35
VV02-3LP-142	DHAMS	20	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDEYDH	35
VV02-3LP-83	SYAMS	19	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDEYDH	35
VV02-1LP-417	YSAIG	21	CISSSGDVTTIYADSVKG	29	PRICSTYSSDDY	36
VV02-1LP-422	DYAIG	22	CISSSGDVTTIYADSVKG	29	PRICSTYSSDDY	36
VV02-1LP-238	YSAIG	21	CISSSGDVTTIYADSVKG	29	PRICSTYSSDDY	36
VV02-1LP-288	YSAIG	21	CISSSGDVTTIYADSVKG	29	PRICSTYSSDDY	36
VV02-1SP (1)-168	SYAMS	19	YIYSDGNTYYADSVKG	26	WHTLRVGVWDEYDY	33
VV02-1SP (1)-55	SSAMS	18	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDEYDY	37
VV02-1SP (1)-73	NSAMS	23	SIYSDGKTYVDSVKG	30	WKTLRVGVWDESDY	38
VV02-1SP (1)-358	SSAMS	18	YIYSDGSTYYADSVKG	28	WRSQQVGRWDKYDY	39

[0090]

[0091]

항체 VV02-1LP-417, VV02-1LP-422, VV02-1LP-238, 및 VV02-1LP-288은 매우 유사한 CDR을 공유하는 것으로 나타나는 한편, 나머지 것들은 또한 상동성 CDR을 갖는다.

[0092]

실시예 2. 항-4-1BB 나노바디의 가용성 4-1BB 결합 성질

[0093]

이 실시예는 ELISA 검정에 의해 인간 및 게 McKay 원숭이 4-1BB 단백질에 대한 결과로 생성된 항-4-1BB 나노바디의 결합 성질을 테스트하였다.

[0094]

His-태그된(tagged) 4-1BB를 2 µg/ml로 방배독료 코팅한 다음 PBS 중의 2% BSA로 블로킹하였다(block). 단계 희석된 항-4-1BB 나노바디를 참조 항체 "Ref mAb"와 함께 실온에서 1h 동안 코팅된 항원과 함께 인큐베이션하였다. 결과의 플레이트를 PBS/T로 세척하고 실온에서 1h 동안 염소 항-인간 IgG-HRP와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 TMB 기질로 발달시켜 OD 450nm에서 분광광도계로 분석하였다. ELISA 검정의 결과는 도 1 및 표 2에 나타나 있으며, 이것은 인간 및 McKay 원숭이 4-1BB 단백질에 대한 결합의 EC₅₀을 나타낸다.

표 2

표 2. 인간 및 Cyno 4-1BB 단백질에 대한 결합 EC₅₀ (nM)

항체	hu4-1BB EC ₅₀ (nM)	Cyno 4-1BB EC ₅₀ (nM)	항체	hu4-1BB EC ₅₀ (nM)	Cyno 4-1BB EC ₅₀ (nM)
VV02-1LP-317	>30	29.32	VV02-1LP-422	0.37	6.94
VV02-1LP-263	>30	0.04	VV02-1LP-238	9.12	26.46
VV02-1LP-355	23.97	0.03	VV02-1LP-288	>30	>30
VV02-3LP-66	>30	1.95	VV02-1SP (1)-168	>30	0.06
VV02-1LP-265	>30	3.86	VV02-1SP (1)-55	>30	1.87
VV02-2LP-13	>30	4.19	VV02-1SP (1)-73	>30	0.11
VV02-3LP-142	>30	18.24	VV02-1SP (1)-358	>30	0.11
VV02-3LP-83	>30	2.03	Ref mAb	18.77	0.51
VV02-1LP-417	11.11	>30			

[0095]

[0096]

실시예 3. 항-4-1BB 나노바디에 의한 4-1BB/4-1BB 리간드 상호작용의 차단

[0097] 이 실시예에서, 항-41BB 나노바디를 리간드로의 4-1BB의 결합을 차단하는 능력에 대해 검사하였다.

[0098] 인간 4-1BB를 과발현하는 CHO-K1 세포를 단계 희석된 항-41BB 나노바디의 존재시 참조 항체로서 Ref mAb와 함께 4℃에서 1H 동안 비오틴화된 인간 4-1BB 리간드 (0.3 µg/ml)와 함께 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포를 Alexa Fluor 633-컨쥬게이션된(conjugated) 스트렙타비딘과 함께 인큐베이션하였다. 결합을 Agilent 유동세포분석기로 측정하였다. 도 2 및 표 3에서 나타난 바와 같이, 테스트된 모든 나노바디는 농도 의존적 방식으로 4-1BB에 대한 4-1BB 리간드 결합을 차단할 수 있는 한편, Ref mAb는 이러한 효과를 나타내지 않았다.

표 3

표 3. 4-1BB/4-1BB 리간드 상호작용에 대한 경쟁 IC₅₀ (nM)

항체	IC ₅₀ (nM)	항체	IC ₅₀ (nM)
VV02-1LP-317	1.416	VV02-1LP-422	1.484
VV02-1LP-263	0.566	VV02-1LP-238	1.876
VV02-1LP-355	0.4346	VV02-1LP-288	2.573
VV02-3LP-66	0.5733	VV02-1SP (1)-168	0.3873
VV02-1LP-265	0.6417	VV02-1SP (1)-55	0.5729
VV02-2LP-13	0.9945	VV02-1SP (1)-73	0.5725
VV02-3LP-142	0.9233	VV02-1SP (1)-358	0.9879
VV02-3LP-83	0.6824	Ref mAb	2.657
VV02-1LP-417	2.053		

[0099]

실시예 4. Jurkat-41BB NFκB 리포터 검정에서 항-41BB 나노바디의 기능적 성질

[0101] 이 실시예는 4-1BB 리포터 검정에서 항-41BB 나노바디의 기능적 성질을 평가하였다.

[0102] 이 검정에서, 효과기 세포는 인간 4-1BB를 안정하게 발현하고 계능에 통합된 NFκB 루시퍼라제 리포터 작제물을 갖는 4-1BB NFκB-리포터 Jurkat 세포주였다. 4-1BB 활성화 이후, 내인성 NFκB 전사 인자는 DNA 반응 요소에 결합하여 루시퍼라제 유전자의 전사를 유도하며, 그것의 단백질 생성물은 발광 신호를 측정하여 정량화된다. 4-1BB NFκB-리포터 Jurkat 세포주를 표적 세포주 CHO-K1 또는 인간 Fcγ 수용체 II B를 과발현하는 FcγRIIB-CHO-K1 세포주와 동시 배양하였다. 항체를 단계 희석하고 흰색 96-웰 검정 플레이트에 추가하였다. 37℃에서 16 시간 인큐베이션한 후, 루시퍼라제 기질을 추가함으로써 발광을 얻었고 마이크로플레이트 판독기로 측정하였다.

[0103] 도 3 및 표 4에서 나타난 바와 같이, 테스트된 4-1BB 나노바디는 Fc 교차결합의 존재시 4-1BB-매개된 NF-κB 활성을 유도하였으며, EC₅₀은 0.002 nM 내지 0.081 nM의 범위에 있다. 하지만, Fc 교차결합이 없을 때, 테스트된 항체는 NF-κB 신호를 활성화시킬 수 없었다.

표 4

표 4. Jurkat-41BB NFκB 리포터 검정에서 EC₅₀ (nM)

항체	EC ₅₀ (nM)	항체	EC ₅₀ (nM)
VV02-1LP-317	0.031	VV02-1LP-422	0.013
VV02-1LP-263	0.017	VV02-1LP-238	0.008
VV02-1LP-355	0.016	VV02-1LP-288	0.052
VV02-3LP-66	0.035	VV02-1SP (1)-168	0.002
VV02-1LP-265	0.024	VV02-1SP (1)-55	0.023
VV02-2LP-13	0.036	VV02-1SP (1)-73	0.010
VV02-3LP-142	0.014	VV02-1SP (1)-358	0.004
VV02-3LP-83	0.014	Ref mAb	0.080
VV02-1LP-417	0.081		

[0104]

실시예 5. 항-41BB 나노바디 인간화

[0105]

[0106] 선도 나노바디 (VV02-1LP-263 및 VV02-1SP (1)-73)의 인간화를 CDR 이식 및 돌연변이 계획에 의해 실행하였다. 그것의 인간화된 서열은 표 5에 나타나있다.

표 5

표 5. 인간화된 선도 나노바디의 서열

항체	서열	서열 번호
VV02-1LP-263 huNb_1_1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGLEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	40
VV02-1LP-263 huNb_1_2	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGLEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	41
VV02-1LP-263 huNb_1_3	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQTPGKGFIEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTQVTVSS</u>	42
VV02-1LP-263 huNb_2_1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	43
VV02-1LP-263 huNb_2_2	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGLEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	44
VV02-1LP-263 huNb_2_3	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	45
VV02-1LP-263 huNb_3_1	<u>QVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGLEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTTLTVSS</u>	46
VV02-1LP-263 huNb_3_2	<u>QVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTQVTVSS</u>	47
VV02-1LP-263 huNb_3_3	<u>QVQLVESGGGLVQPPGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSG</u> <u>IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNSVYVYLMNSLKPEDTAVYYCATWGT</u> <u>LRFGVWAEYDHWGQGTQVTVSS</u>	48
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_1	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGLEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	49
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_2	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKLEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	50
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_3	<u>EVDLVESGGGLVQPPGSLRLSCAVSGFTFSSSSAMSWARQAPGKFEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNTVYVYLMNSLREPEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	51
VV02-1SP (1)-73 huNb_2_1	<u>EVQLVESGGGLIQPPGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	52
VV02-1SP (1)-73 huNb_2_2	<u>EVQLVESGGGLIQPPGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKFEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSSLRAEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTQVTVSS</u>	53
VV02-1SP (1)-73 huNb_2_3	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSSSAMSWARQAPGKFEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNTVYVYLMNSLREPEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTQVTVSS</u>	54
VV02-1SP (1)-73 huNb_3_1	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVAS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	55

[0107]

VV02-1SP (1)-73 huNb_3_2	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSAMSWARQAPGKGFIEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSSLRAEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	56
VV02-1SP (1)-73 huNb_3_3	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSSSAMSWARQAPGKFEWVSS</u> <u>IYSSGKTYYYVESVKGRFTISRDN AKNSVYVYLMNSLREPEDTAVYYCATWKT</u> <u>LRVGVWDESDYWGQGTTLTVSS</u>	57

[0108]

[0109]

VV02-1LP-263에 대해, 2개의 돌연변이 (D54G 및 D61E, Kabat 넘버링)를 CDR2에 도입하여 발달성을 개선하였다. VV02-1SP (1)-73에 대해, 하나의 돌연변이 (N31S, Kabat 넘버링) 및 2개의 돌연변이 (D54S 및 D61E, Kabat 넘버링)를 각각 CDR1 및 CDR2에 도입하여, 발달성을 개선하였다. 서열 비교는 하기 표 5A에 나타나있다.

[0110] [표 5A]

표 5A. 업데이트된 CDR

항체	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
VV02-1LP-263	SSAMS	18	GIYSDGSTYYTDSVKD	25	WGTLRFVGVWAEYDH	32
VV02-1LP-263 인간화됨	SSAMS	18	GIYSGGSTYYTESVKD	58	WGTLRFVGVWAEYDH	32
VV02-15P (1)-73	NSAMS	23	SIYSDGKTYVDSVKG	30	WKTLRVGVWDESDY	38
VV02-15P (1)-73 인간화됨	SSAMS	18	SIYSSGKTYVDSVKG	59	WKTLRVGVWDESDY	38

[0111]

[0112] 실시예 6. 항-4-1BB 인간화된 나노바디의 세포 표면 4-1BB 결합 성질

[0113] 세포-기반 설정에서 항원 결합 성질을 평가하기 위해서, 4-1BB 인간화된 나노바디를 FACS에 의해 CHO-K1 세포에서 과발현된 4-1BB에 대한 결합에 대해 분석하였다.

[0114] 간략히 말하면, 인간 4-1BB 또는 게먹이 원숭이 4-1BB를 과발현하는 CHO-K1 세포를 4°C에서 30 min 동안 단계 희석된 항-4-1BB 나노바디와 함께 인큐베이션하였다. 그 다음에, 세포를 Alexa Fluor 633-컨쥬게이션된 항-인간 Fc 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 결합을 Agilent 유동세포분석기로 측정하였다. 결과는 테스트된 모든 인간화된 나노바디가 세포 표면 인간 4-1BB 및 cyno 4-1BB에 대해 전형적인 S자형(sigmoidal) 결합 행위를 나타낸다는 것을 보여주었다 (도 4 & 도 5). 이에 따라 결합 EC₅₀은 표 6 & 표 7에서 나타나있다.

표 6

표 6. 모 클론 VV02-1LP-263 으로부터의 인간화된 나노바디의 세포 표면 4-1BB 에 대한 결합 EC₅₀ (nM).

	CHO-K1/hu4-1BB		CHO-K1/Cyno-41BB	
	EC ₅₀ (nM)	최대 (MFI)	EC ₅₀ (nM)	최대 (MFI)
VV02-1LP-263_2	0.47	47120	0.64	105589
VV02-1LP-263 huNb_1_2	0.17	23533	0.69	99611
VV02-1LP-263 huNb_1_3	0.11	42059	0.33	133804
VV02-1LP-263 huNb_2_2	0.19	23409	0.64	86388
VV02-1LP-263 huNb_2_3	0.11	39070	0.37	129678
VV02-1LP-263 huNb_3_2	0.14	38041	0.70	128178
VV02-1LP-263 huNb_3_3	0.12	40328	0.70	149247

[0115]

표 7

표 7. 모 클론 VV02-1SP (1)-73 으로부터의 인간화된 나노바디의 세포 표면 4-1BB 에 대한 결합 EC_{50} (nM).

	CHO-K1/hu4-1BB	
	EC50 (nM)	최대 (MFI)
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_1	-	233.1
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_2	0.80	5243
VV02-1SP (1)-73 huNb_1_3	0.61	9809
VV02-1SP (1)-73 huNb_2_2	0.37	9270
VV02-1SP (1)-73 huNb_2_3	0.49	9238
VV02-1SP (1)-73 huNb_3_1	27.39	3700
VV02-1SP (1)-73 huNb_3_2	0.52	8562
VV02-1SP (1)-73 huNb_3_3	0.66	9627

[0116]

[0117] 실시예 7. 부위 돌연변이에 의한 항-4-1BB 나노바디의 서열 최적화

[0118] 후보들의 개발 가능성을 더 증가시키기 위해서, 부위 돌연변이에 의해 최적화되도록 항-4-1BB 나노바디 VV02-1LP-263 huNb_1_3을 선택하였다. 최적화된 서열은 표 8에서 나타나있다.

표 8

표 8. VV02-1LP-263 huNb_1_3 의 최적화된 서열

명칭	서열	서열 번호
263 huNb-1-3_1	EVQLV <u>ESGGGLVQ</u> PGGSLRLS CAASGFTFSSS AMSWARQ APGKGF EWVSG IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCATWGT LRF GVWAEYDHWGQGTQ VTVSS	60
263 huNb-1-3_2	EVQLV <u>ESGGGLVQ</u> PGGSLRLS CAASGFTFSSS AMSWARQ APGKGF EWVSG IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCATWGT LRF GVWAEYDHWGQGT LVTVSS	61
263 huNb-1-3_3	EVQLV <u>ESGGGLVQ</u> PGGSLRLS CAASGFTFSSS AMSWARQ TPGKGF EWVSG IYSGGSTYYTESVKDRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR P EDTAVYYCATWGT LRF GVWAEYDHWGQGTQ VTVSS	62

[0119]

[0120] 이중특이적 항체를 구성하기 위한 최적화된 항-4-1BB 서열의 실현 가능성을 평가하기 위해서, 최적화된 항-4-1BB를 G4S 링커를 통해 Fc 단편에서 N297A 돌연변이를 갖는 중앙 관련 항원 (TAA)을 표적화하는 IgG1 항체의 중쇄 C 말단에 융합시켰다. 그 다음에, 경쇄 및 중쇄 발현 벡터를 CHO-K1 세포에 동시 트랜스펙션하였다. 일과성 트랜스펙션 이후, 이중특이적 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 배지로부터 정제하였다. 잘 검증된 항체를 세포-기반 4-1BB 결합, 4-1BB 활성화 및 개발 가능성 평가를 포함한 시험관내(in vitro) 특성화에 적용하였다.

[0121] 세포-기반 4-1BB 결합

[0122] 최적화된 4-1BB 나노바디-기반 이중특이적 항체를 상기 기재된 프로토콜에 따라 CHO-K1 세포에서 과발현된 4-1BB에 대한 결합에 대해 분석하였다. 도 6에서 나타난 바와 같이, 최적화된 항-4-1BB 서열은 4-1BB-함유 CHO-K1 세포에 대해 모 서열과 비슷한 결합 활성을 유지하였다.

[0123] TAA-의존적 4-1BB 활성화

[0124] 4-1BB 신호전달을 활성화시킬 수 있는 항-TAA-4-1BB 이중특이적 항체의 능력을 평가하기 위해, 고전적인 리포터 유전자 검정을 사용하였다. 이 검정에서, 4-1BB를 안정하게 발현하고 계놈에 통합된 NK-kB 루시퍼라제 리포터

작제물을 가진 조작된 Jurkat 세포를 효과기 세포로 사용하였다. TAA 또는 블랭크(blank) CHO-K1 세포를 과발현 하도록 조작된 CHO-K1 세포를 표적 세포로 사용하였다. 이들 두 가지 유형의 세포를 37°C CO2 인큐베이터에서 상이한 농도의 항체와 함께 밤새도록 동시 인큐베이션하였다. 그 다음에, 루시퍼라제의 기질을 추가하고, 발광 강도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 결정하였다.

[0125] 도 7에서 나타난 바와 같이, 최적화된 항-4-1BB 기반 이중특이적 항체는 표적 세포의 존재시 4-1BB 활성화의 유도에 있어서 모 항체 TAA-263-1-3과 비슷한 효능을 나타냈다.

[0126] 열 안정성 평가

[0127] TAA-4-1BB 이중특이적 항체의 열 안정성을 평가하기 위해 강제 분해 테스트를 실행하였다. 항체를 40°C에서 2주 동안 20 mM His, 6% 수크로스+0.02% PS80 pH6.0을 함유하는 완충액에서 인큐베이션하였다. 대표적인 품질 속성, 특히 응집 및 단편화를 SEC-HPLC를 사용하여 2주에 모니터링하였다. 모 항-4-1BB 서열로부터 유래된 이중특이적 항체는 인큐베이션 동안 응집 및 단편화에 의해 검증된 바와 같이 불량한 열 안정성을 나타냈다. 그에 반해서, 최적화된 4-1BB 서열-기반 신규한 TAA-4-1BB 이중특이적 항체는 40°C에서 2주 동안 허용 가능한 열 안정성을 나타냈으며, 앞으로 나아갈 수 있는 잠재적인 합리적 개발 가능성을 나타낸다 (표 9).

표 9

표 9. 강제 분해 테스트에서 TAA-4-1BB 이중특이적 항체의 SEC-HPLC 특성화

샘플	조건	Conc. (mg/ml)	SEC (%)		
			LMW (%)	Main (%)	HMW (%)
TAA-263-1-3_1	T0	6.26	1.66	97.56	0.78
	40°C 2W	5.88	1.59	96.15	2.26
TAA-263-1-3_2	T0	6.68	1.1	98.08	0.83
	40°C 2W	5.26	1.19	96.69	2.12
TAA-263-1-3_3	T0	7.13	1.89	97.25	0.85
	40°C 2W	5.67	1.78	96.15	2.07

[0128]

[0129] * * *

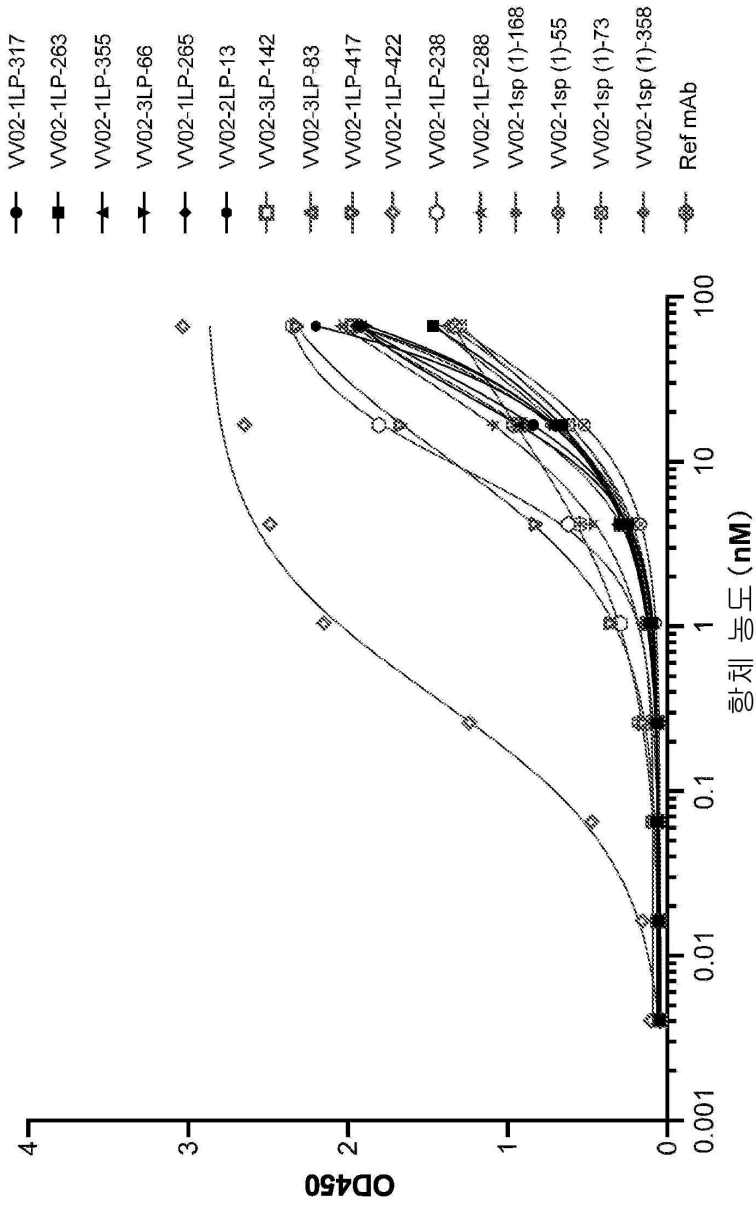
[0130] 본 발명은 본 발명의 개개의 양태의 단일 예시로서 의도되는 기재된 특정 구체예에 의해 범위가 제한되어서는 안 되고, 기능적으로 동등한 임의의 조성물 또는 방법은 본 발명의 범위 내에 있다. 본 발명의 사상 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서 본 발명의 방법 및 조성물에서 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 분명할 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 변형 및 변화가 첨부된 청구항 및 그 동등물의 범위 내에 있는 경우 그것들을 커버하도록 의도된다.

[0131] 이 명세서에서 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 간행물 또는 특허 출원이 특이적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 나타난 바와 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

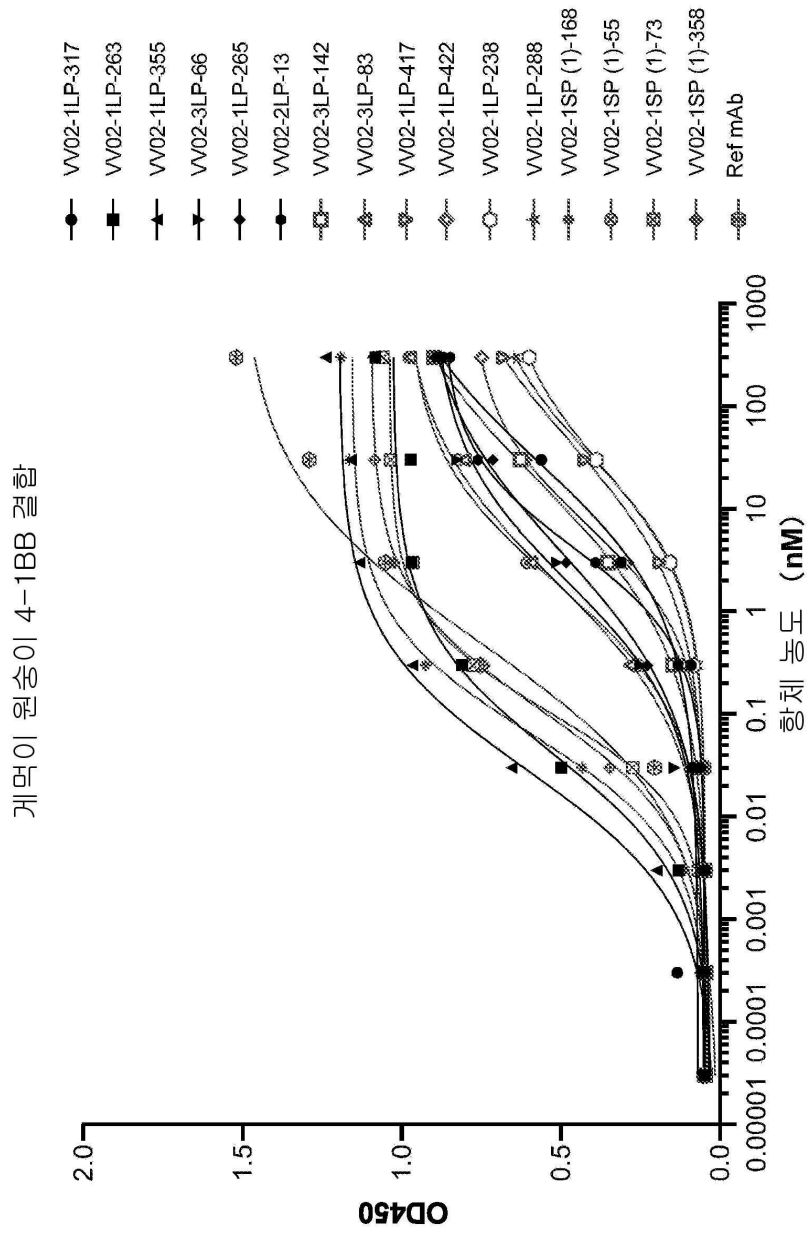
도면

도면1a

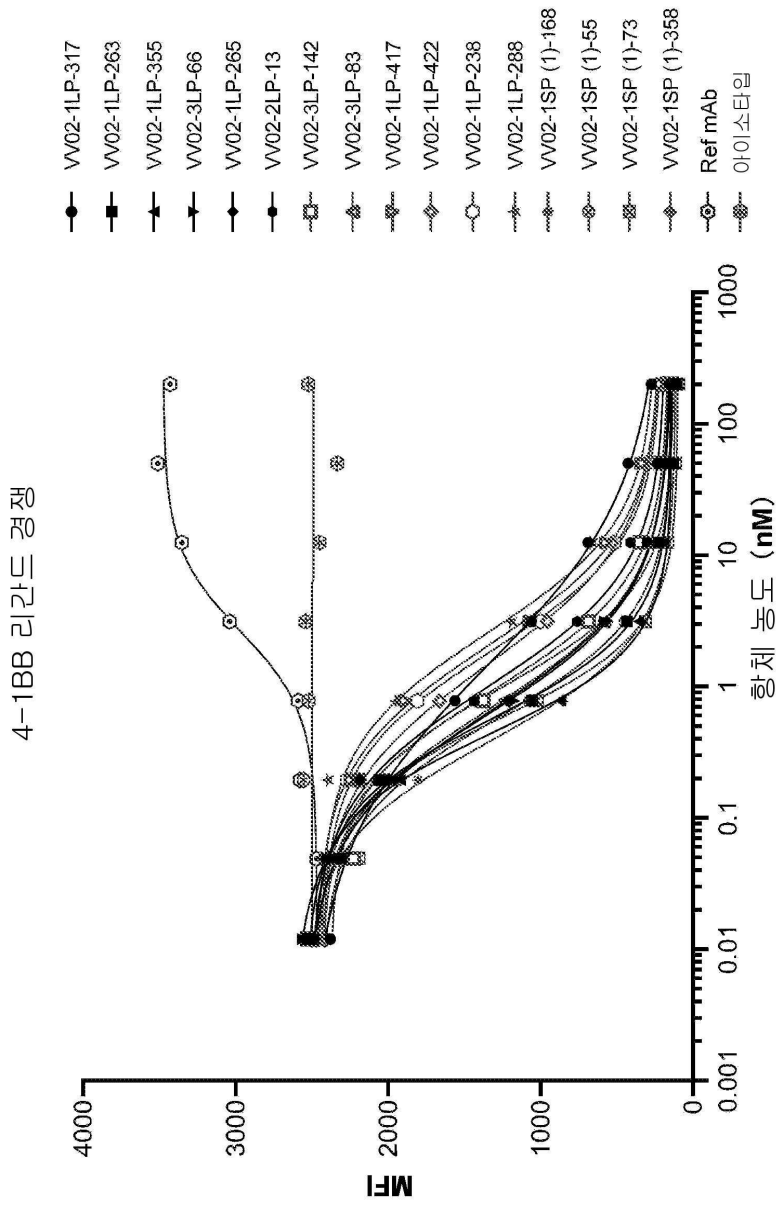
인간 4-1BB 결합



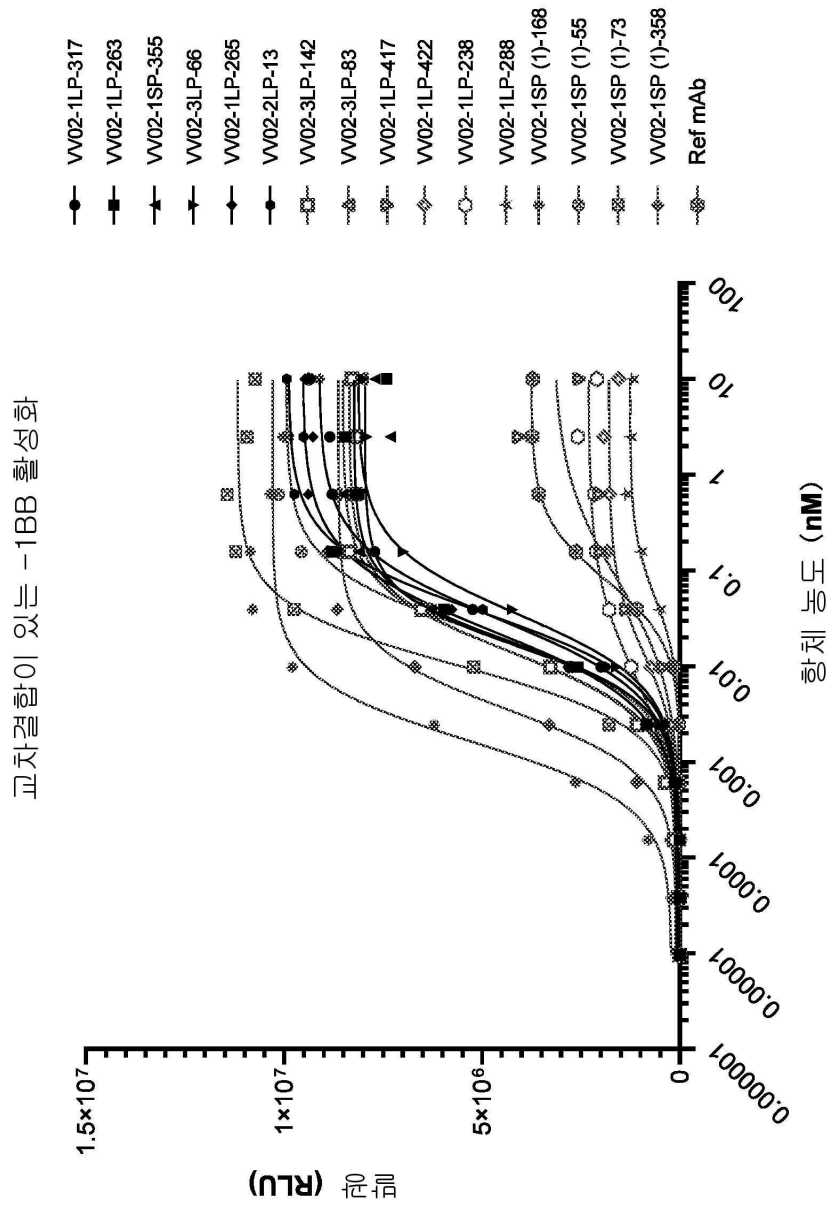
도면1b



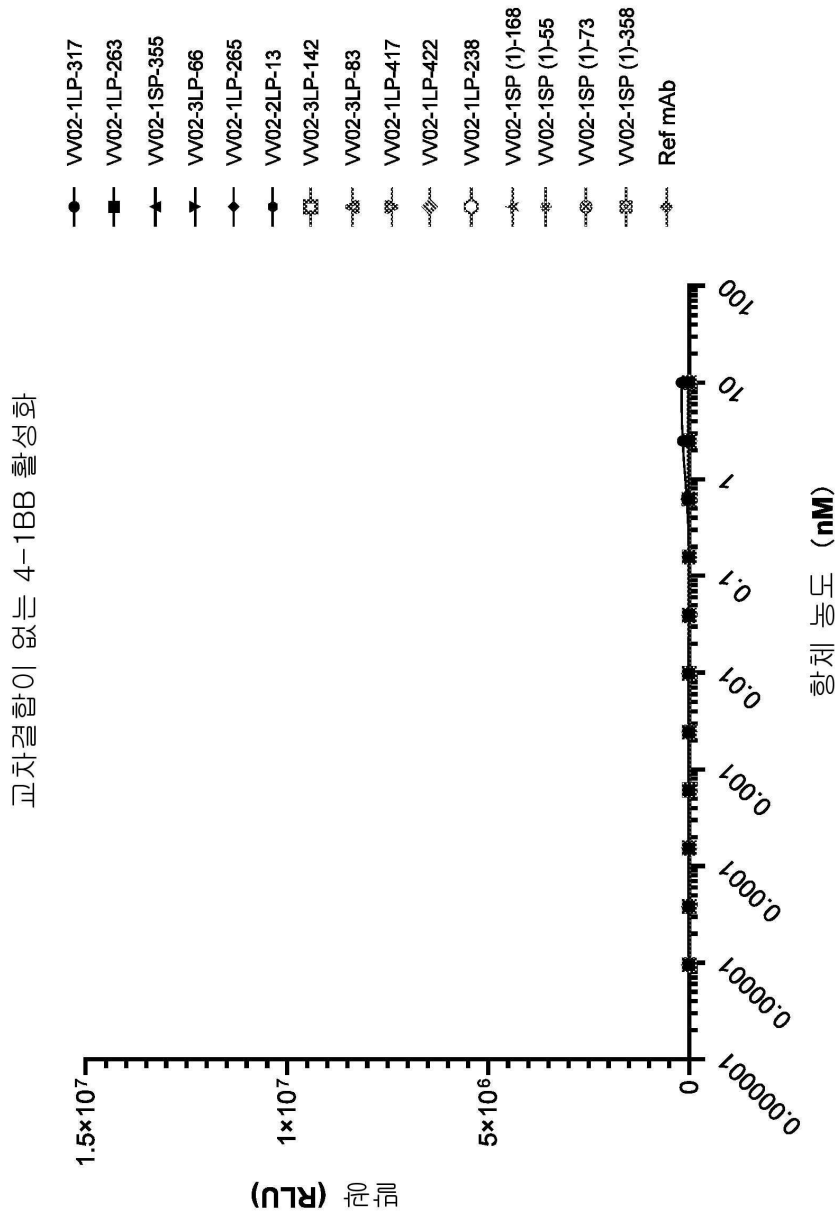
도면2



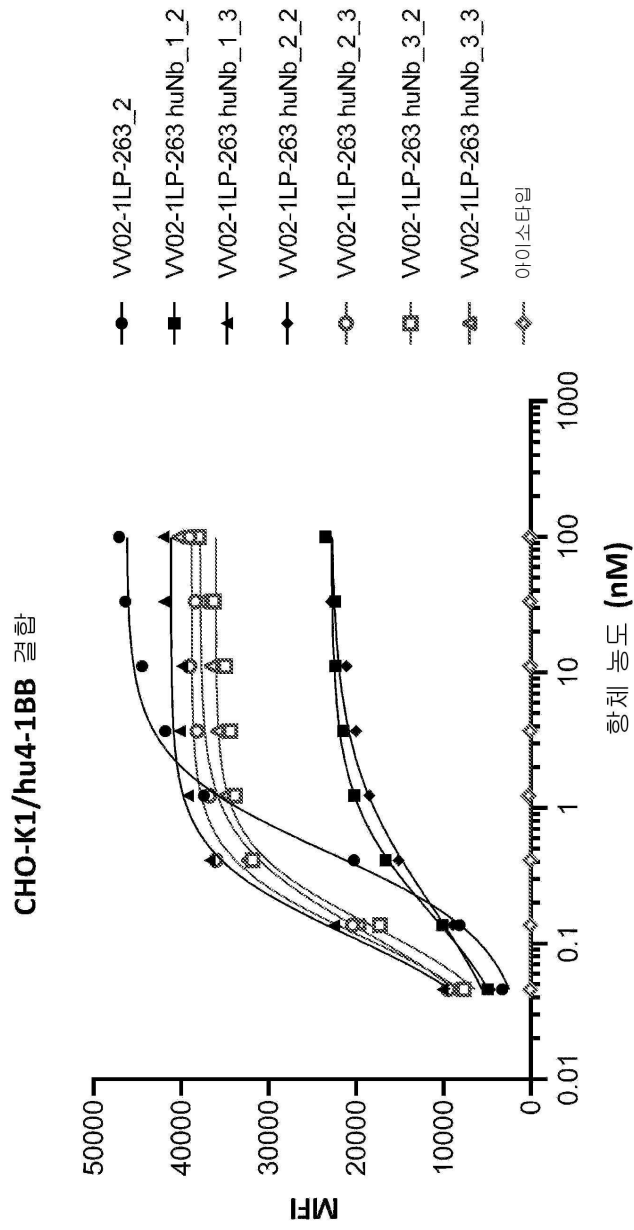
도면3a



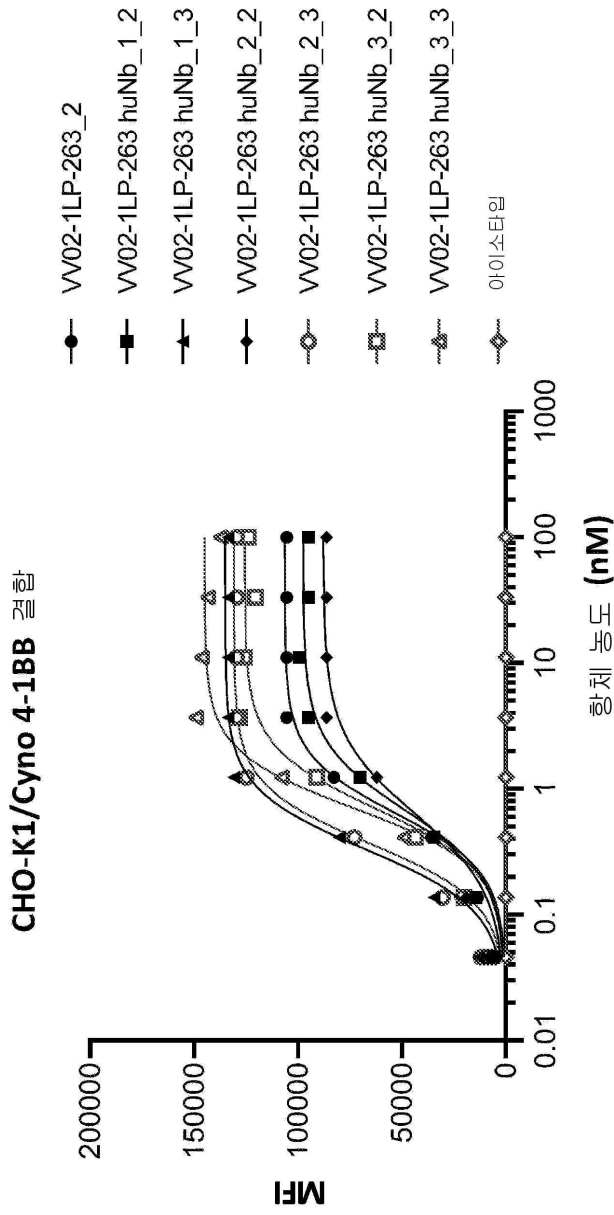
도면3b



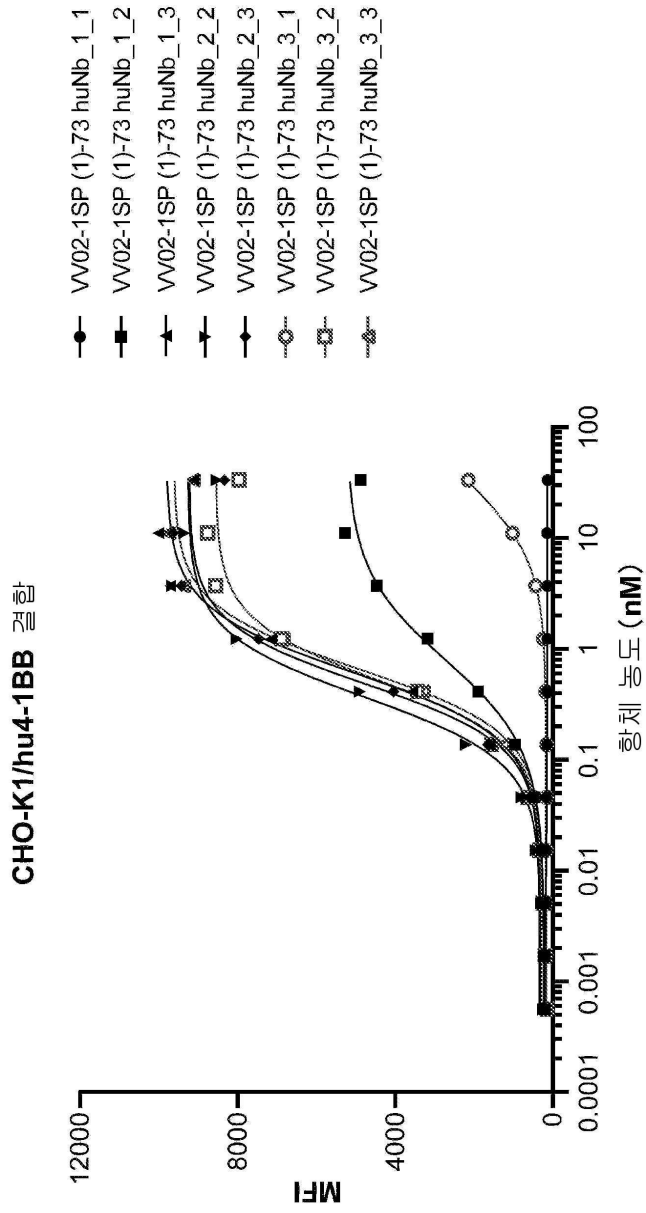
도면4a



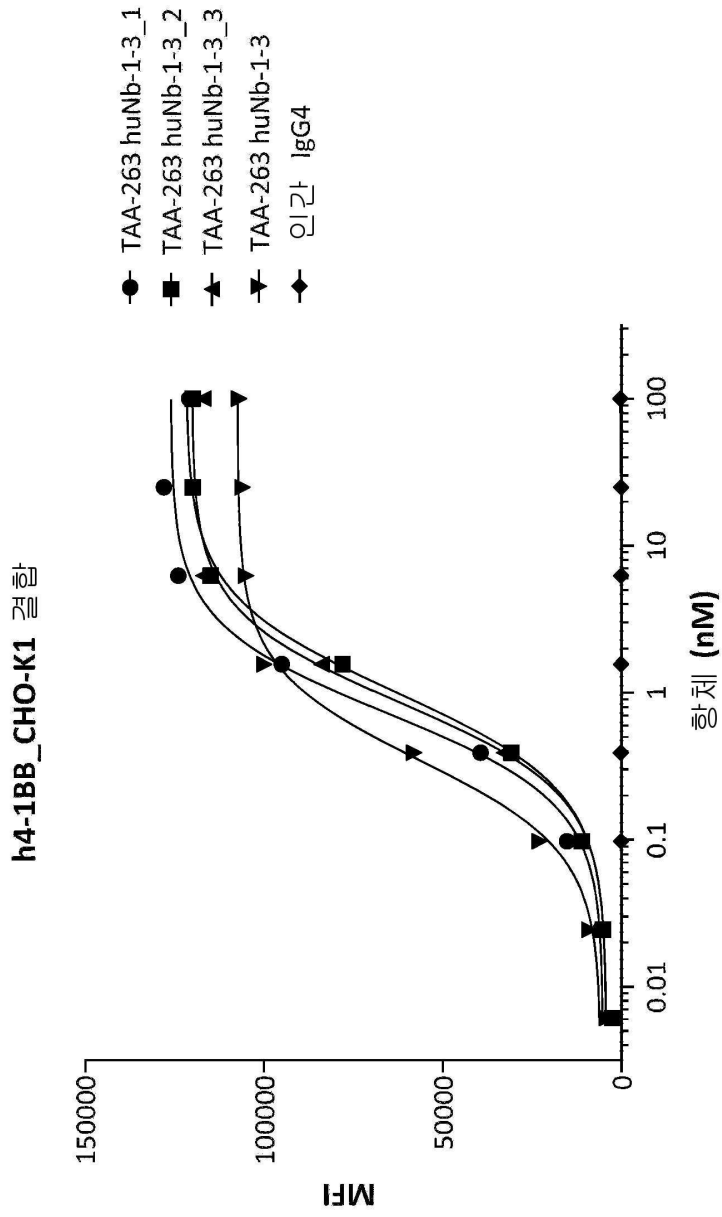
도면4b



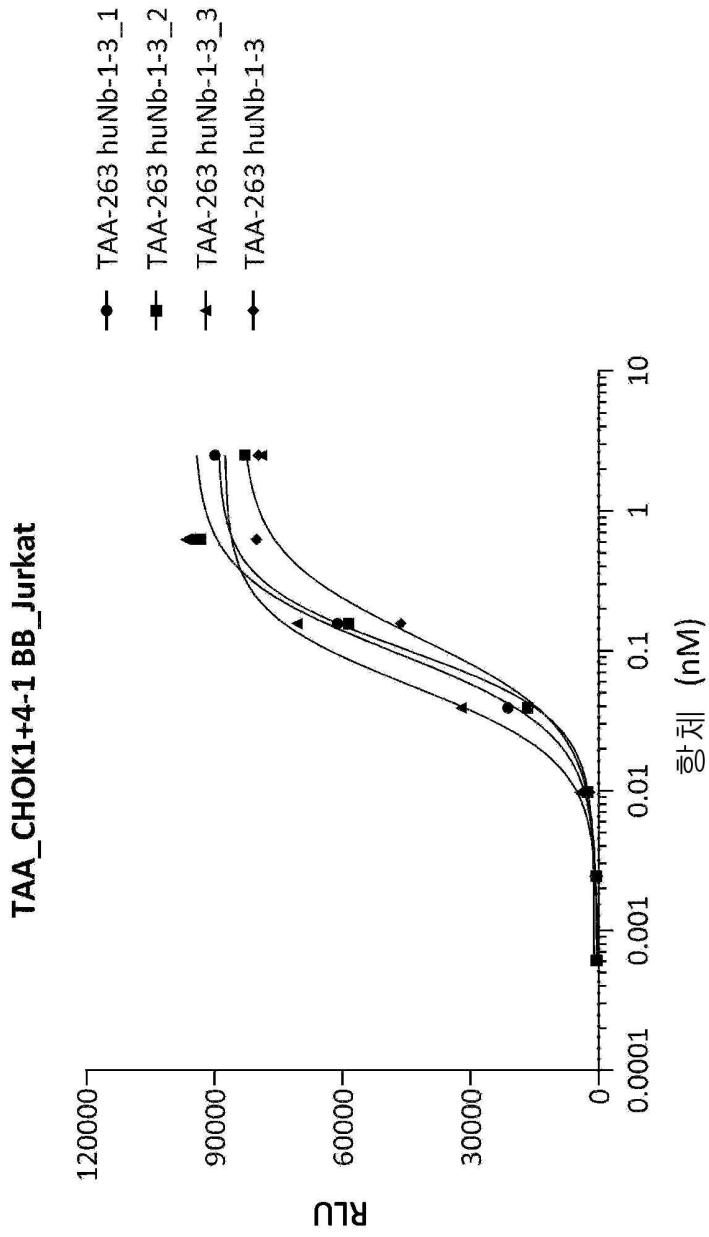
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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