



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월03일

(11) 등록번호 10-2344620

(24) 등록일자 2021년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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

(21) 출원번호 10-2020-7002814

(22) 출원일자(국제) 2018년07월25일

심사청구일자 2020년01월29일

(85) 번역문제출일자 2020년01월29일

(65) 공개번호 10-2020-0023439

(43) 공개일자 2020년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/043632

(87) 국제공개번호 WO 2019/027754

국제공개일자 2019년02월07일

(30) 우선권주장

62/539,687 2017년08월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US08337850 B2

US07288638 B2

US20160244528 A1

(73) 특허권자

일라이 릴리 앤드 캄파니

미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포
레이트 센터

(72) 발명자

프라이, 크리스토퍼 칼

미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피.
오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

칼로스, 마이클 드웨인

미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피.
오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 항-CD137 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 CD137에 결합하고 효능제 활성을 나타내는 항체에 관한 것이고, 이는 단독으로 및 화학요법 및 이온화 방사선과 조합하여 고형 종양 및 혈액 종양을 치료하는데 유용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

코타나이즈, 헬렌

미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피.
오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

샌디퍼, 스테파니 린

미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피.
오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

명세서

청구범위

청구항 1

서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1,
 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2,
 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,
 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,
 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및
 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3
 을 포함하는 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,
 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및
 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
 을 포함하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,
 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및
 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역
 을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,
 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및
 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄
 를 포함하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,
 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및
 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄
 를 포함하는 항체.

청구항 6

서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1,
 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2,
 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,

서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,
 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및
 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3
 을 포함하는 항체를 발현할 수 있는, 단리된 포유동물 세포.

청구항 7

서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및
 서열식별번호: 11의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄
 를 포함하는 항체를 발현할 수 있는, 단리된 포유동물 세포.

청구항 8

항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계 및
 항체를 회수하는 단계
 를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이며,
 여기서 항체는

서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1,
 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2,
 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3,
 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1,
 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및
 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계 및
 항체를 회수하는 단계
 를 포함하는, 항체를 제조하는 방법이며,
 여기서 항체는

서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및
 서열식별번호: 11의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄

를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항의 방법에 의해 제조된 항체.

청구항 11

서열식별번호: 14의 서열 및
 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16 또는 서열식별번호: 17 중 하나의 서열
 을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 분자.

청구항 12

제11항의 DNA 분자를 포함하는, 단리된 포유동물 세포.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 또는 제8항 또는 제9항의 방법에 의해 제조된 항체를 포함하는, 암의 치료를 위한 의약.

청구항 14

제13항에 있어서, 암이 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암인 의약.

청구항 15

제13항에 있어서, 암이 담관암종, 두경부 편평 세포 암종, 폐 선암종, 폐 편평 세포 암종, 투명 세포 신암종, 또는 두경부 편평 세포 암종인 의약.

청구항 16

제13항에 있어서, 암이 방광암, 두경부 편평 세포 암종 또는 신세포 암종인 의약.

청구항 17

제13항에 있어서, 이온화 방사선과 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여되는 의약.

청구항 18

제13항에 있어서, 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여되는 의약.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

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

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간 CD137에 대한 효능작용 항체, 이러한 효능작용 항-인간 CD137 항체를 포함하는 조성물, 및 고형 및 혈액 종양의 치료를 위해 이러한 효능작용 항-인간 CD137 항체를 단독으로 또는 화학요법 및 다른 암 치료제와 조합하여 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항종양 면역 반응을 부스팅하는 것이 암 요법의 효과적인 방법일 수 있다는 것이 현재 알려져 있다. 이와 관련하여, 4-1BB로도 알려진 CD137은 TNF 수용체 패밀리에 속하고, 예컨대 T 세포 증식 및 이펙터 기능을 유도하고, 면역 기억을 촉진하고, 활성화-유도된 세포 사멸을 억제함으로써 T 세포 면역 반응의 활성화에서 역할을 한다. CD137을 표적화하는 효능작용 항체는 무린 종양 모델에서 단독요법으로서 가능성을 나타냈으나 (Melero, I. et al., Nat. Med. 3(6):682-685 (1997)), 인간 CD137을 표적화하는 효능제 항체는 인간 환자에서 단독요법 또는 조합 요법으로서 아직 충분한 반응을 입증하지 않았다. 이와 관련하여, 또한 우토밀루맵 (완전 인간 CD137 효능제 IgG2 mAb) (Fisher, T.M. et al., Cancer Immunol. Immunother. (2012) 61:1721-1733) 및 우렐루맵 (인간화 CD137 효능제 IgG4 mAb) (Segal, N.H. Clin. Cancer Res. (2017) 23(8):1929-1936)은 단독요법으로 또는 심지어 조합 요법으로 사용하는데도 규제기관의 승인을 받은 바 없다. 사실상, 인간 CD137을 표적화하는 어떤 효능작용 항체도 인간에서의 치료 용도에 대해 승인받은 바 없다.

[0003] 따라서, 인간 CD137 수용체를 효능작용하고, 강건한 항암 면역 반응을 촉진하면서도, 허용가능한 독성 프로파일을 갖는 추가의 완전 인간 항체에 대한 필요가 존재한다. 암의 치료를 위한 다른 치료제와 조합될 수 있는 대안적 항-인간 효능작용 CD137 항체에 대한 필요가 또한 남아있다. 특히, 암 단독요법 및/또는 조합 요법으로서 충분한 효력을 나타내는 항-인간 CD137 항체에 대한 필요가 또한 남아있다.

[0004] 이론에 제한되지 않으면서, CD137을 표적화하는 현행 효능작용 항체의 암 단독요법 및/또는 조합 작용제로서의 사용은 상기 항체의 효능작용 농도, 및 보다 높고 잠재적으로 효과적인 용량으로 사용함으로써 발생하는 면역-관련 유해 사건과 같은 요인에 의해 방해받는다 고 여겨진다. 특히, 현행 항체들은 너무 강력하여 유해 사건을

유도하거나, 또는 준최적의 효능을 나타낸다.

발명의 내용

[0005] 본원에 기재된 항-인간 CD137 효능작용 항체는 인간 CD137 및 시노물구스 원숭이 CD137에 결합하고, 시험관내 T 세포 활성화를 자극하고, 인간 CD137 세포 표면 발현을 촉진하고, NF- κ B 활성을 증진하고, 단독요법으로서 비소세포 폐암의 무린 종양 모델에서 종양 성장을 억제하고, 시험관내 T-조절 세포 매개 억제를 억제하고, 면역 유전자 서명을 활성화하고, 종양내 CD3⁺ T 세포의 빈도를 증가시키고, 인간 CD137과의 결합에 대해 인간 CD137-리간드와 경쟁하고, 인간 CD137 상의 고유한 아미노산 잔기에 결합하는 완전 인간, Fc γ -수용체-매개 이펙터 킬 항체이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0006] 본 개시내용은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체를 제공한다.

[0007] 본 개시내용은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 본 개시내용은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 제공한다.

[0008] 본 개시내용은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 본 개시내용은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다.

[0009] 본 개시내용은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 제공한다.

[0010] 본 개시내용은 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 제공한다.

[0011] 본 개시내용은 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항체를 제조하는 방법을 제공하며; 여기서 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다.

[0012] 본 개시내용은 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항체를 제조하는 방법을 제공하며; 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0013] 본 개시내용은 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 항체를 제공하며; 여기서 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 본 개시내용은 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 항체를 제공하며; 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0014] 본 개시내용은 서열식별번호: 14의 서열 및 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16 또는 서열식별번호: 17 중 하나의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 본 개시내용은 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 또는 서열식별번호: 17의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 본 개시내용은 서열식별번호: 14의 서열 및 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16 또는 서열식별

번호: 17 중 하나의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 본 개시내용은 서열식별번호: 14, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 또는 서열식별번호: 17의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다.

[0015]

본 개시내용은 본원에 개시된 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 본 개시내용은 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 개시내용은 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 개시내용은 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 본 개시내용은 항체 및 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0016]

본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 유효량의 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0017]

본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 유효량의 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암,

함으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 유효량의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다.

[0022] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 방광암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 유방암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 담도암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 결장암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 자궁내막암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 식도암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 위암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 두경부암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 비소세포 폐암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 전립선암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 직장암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 두경부 편평 세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 신세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 담관암종이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 폐 선암종이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 폐 편평 세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항체를 제공하며; 여기서 암은 투명 세포 신암종이다.

[0023] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 방광암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 유방암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 담도암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 결장암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 자궁내막암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 식도암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 위암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 두경부암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 비소세포 폐암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 전립선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 직장암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 두경부 편평 세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 신세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 담관암종이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 폐 선암종이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 폐 편평 세포 암종이다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 항체의 용도를 제공하며; 여기서 암은 투명 세포 신암종이다.

[0024] 본 개시내용은 요법에 사용하기 위한 본원에 개시된 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체를 제공한다. 본 개시내용은 요법에 사용하기 위한 본원에 개시된 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체를 제공하고; 여기서 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함한다. 본 개시내용은 요

[0034] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 항-인간 CD137 (서열식별번호: 1) 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하고; 여기서 항체는 1종 이상의 화학요법제와 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여된다.

[0035] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 중 적어도 1개 상에서 접촉하고; 임의로, 여기서, 항체는 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 4개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 5개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 6개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 7개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 8개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 9개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 10개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 11개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 12개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 13개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 14개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 15개의 잔기; 또는 보다 바람직하게는 모든 잔기와 접촉한다. 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 중 적어도 1개 상에서 접촉하고; 임의로, 여기서 항체는 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 4개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 5개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 6개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 7개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 8개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 9개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 10개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 11개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 12개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 13개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 14개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 15개의 잔기; 또는 보다 바람직하게는 모든 잔기와 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.

[0036] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 중 적어도 1개 상에서 접촉하고; 임의로, 여기서, 항체는 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 4개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 5개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 6개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 7개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 8개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 9개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 10개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 11개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 12개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 13개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 14개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 15개의 잔기; 또는 보다 바람직하게는 모든 잔기와 접촉한다. 본 개시내용은 암의 치료를 위한 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 중 적어도 1개 상에서 접촉하고; 임의로, 여기서 항체는 적어도 2개의 잔기, 바람직하게는 적어도 3개의 잔기, 보다 바람직하게는 적어도 4개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 5개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 6개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 7개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 8개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 9개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 10개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 11개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 12개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 13개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 14개의 잔기; 보다 바람직하게는 적어도 15개의 잔기; 또는 보다 바람직하게는 모든 잔기와 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.

- [0037] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함), 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉한다. 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 웅스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0038] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 웅스트롬 이하 내에 있는 것이고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0039] 본 개시내용은 암의 치료에 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함), 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉한다. 본 개시내용은 암의 치료에 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 웅스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0040] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체, 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체, 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137과 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)에서 접촉하고; 여기서, 접촉은 X선 결정학에 의해 결정되고, 접촉된 잔기는 항체의 6 웅스트롬 이하 내에 있는 것이고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0041] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 Fc γ RI, 인간 Fc γ RIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIIa(F), 인간 Fc γ RIIIa(V), 또는 인간 C1q에 결합하지 않는다. 본 개시내용은 암의 치료에 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 Fc γ RI, 인간 Fc γ RIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIIa(F), 인간 Fc γ RIIIa(V), 또는 인간 C1q에 결합하지 않는다.
- [0042] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체 또는 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공하고, 여기서 항체는 인간 Fc γ RI, 인간 Fc γ RIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIIa(F), 인간 Fc γ RIIIa(V), 또는 인간 C1q에 결합하지 않고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다. 본 개시내용은 암의 치료에 또는 암의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 효능작용하는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 Fc γ RI, 인간 Fc γ RIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIIa(F), 인간 Fc γ RIIIa(V), 또는 인간 C1q에 결합하지 않고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0043] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서 중쇄는 인간 CD137 상의 하기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함) 중 적어도 1개의 아미노산 잔기와 접촉하고; 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기: 96-98 (경계값 포함),

100 및 114-116 (경계값 포함) 중 적어도 1개의 아미노산 잔기와 접촉한다.

- [0044] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서 중쇄는 인간 CD137 상의 하기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함) 중 적어도 1개의 아미노산 잔기와 접촉하고; 여기서, 경쇄는 인간 CD137 상의 하기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함) 중 적어도 1개의 아미노산 잔기와 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0045] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉한다.
- [0046] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0047] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉한다.
- [0048] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0049] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0050] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이다.
- [0051] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0052] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고; 여기서, 중쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 55, 59, 63, 66, 72, 93-103 (경계값 포함) 및 112-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 임의로, 여기서 경쇄는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 96-98 (경계값 포함), 100 및 114-116 (경계값 포함)과 접촉하고; 여기서 접촉된 잔기는 X선 결정학에 의해 결정시, 항체의 6 옹스트롬 이하 내에 있는 것이고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0053] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서, 항체는 인간 CD137 상의 하

기 아미노산 잔기: 97 및 115 중 적어도 1개에 결합한다.

- [0054] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115 중 적어도 2개에 결합한다.
- [0055] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115에 결합한다.
- [0056] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97 및 115 중 적어도 1개에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정된다.
- [0057] 본 개시내용은 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115 중 적어도 2개에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정된다.
- [0058] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정된다.
- [0059] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정된다.
- [0060] 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정되고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0061] 본 개시내용은 암의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 인간 CD137 (서열식별번호: 1)의 효능제인 항체의 용도를 제공하고, 여기서 항체는 인간 CD137 상의 하기 아미노산 잔기: 97, 114 및 115에 결합하고; 여기서 결합은 하기 아미노산 잔기: 97, 114, 및 115 중 1개 이상에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체 인간 CD137 단백질을 사용하여 결정되고; 여기서 암은 방광암, 유방암, 담도암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 비소세포 폐암, 전립선암, 직장암 또는 갑상선암이다.
- [0062] 본 개시내용은 하기 특색 중 2개 이상을 포함하는 완전 인간 CD137 효능제 항체를 제공한다: (a) 항체는 인간 CD137에 대한 결합에 대해 인간 CD137-리간드와 경쟁한다; (b) 항체는 인간 Fc γ RI, 인간 Fc γ RIIa, 인간 Fc γ RIIb, 인간 Fc γ RIIIa(F), 인간 Fc γ RIIIa(V) 또는 인간 C1q에 결합하지 않는다; (c) 항체는 시노몰구스 원숭이 CD137에 결합한다; (d) 항체는 단독요법으로서 인간 비소세포 폐 중앙 성장을 억제한다; 및 (e) 항체는 종양 내 CD3⁺ T 세포의 빈도를 증가시킨다.
- [0063] 유용한 화학요법제의 비제한적 예는 5-플루오로우라실, 히드록시우레아, 겐시타빈, 메토트렉세이트, 독소루비신, 에토포시드, 카르보플라틴, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 멜팔란, 다카르바진, 탁솔, 캄프토테신, 폴페리, 폴폭스, 도세탁셀, 다우노루비신, 파클리탁셀, 옥살리플라틴 및 그의 조합을 포함한다.
- [0064] 본원에 사용된 용어 "항체"는 2개의 중쇄 (HC) 및 2개의 경쇄 (LC)를 가지며 중쇄 및 경쇄가 디설피드 결합에 의해 상호연결된 것인 폴리펩티드 복합체를 지칭하고; 여기서 항체는 IgG 하위부류 항체이다.
- [0065] 본 발명의 항체는 조작된 비-자연 발생 폴리펩티드 복합체이다. 본 발명의 DNA 분자는 본 발명의 항체에서의 폴리펩티드 중 적어도 1개의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 비-자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자이다.
- [0066] 본 발명의 항체는 IgG 유형 항체이고 쇄내 및 쇄간 디설피드 결합을 통해 가교되는 "중"쇄 및 "경"쇄를 갖는다. 각각의 중쇄는 N-말단 HCVR 및 중쇄 불변 영역 ("HCCR")으로 구성된다. 각각의 경쇄는 LCVR 및 경쇄 불변 영역 ("LCCR")으로 구성된다. 특정 생물계에서 발현되는 경우, 천연 인간 Fc 서열을 갖는 항체는 Fc 영역에서 글리코실화된다. 전형적으로, 글리코실화는 항체의 Fc 영역에서의 고도로 보존된 N-글리코실화 부위에서 발생한다.

N-글리칸은 전형적으로 아스파라긴에 부착된다. 항체는 또한 다른 위치에서도 글리코실화될 수 있다.

- [0067] 임의로, 본원에 기재된 항-인간 CD137 항체는 인간 IgG1로부터 유래된 Fc 부분을 함유한다. IgG1은 Fc-감마 수용체 패밀리의 (Fc γ R)의 단백질뿐만 아니라 C1q에 결합하는 것으로 널리 공지되어 있다. 이들 수용체와의 상호작용은 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 유도할 수 있다. 따라서, 임의로, 본원에 기재된 항-인간 CD137 항체는 Fc 이펙터 기능이 결여된 완전 인간 모노클로날 항체이다 (IgG1, Fc-널). Fc-널 IgG1 항체를 달성하기 위해, 잔기의 선택적 돌연변이유발이 그의 IgG1 Fc 영역의 CH2 영역 내에서 필요하다. 아미노산 치환 L234A, L235E, 및 G237A는 Fc γ RI, Fc γ RIIa, 및 Fc γ RIII에 대한 결합을 감소시키기 위해 IgG1 Fc 내로 도입되고, 치환 A330S 및 P331S는 C1q-매개 보체 고정을 감소시키기 위해 도입된다. 인간에서 투여되는 경우 면역 반응의 잠재적 유도를 감소시키기 위해, 특정 아미노산은 항체 배선 서열과 매칭되는 복귀-돌연변이를 필요로 할 수 있다.
- [0068] HCVR 및 LCVR 영역은 프레임워크 영역 ("FR")으로 지칭되는 보다 더 보존되어 있는 영역 사이에 배치된, 상보성 결정 영역 ("CDR")으로 지칭되는 추가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 HCVR 및 LCVR은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본원에서, 중쇄의 3개의 CDR은 "HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3"으로 지칭되고 경쇄의 3개의 CDR은 "LCDR1, LCDR2 및 LCDR3"으로 지칭된다. CDR은 항원과 특이적 상호작용을 형성하는 잔기 중 대부분을 함유한다. 본 발명의 목적을 위해, 노스 CDR 정의가 사용된다. 노스(North) CDR 정의 (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))는 다수의 결정 구조를 사용하는 친화도 전파 클러스터링에 기초한다.
- [0069] HCVR 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 HCVR-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간뿐만 아니라 다른 포유동물의 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은, 예를 들어 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다.
- [0070] LCVR 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 LCVR-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 전장 경쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간뿐만 아니라 다른 포유동물의 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이들 영역을 포괄하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 항체의 경우에, 경쇄 불변 영역은 카파 불변 영역이다.
- [0071] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 그 서열이 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된 후에 숙주 세포에서 발현될 것이다. 발현 벡터는 전형적으로 숙주 유기체에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 복제가 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 허용하기 위한 선택 마커, 예를 들어 테트라시클린, 네오마이신 및 디히드로폴레이트 리덕타제를 함유할 것이다.
- [0072] 본 발명의 항체는 포유동물 세포에서 용이하게 생산될 수 있으며, 그의 비제한적 예는 CHO, NSO, HEK293 또는 COS 세포를 포함한다. 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 배양된다.
- [0073] 관심 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 항체의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 발현 제어 서열)을 함유하는 벡터는 세포 숙주의 유형에 따라 달라지는 널리 공지된 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0074] 단백질 정제의 다양한 방법이 사용될 수 있고 이러한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고 예를 들면, 문헌 [Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83-89 (1990) 및 Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Edition, Springer, NY (1994)]에 기재되어 있다.
- [0075] 본 발명의 다른 실시양태에서, 항체, 또는 그를 코딩하는 핵산은 단리된 형태로 제공된다. 본원에 사용된 용어 "단리된"은 세포 환경에서 발견되는 임의의 다른 거대분자 종이 없는 또는 실질적으로 없는 단백질, 펩티드 또는 핵산을 지칭한다. 본원에 사용된 "실질적으로 없는"은 관심 단백질, 펩티드 또는 핵산이 존재하는 거대분자 종의 80% 초과 (몰 기준), 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과를 차지한다는 것을 의미한다.
- [0076] 본 발명의 항체 또는 그를 포함하는 제약 조성물은 비경구 경로에 의해 투여될 수 있고, 그의 비제한적 예는 정맥내 투여이다. 본 발명의 항체는 단일 또는 다중 용량으로 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 환자에게 단독으로 투여될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al. Pharmaceutical

Press])에 의해 제조될 수 있고, 본원에 개시된 바와 같은 항체 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0077] 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 효과)을 제공하도록 조정될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하도록 적정될 수 있다. 정맥내 (i.v.) 또는 비-정맥내 투여, 국소 또는 전신, 또는 그의 조합인 경우, 투여 스케줄은 전형적으로 단일 볼루스 투여, 또는 연속 주입부터 1일 다회 투여 (예컨대, 매 4-6 시간마다) 범위일 수 있거나, 치료하는 의사 및 환자의 상태에 의해 지시되는 바와 같을 수 있다. 투여량 및 빈도는 환자를 치료 중인 의사에 의해 결정될 것이다.

[0078] 용어 "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")은 기존 증상, 장애, 상태 또는 질환의 진행 또는 중증도를 둔화, 차단, 저지, 완화, 정지, 감소 또는 역전시키는 것을 지칭한다.

[0079] "유효량"은 연구원, 의사 또는 다른 임상의가 추구하는 조직, 시스템, 동물, 포유동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응 또는 그들에 대한 목적하는 치료 효과를 도출할, 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체를 포함하는 제약 조성물의 양을 의미한다. 항체의 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 또한 치료상 유의한 효과가 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 양이다.

[0080] 항체 특징화, 생성, 발현 및 정제

[0081] 포유동물 세포에서 서열식별번호: 14에 제시된 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열식별번호: 17에 제시된 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열을 사용한 항체 생산은 2가지의 항체 생성물-관련 중: (a) 서열식별번호: 10에 제시된 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 11의 경쇄 아미노산 서열을 갖는 전장 항체 (이하에서 "항체 A1"로 지칭됨); 및 (b) 경쇄의 n-말단 알라닌의 클리핑으로부터 생성된 단일 아미노산 말단절단된 형태의 항체 (이하에서 "항체 A2"로 지칭됨)를 생성하고, 항체 A2는 서열식별번호: 10에 제시된 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 13에 제시된 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 본원에 사용된 "항체 A1/2"는 서열식별번호: 17에 제시된 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열을 사용하여 생성된 항체 생성물을 지칭하고, 항체 A1 (~ 6%) 및 항체 A2 (~ 94%)의 조합을 포함한다. 항체 A1은 서열식별번호: 14에 제시된 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열식별번호: 15에 제시된 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열을 사용하여 유의한 양의 항체 A2 없이 합성될 수 있다. 항체 A2는 서열식별번호: 14에 제시된 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 경쇄 폴리뉴클레오티드 서열을 사용하여 유의한 양의 항체 A1 없이 합성될 수 있다.

[0082] 본 발명의 항체는 파지 디스플레이를 포함하나 이에 제한되지는 않는 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 추가적으로, 상기 기재된 바와 같이 유도된 항체는 본원에 기재된 검정을 사용하여 추가로 스크리닝될 수 있다.

[0083] 항체 A1 및 A2의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 폴리펩티드 및 완전 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열, 및 그들을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 "아미노산 및 뉴클레오티드 서열"이라는 표제의 섹션에 열거된다. 또한, 항체 A1, A2 및 A1/2의 경쇄, 중쇄, 경쇄 가변 영역, 및 중쇄 가변 영역에 대한 서열식별번호가 표 1 & 2에 제시된다.

[0084] 표 1

상응하는 SEQ ID (아미노산)	항체 A1	항체 A2
HCDR1	2	2
HCDR2	3	3
HCDR3	4	4
LCDR1	5	5
LCDR2	6	6
LCDR3	7	7
HCVR	8	8
LCVR	9	12
중쇄	10	10
경쇄	11	13

[0085]

[0086] 표 2

상응하는 SEQ ID (DNA)	항체 A1	항체 A2	항체 A1/2
HC	14	14	14
LC	15	16	17

[0087]

[0088]

항체 A1, A2 및 A1/2를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본 발명의 항체는 본질적으로 하기와 같이 제조 및 정제될 수 있다. 적절한 숙주 세포, 예컨대 HEK 293 또는 CHO는 미리 결정된 최적의 HC:LC 벡터 비, 또는 HC 및 LC 둘 다를 코딩하는 단일 벡터 시스템을 사용하여 항체를 분비하기 위한 발현 시스템에 의해 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 항체가 분비된 정화된 배지는 많은 통상적으로 사용되는 기술 중 임의의 것을 사용하여 정제될 수 있다. 예를 들어, 배지는 상용성 완충제, 예컨대 포스페이트 완충 염수 (pH 7.4)로 평형화된 맵셀렉트(MabSelect) 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare)), 또는 카파셀렉트(KappaSelect) 칼럼 (지이 헬스케어)에 편리하게 적용될 수 있다. 비특이적 결합 성분을 제거하기 위해 칼럼을 세척할 수 있다. 결합된 항체를, 예를 들어 pH 구배 (예컨대 20 mM 트리스 완충제 pH 7에서 10 mM 시트르산나트륨 완충제 pH 3.0, 또는 포스페이트 완충 염수 pH 7.4에서 100 mM 글리신 완충제 pH 3.0)에 의해 용리시킬 수 있다. 항체 분획을, 예컨대 UV 흡광도 또는 SDS-PAGE에 의해 검출할 수 있고, 이어서 폴딩시킬 수 있다. 추가 정제는 의도되는 용도에 따라 임의적이다. 통상적인 기술을 사용하여 항체를 농축 및/또는 멸균 여과할 수 있다. 가용성 응집체 및 다량체를 크기 배제, 소수성 상호작용, 이온 교환, 다중모드 또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 포함한 통상적인 기술에 의해 효과적으로 제거할 수 있다. 생성물을 즉시 -70℃에서 동결시킬 수 있거나 또는 동결건조시킬 수 있다.

[0089]

본원에 사용된 BMS20H4.9는 서열식별번호: 18에 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 19에 제시된 경쇄를 갖는 항체를 지칭하고, 이전에 US7288638에 기재되었다. 본원에 사용된 PF83은 서열식별번호: 20에 제시된 중쇄 및 서열식별번호: 21에 제시된 경쇄를 갖는 항체를 지칭하고, 이전에 US8337850에 기재되었다.

- [0090] 항체 A1/2는 인간 CD137에 결합한다
- [0091] 본원에 개시된 항체가 인간 CD137에 결합하는 능력은 ELISA에 의해 측정할 수 있다. 인간 CD137에 대한 결합을 측정하기 위해, 96-웰 플레이트 (눈크(Nunc))를 인간 CD137-Fc (알앤디 시스템즈(R&D Systems))로 밤새 4℃에서 코팅한다. 웰을 차단 완충제 (0.2% 소 혈청 알부민 및 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS)로 2시간 동안 차단시킨다. 웰을 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3회 세척한다. 이어서, 항체 A1/2 또는 대조군 IgG (100 마이크로리터)를 상이한 농도로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세척 후, 플레이트를 100 마이크로리터의 염소 항-인간 IgG F(ab')₂-HRP 접합체 (잭슨 이뮤노 리서치 래보러토리즈(Jackson Immuno Research Laboratories))와 함께 실온에서 45분 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 세척한 다음, 100 마이크로리터의 3,3', 5,5'-테트라-메틸벤지딘과 함께 인큐베이션한다. 650 nm에서의 흡광도를 스펙트라맥스(SpectraMax)® 마이크로플레이트 판독기 상에서 판독한다. 반수 최대 유효 농도 (EC₅₀)는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 7 소프트웨어를 사용하여 계산된다.
- [0092] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2는 0.027 nM의 EC₅₀으로 인간 CD137에 결합한다.
- [0093] 항체 A1/2는 시노몰구스 원숭이 CD137에 결합한다
- [0094] 본원에 개시된 항체가 세포 표면 시노몰구스 원숭이 CD137에 결합하는 능력은 유동 세포측정 검정을 사용하여 측정할 수 있다. 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민(Lipofectamine)TM 2000 시약 (인비트로젠(Invitrogen)TM)을 사용하여 시노-CD137 수용체 플라스미드 DNA를 인간 293 세포 (ATCC) 내로 형질감염시킴으로써 시노몰구스 원숭이 CD137을 발현하는 안정한 세포를 생성한다. 10% 소 태아 혈청 및 1% 글루타맥스TM를 함유하는 돌베코 변형 이글 배지에서 0.5 마이크로그램/mL 퓨로마이신을 사용하여 안정한 세포를 선별한다. 유동 세포측정을 위해, 융합성 부착 세포를 깁코(Gibco)® 세포 해리 완충제 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 사용하여 탈착시키고, FACS 완충제 (3% 소 태아 혈청을 함유하는 포스페이트 완충 염수)에서 4℃에서 1시간 동안 차단시킨 다음, 1 x 10⁵ 개 세포/웰의 밀도로 96-웰 둥근-바닥 플레이트로 옮긴다. 항체 A1/2, BMS20H4.9, PF83, 또는 대조군 인간 IgG1 (0.5 마이크로그램/mL에서 출발하여 FACS 완충제 중에 1:4로 희석됨)을 첨가하고 (100 마이크로리터), 세포를 4℃에서 1시간 동안 염색한다.
- [0095] FACS 완충제에서 세척한 후, 2차 항체 R-피코에리트린 접합된 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 특이적 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)를 1:200 희석으로 첨가하고, 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한다. 세포를 세척하고, 라이브/데드 세포 염색을 제조업체의 프로토콜에 따라 라이브/데드(LIVE/DEAD)® 픽서블 파 레드 데드 셀 염색 키트 (라이프 테크놀로지스)를 사용하여 수행한다. 세포를 FACS 완충제에서 세척하고, 인텔리사이트(IntelliCyt) HTFC® 스크리닝 시스템 상에서 처리한다. 유동 세포측정 데이터를 플로우조(FlowJo)® 소프트웨어를 사용하여 분석한다. 평균 형광 강도 (MFI) 비는 (실험 항체의 MFI)/(대조군 IgG의 MFI)로서 계산된다.
- [0096] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 0.5 마이크로그램/mL 농도의 항체 A1/2는 BMS20H4.9 (0.94의 MFI 비) 및 PF83 (37의 MFI 비)과 비교하여 보다 높은 153의 MFI 비를 나타낸다.
- [0097] 인간 세포에 대한 항체 A1/2 결합은 CD137 발현을 증가시킨다.
- [0098] 본원에 개시된 항체가 인간 CD137 세포 표면 수준을 조정하는 능력은 하기와 같이 결정할 수 있다. 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민TM 2000 시약 (인비트로젠TM)을 사용하여 인간 CD137 플라스미드 DNA를 인간 293 세포 (ATCC) 내로 형질감염시킴으로써 인간 CD137을 발현하는 안정한 세포를 생성한다. 10% 소 태아 혈청 및 1% 글루타맥스TM를 함유하는 돌베코 변형 이글 배지에서 0.5 마이크로그램/mL의 퓨로마이신을 사용하여 안정한 세포를 선별한다. 배지 중 300 나노몰에서 출발하는 CD137 항체를 세포와 함께 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 세포를 PBS로 세척하고, 깁코® 세포 해리 완충제를 사용하여 탈착시키고, 차가운 완충제 (1x PBS, 1% BSA, 0.09% 아지드화나트륨) 중에서 2시간 동안 동일한 CD137 항체로 염색한다. 세척 후, 세포를 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647-접합된 염소 항-인간 IgG 검출 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)로 30분 동안 염색한다. 세포를 세척하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 줌비 그린(Zombie Green) 라이브/데드 (바이올레전드(BioLegend))로 차등 표지한다. 모든 세포를 포르테사(Fortessa) X-20 상에서 처리한다. 플로우조® 소프트웨어로 분석을 수행하여 알렉사 플루오르 647의 중앙 형광 강도 (MFI)를 생성하고, 등가의 가용성 형광색소(MESF) 표준 곡선의 알렉사 플루오르 647 분자 (뱅스 래보러토리즈(Bangs Laboratories))에 대해 보정한다. MESF 값을 비처리된 염색된 대조군 (100%) 및 비처리된 이소형 염색된 대조군 (0%)에 대해 정규화시킨다.

- [0099] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 300 나노몰 농도의 항체 A1/2는 PF83 (12%)과 비교하여 CD137 수준의 증가 (21%)를 유도하는 반면, BMS20H4.9는 세포 표면 상의 CD137을 56%만큼 감소시킨다.
- [0100] 항체 A1/2의 NF-카파B 루시페라제 리포터 검정 활성화
- [0101] 본원에 개시된 항체가 NF-카파B를 활성화시키는 능력은 하기와 같이 측정할 수 있다. 제조업체의 프로토콜에 따라 리포펙타민™ 2000 시약 (라이프 테크놀로지스)을 사용하여 pGL4.32[luc2P/NF-카파B-RE/히그로] 플라스미드 DNA (프로메가(Promega))를 인간 CD137-발현 293 세포 내로 형질감염시킴으로써 이중 안정한 NF-카파B 루시페라제 리포터/인간 CD137-293 세포를 생성한다. 10% 소 태아 혈청 및 1% 글루타맥스™를 함유하는 둘베코 변형 이글 배지에서 100 마이크로그램/mL 히그로마이신 및 0.5 마이크로그램/mL 푸로마이신을 사용하여 안정한 세포를 선별한다. 세포를 써모 멀티드롭 콤비(Thermo MultiDrop Combi) 시약 분배기 (써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 5×10^3 개 세포/웰의 밀도로 384 웰 플레이트에 플레이팅하고, 37°C에서 밤새 배양한다. 항체 A1/2, BMS20H4.9, PF83, 또는 대조군 인간 IgG1을 9 마이크로몰 또는 1.33 마이크로몰에서 출발하여 플레이트 내에서 10-포인트 2배 희석으로 해밀턴 스타(Hamilton STAR)™ (해밀턴 컴퍼니)를 사용하여 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중에 희석하고, 세포로 옮긴다. 이어서, 세포를 항체와 함께 37°C에서 5.5 시간 동안 5% CO₂에서 인큐베이션한 다음, 원-글로(ONE-Glo)™ 루시페라제 검정 시스템 (프로메가™) 및 써모™ 사이언티픽 멀티드롭™ 콤비 시약 분배기를 사용하여 처리한다. 발광은 스펙트라맥스® 마이크로플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 측정하고, 데이터 분석은 진데이터 스크리너 (GeneData Screener)® (진데이터)를 사용하여 수행한다. 데이터는 하기와 같이 정규화된다: % 활성화 = [(웰 값 - 최소 대조군 중앙값)/(최대 대조군 중앙값 - 최소 대조군 중앙값)] x 100%.
- [0102] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2는 PF83 (12%의 최대 활성화)보다 더 높고 BMS20H4.9 (115%의 최대 활성화)보다 더 낮은 78%의 최대 활성을 나타낸다.
- [0103] 항체 A1/2는 T 세포-유래 인터페론-감마 생산을 촉진한다
- [0104] 본원에 개시된 항체가 T 세포-유래 인터페론-감마 (IFN-감마) 생산을 촉진하는 능력은 하기와 같이 측정할 수 있다. 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 피콜(Ficoll) 밀도 구배 원심분리 (피콜® 파크 플러스; 지이 헬스케어)에 의해 전혈 또는 류코백으로부터 분리하고, 10% 소 태아 혈청 (하이클론(HyClone))을 갖는 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute) 배지 (RPMI) (라이프 테크놀로지스)에서 성장시킨다. PBS 중 항-인간 CD3 항체 클론 HIT3a (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 96-웰 플레이트 (전형적인 범위: 2 내지 15 나노그램/웰) 상에 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션한다. 흡인 후, 웰을 PBS로 행구고, 인간 PBMC를 1.5×10^5 개 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트 상에 옮긴다. 항체 A1/2, BMS20H4.9, PF83, 또는 대조군 인간 IgG1을 10% 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI에서 80 마이크로그램/mL의 출발 농도에서 1:4 희석함으로써 제조한다. 항-인간 CD28 항체 클론 CD28.2 (바이오레전드)를 플레이트에 첨가하고 (전형적인 범위 0.2 내지 2 마이크로그램/mL), 이어서 시험 항체를 첨가하고, 가습 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 96시간 동안 인큐베이션한다. 상청액을 수집하고, 인간 IFN-감마 수준을 알앤디 시스템즈® 인간 IFN-감마 듀오세트 ELISA 키트를 사용하여 측정한다. 간략하게, IFN-감마 포획 항체를 실온에서 밤새 플레이트 상에 코팅한다 (4 마이크로그램/mL). 흡인 및 세척 후, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 차단시킨다. 샘플 상청액 및 IFN-감마 표준물을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 세척 후, IFN-감마 검출 항체 100 마이크로리터를 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 세척한다. 스트렙타비딘-HRP (100 마이크로리터의 1:40 희석물)를 실온에서 20분 동안 첨가한다. 세척 후, 20분 동안 100 마이크로리터 기질 용액을 첨가하고 이어서 50 마이크로리터 정지 용액을 첨가함으로써 플레이트를 발색시키고, 신호를 스펙트라맥스® 마이크로플레이트 판독기로 450 nm에서 측정한다. 데이터 분석은 소프트맥스 프로(SoftMax Pro) 소프트웨어 및 그래프패드 프리즘 (그래프패드 소프트웨어)을 사용하여 수행한다. 배수 유도는 샘플 평균 IFN-감마 (pg/mL)/대조군 hIgG1 평균 IFN-감마 (pg/mL)로서 계산된다.
- [0105] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2는 IFN-감마 시토카인 생산에 의해 측정시 CD3/CD28 공동-자극에 의한 인간 PBMC의 준최적 활성화를 증진시킨다. 이와 관련하여, 5 마이크로그램/mL의 항체 A1/2를 사용한 처리는 IFN-감마의 생산에서 PF83 (1.6배 증가)보다 더 높고 BMS20H4.9 (9.4배 증가)보다 더 낮은 3.8배 증가를 생성한다.
- [0106] 항체 A1/2 고체-상 결합 검정

[0107] ELISA 검정을 사용하여 인간 C1q에 대한 항체 A1/2의 결합을 측정할 수 있다. 항체 A1/2 및 대조군 항체 (음성 대조군 IgG1)를 PBS 중에 연속 희석시키고, 4℃에서 밤새 ELISA 플레이트 상에 코팅한다. 카세인 완충제 중 인간 C1q를 10 밀리그램/mL의 농도로 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 항-인간 C1q-HRP (AbD 세로텍 인크.(AbD Serotec Inc.), 1:200 희석물)와 함께 1시간 동안 인큐베이션함으로써 인간 C1q를 검출하고, 플레이트를 TMB (KPL, 인크.)를 사용하여 발색시킨다. 시너지 네오2 하이브리드 다중-모드 판독기 (바이오텍 (BioTek)®)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

[0108] FcγRI, FcγRIIa(H), FcγRIIb, FcγRIIIa(F), 및 FcγRIIIa(V)에 대한 항체 A1/2의 결합은 MSD 검정 (메소 스케일 다이아그노스틱스(Meso Scale Diagnostics))를 사용하여 결정된다. 간략하게, Fcγ 수용체를 메소 스케일 플레이트 상에 밤새 코팅하고, 연속 희석된 시험 항체를 플레이트에 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션한다. 항체 A1/2를 항-인간 2차 항체 (메소 스케일 다이아그노스틱스, D20TF-6)를 사용하여 검출하고, 플레이트를 판독 완충제 T (메소 스케일 다이아그노스틱스, R92TC-1)로 발색시킨다. 발광을 섹터 이미저(SECTOR Imager) 2400 (메소 스케일 다이아그노스틱스) 상에서 측정하고, 데이터를 그래프패드 프리즘 7.0 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[0109] 표 3

항체	FcγRI (EC ₅₀ nM)	FcγRIIa(H) (EC ₅₀ nM)	FcγRIIb (EC ₅₀ nM)	FcγRIIIa(F) (EC ₅₀ nM)	FcγRIIIa(V) (EC ₅₀ nM)	인간 C1q (EC ₅₀ nM)
항체 A1/2	>5*	>134*	>134*	>134*	>134*	>330*
양성 대조군 IgG1 (무손상 Fc 수용체 이펙터 기능성)	0.8	93.7	>134*	19	6.2	8.9

[0110]

[0111] *시험된 항체의 최대 농도를 나타냄

[0112] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2는 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIa, 또는 C1q에 결합하지 않았다 (상기 표 3에 제시된 바와 같음). 다른 실험에서, 항체 A1/2는 세포-기반 항체-의존성 세포성 세포독성 및 보체-의존성 세포독성 검정에서 검출가능한 이펙터 기능을 나타내지 않았다.

[0113] 확립된 종양 모델에서의 항체 A1/2의 항종양 효능

[0114] HCC827 인간 비소세포 폐암 (ATCC) 종양 세포주를 그의 각각의 배지에서 유지시키고, 이식을 위해 수거한다. 종양 세포 (마우스당 1×10^7 개 세포)를 7주령의 암컷 NOD/SCID 감마 (NSG) 마우스 (잭슨 래보러토리즈)의 우측 측복부에 피하로 주사한다. 종양이 대략 350 mm^3 내지 450 mm^3 의 크기에 도달할 때, 마우스를 5 내지 8개의 군으로 무작위화한다. 인간 PBMC를 디나비즈(Dynabeads)® 인간 T-확장자 CD3/CD28 비드 (썸모 피셔 사이언티픽)와 함께 9 내지 10일 동안 자극함으로써 인간 확장된 T 세포를 생성하고, banking한다. 인간 PBMC (NY 혈액 센터)를 섹메이트(SepMate) 튜브 (스템셀 테크놀로지스(STEMCELL Technologies))에서 피콜® 파크 플러스 상에서 원심분리함으로써 제조하고, banking한다. 확장된 T 세포를 해동시키고, 1×10^6 개 세포를 마우스에 주사한다. 대조군으로서, 일부 마우스에서 종양 세포를 단독으로 T 세포 또는 PBMC 없이 이식한다. 처리는 제0일 또는 제1일에 시작한다. 처리군은 대조군 IgG, BMS20H4.9, PF83, 및 항체 A1/2를 포함한다. 4주 동안 매주 1회 10 mg/kg의 항체를 복강내 주사를 통해 동물에게 투여한다. 체중 (BW)을 1주 2회 기록하고, BW의 퍼센트 변화를 하기 식을 사용하여 계산한다: $(\text{관찰일의 BW} - \text{개시일의 BW}) / \text{개시일 BW} \times 100\%$. 종양 부피를 전자 캘리퍼를 사용하여 1주에 2회 측정한다. 종양 부피는 하기 식을 사용하여 계산한다: 종양 부피 (mm^3) = $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭}^2$. %T/C는 기하 평균 값이 $\Delta T > 0$ 인 경우 식 $100 \times \Delta T / \Delta C$ 를 사용하여 계산한다. ΔT = 연구의 관찰일에서의 약물-처리군의 평균 종양 부피 - 투여의 개시일에서의 약물-처리군의 평균 종양 부피; ΔC = 연구의 관찰일에서의 대조군의 평균 종양 부피 - 투여의 개시일에서의 대조군의 평균 종양 부피. 종양 부피 데이터의 통계적 분석은 SAS 소프트웨어 (버전 9.2)에서 MIXED 절차를 사용하여 시간 및 처리에 의한 이원 반복 측정 분석으로 수행한다.

[0115] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2로 처리된 마우스는 PF83 (T/C% = 81.2) 및 BMS20H4.9 (T/C% = 96.9)로 처리된, 억제를 나타내지 않은 마우스와는 대조적으로, 유의한 종양 성장 억제를 입증하였다 (T/C% = 30.6; P < 0.001).

[0116] 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2에 대한 동역학/친화도 결과

[0117] 비아코어 T200 기기를 사용하여 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2에 대한 고정화된 인간 CD137-Fc 결합의 동역학을 측정할 수 있다. 재조합 인간 세포의 CD137-Fc 단백질 (알앤디 시스템즈)을 CM5 센서 칩에 아민 커플링을 통해 공유결합으로 고정시킨다 (지이 헬스케어). CD137 항체 검사를 HBS-EP+ 완충제 중 30 마이크로리터/분의 유량으로 수행한다. 샘플을 25°C에서 다양한 농도로 주입하고 측정치를 얻는다. 각각의 샘플 주입 후에 24초 동안 30 마이크로리터/분의 유량의 10 밀리몰 글리신-HCl pH2.0을 사용하여 표면을 재생시킨 다음, 10초 동안 완충제로 안정화시킨다. 0.123 나노몰 내지 30 나노몰 범위 농도의 센소그램을 비아코어 T200 소프트웨어를 사용하여 평가한다. 회합 (K_a) 및 해리 (K_d) 속도 상수의 계산은 1:1 랭뮤어 결합 모델 피트에 기초한다. 평형 해리 상수 (K_D) 또는 결합 친화도 상수는 동역학적 속도 상수의 비 K_d/K_a로부터 계산된다.

[0118] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2는 표 4에 예시된 동역학 및 친화도 상수로 인간 CD137에 결합한다.

[0119] 표 4

항체	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)	R _{max}	Chi ²
항체 A2	1.33E+06	7.13E-03	5.36E-09	23.10	0.247
항체 A1	1.61E+06	5.36E-03	3.33E-09	22.76	0.355
항체 A1/2	1.52E+06	7.11E-03	4.67E-09	20.86	0.303

[0120]

[0121] 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2를 비교하는 NF-카파B 루시페라제 리포터 검정

[0122] 본원에 개시된 항체가 NF-카파B를 활성화시키는 능력은, 항체 희석물을 PBS 중에서 제조하고 10-포인트 2배 희석물을 9 마이크로몰에서 출발하여 플레이트 내에서 제조하는 변형 하에, 이전에 본원에 기재된 바와 같이 측정할 수 있다.

[0123] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2 (70.5%의 최대 활성)는 항체 A1 (63.4%의 최대 활성) 및 항체 A2 (72.3%의 최대 활성)와 비교하여 유사한 최대 활성을 나타내었다.

[0124] 항체 A1 및 항체 A2는 T 세포-유래 인터페론-감마 생산을 촉진한다

[0125] 본원에 개시된 항체가 T 세포-유래 인터페론-감마 (IFN-감마) 생산을 촉진하는 능력은 이전에 본원에 기재된 바와 같이 측정할 수 있다. 본질적으로 본원에 기재된 바와 수행된 실험에서, 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2는 IFN-감마 시토카인 생산에 의해 측정시 CD3/CD28 공동-자극에 의한 인간 PBMC의 준최적 활성화를 증진시킨다. 이와 관련하여, 5 마이크로그램/mL의 항체 A1/2를 사용한 처리는 IFN-감마의 생산에서 항체 A1 (3.5배 증가) 및 항체 A2 (3.5배 증가)와 대등한 3.1배 증가를 생성한다.

[0126] 확립된 종양 모델에서의 항체 A1 및 항체 A2의 항종양 효능

[0127] 본원에 개시된 항체가 마우스에서 종양 성장을 억제하는 능력은 이전에 본원에 기재된 바와 같이 측정할 수 있다.

[0128] 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1, 항체 A2, 및 항체 A1/2는 HCC827 확립된 종양 모델에서 종양 성장을 억제한다. 항체 A1/2 (T/C% = 47.1%; P < 0.001)를 사용한 처리는 항체 A1 (T/C% = 56.0%; P < 0.001) 및 항체 A2 (T/C% = 48.7%; P < 0.001)와 유사한 종양 성장 감소를 나타낸다.

[0129] X선 결정학을 통해 결정된 항체 A1의 에피토프

- [0130] 항체 A1-Fab를 12 mL 캡처셀렉트(CaptureSelect) IgG-CH1 친화성 매트릭스를 사용하여 293HEK 세포 상청액으로부터 정제한다. SDS-PAGE 및 분석용 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 정제된 항체 A1-Fab의 순도 및 품질을 다룬다. 이러한 매트릭스의 용리된 물질을 1X 트리스-완충 염수 (TBS)로 완충제 교환한다. hCD137* (* (인간 CD137 아미노산 22-161, ΔC121S)-AAA-6His)를 Ni 세파로스® 엑셀 칼럼, Ni-NTA 칼럼, 및 SEC 칼럼을 이용하는 3 단계로 293HEK 상청액으로부터 정제한다. 간략하게, 2 리터의 상청액을 임의의 완충제 교환 없이 Ni 세파로스 엑셀 칼럼 내로 직접 로딩한다. 이 단계의 용리액을 PBS로 완충제 교환하고, Ni-NTA 중력 유동 칼럼을 사용하여 추가로 정제한다. 이 단계의 용리액을 추가로 정제하고, 정제용 SEC 칼럼을 사용하여 1X TBS로 완충제 교환한다. 제1 Ni 세파로스 엑셀 단계로부터의 통과액은 유의한 양의 hCD137*를 함유한다. 이어서, 이를 Ni 세파로스 엑셀 칼럼에 재로딩하고, 이어서 Ni-NTA 및 정제용 SEC 칼럼에 재로딩한다. SDS-PAGE를 사용하여 그의 순도에 기초하여 hCD137* 분획을 풀링한다. hCD137*의 농도는 14.5 밀리그램/mL이고, 항체 A1-Fab의 농도는 7.5 밀리그램/mL이다.
- [0131] 항체 A1-Fab:CD137* 복합체를 1:1 몰비로 합한 다음, 20 밀리몰 트리스 pH 8.0, 100 밀리몰 염화나트륨 중에 사전-평형화시킨 겔 여과 칼럼에 적용한다. 생성된 복합체를 12.5 밀리그램/mL로 농축시킨다. 여과 후, 항체 A1-Fab:CD137 복합체를, 21°C 및 8°C 둘 다에서 포에닉스(Phoenix) 액체 핸들러를 사용하여 시팅 드롭 플레이트에서 회박 매트릭스 결정 스크리닝 조건 하에 1:1 비로 설정한다. 대형 프리즘-유사 결정을 21°C에서 1 몰 시트르산삼나트륨 pH 6.5에서 4일 내에 단일 조건 하에 성장시킨다. 결정을 수거하고, 20% 글리세롤 및 저장소 조건에서 동결-보호하고, 장착하고, 액체 질소 내에서 급속-동결시킨 다음, 아르곤 국립 연구소의 어드밴스드 포토 소스(Advanced Photo Source)를 사용하여, 샘플을 X선 스크리닝하고, 데이터를 수집한다. 항체 A1-Fab/hCD137* 데이터를 프로그램의 CCP4 스위트를 사용하여 2.4 Å으로 처리한다 (Winn, M.D. et al. Acta. Cryst. 2011: D67, 235-242). 결정은 공간군 P3₁21에 속하고, 셀 파라미터는 a=b=124.9 Å, b=112.7 Å, α=β=90° 및 γ=120°이다. 구조는 탐색 모델로서 내부 Fab 구조를 사용하여, 프로그램 페이저(Phaser)에서 분자 대체에 의해 결정된다 (McCoy, A.J. et al. J. Appl. Cryst. 2007 40: 658-674). Fab에 대한 분자 대체 해석을, 레프맥(Refmac) (Winn, M.D. et al. Acta. Cryst. 2011: D67, 235-242; Murshudov, G.N. Act. Cryst. 2011: D67, 355-367) 및 버스터(Buster) (Bricogne, G. et al. 2016; Buster Version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.)를 사용하여 정밀화한다. 정밀화로부터의 맵을 사용하여 CD137에 대한 모델을 프로그램 COOT를 사용해 수동으로 구축한다 (Emsley, P. Acta Cryst. 2010: D66, 486-501). 정밀화된 R-인자는 R=17.8%, Rfree=20.5%이다.
- [0132] 본질적으로 본 검정에 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1-Fab:hCD137* 복합체를 분해하고, 에피토프/파라토프를 하기 표 5에 설명한다. 표 5는 hCD137* 상의 열거된 잔기의 6Å 이내에 있는 항체 A1-Fab 상의 잔기를 열거한다. 항체 A1-Fab의 중쇄는 hCD137*와 57개의 접촉 (컷오프 6 Å)을 갖는 반면, 경쇄는 18개의 접촉 (컷오프 6 Å)을 갖는다.

[0133] 표 5

인간 CD137 (에피토프)	항체 A1 중쇄 (파라토프)	항체 A1 경쇄 (파라토프)
S55	Q62	--
Q59	Q62	--
D63	Q62	--
R66	F55	--
F72	F55	--
H93	T103	--
C94	T102, T103, A104, P105	--
L95	M101, T102, T103, P105, G106, T107	--
G96	L100, M101, T102, T103, P105, G106, T107	G92, N93
A97	M101, T102, P105, G106, T107	G92, N93, S94, F95, L97
G98	P105	G92, N93, S94, F95
C99	P105	--
S100	I52, F55, N59, M101, P105, T107	F95
M101	S31, I52, I54, F55, M101	--
C102	F55	--
E103	T103	--

[0134]

L112	T103	--
T113	T103	--
K114	M101, T102, T103, A104	D51, D54
K115	L100, M101, T102, T103, D110	F50, E56, T57
G116	M101, T102, T103	F50

[0135]

[0136] 항체 A1/2는 CD137/CD137-리간드 상호작용을 완전히 차단한다

[0137] 본원에 개시된 항체가 인간 CD137 및 CD137-리간드 (이하에서, CD137L) 상호작용을 차단하는 능력은 ELISA 검정

으로 측정할 수 있다. 먼저, ELISA 검정을 이용하여 hCD137L* 및 항체 A1/2, BMS20H4.9 및 PF83에 대한 hCD137** (인간 CD137 아미노산 22-164, ΔC121S)-AAA-FLAG의 결합 EC₅₀를 정량화한다. 96 웰 이플론(Immulon)® 4HBX ELISA 플레이트의 웰을 4℃에서 온화한 교반 하에 100 마이크로리터의 PBS, pH7.2 중에서 50 나노그램의 hCD137**로 밤새 코팅한다. PBST 중 5% BSA로 차단하고 세척한 후, His-태그부착된 재조합 인간 CD137L (이하에서 hCD137L*로 지칭됨) (알앤디 시스템즈)의 5배 희석물 시리즈 (392 나노몰- 0.005 나노몰), BMS20H4.9 (53-0.00068 나노몰), PF83 (107-0.0014 나노몰), 또는 항체 A1/2 (53-0.00068 나노몰)를 각각의 희석물을 이중으로 수행하면서 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 온화한 교반 하에 인큐베이션한다. 이어서, 항-CD137 항체로 처리한 웰을 세척하고, HRP-접합된 염소 항-Fab 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)의 1:10000 희석물을 첨가하고, 표준 프로토콜에 따라 실온에서 인큐베이션한다. 이어서, hCD137L*로 처리한 웰을 세척하고, HRP-접합된 마우스 항-His 항체 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)®)의 1:5000 희석물을 첨가하고, 플레이트를 표준 프로토콜에 따라 실온에서 인큐베이션한다. 신호의 가시화 및 검출을 위해 TMB 퍼옥시다제 기질 및 정지 용액을 제조업체의 지침서에 따라 사용한다. 흡광도 판독을 그래프패드 프리즘 소프트웨어 버전 6에서 플롯팅한다. EC₅₀ 값은 소프트웨어의 한 부위 - 특이적 결합 함수의 비선형 회귀 곡선 피트 분석에 의해 계산된다. 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, hCD137**에 대한 결합 친화도 (EC₅₀)는, hCD137L에 대해 0.6 나노몰, 항체 1/2에 대해 1.4 나노몰, BMS20H4.9에 대해 0.43 나노몰, 및 PF83에 대해 10 나노몰 초과로 결정된다.

[0138] hCD137**에 대한 결합에 대해 hCD137L*가 BMS20H4.9, PF83, 및 항체 A1/2와 경쟁하는 능력은 하기와 같이 결정할 수 있다. 96-웰 이플론 4HBX ELISA 플레이트를 4℃에서 온화한 교반 하에 100 마이크로리터의 PBS, pH 7.2 중에서 50 나노그램의 hCD137**로 밤새 코팅한다. 차단하고 (PBST 중 5% BSA 사용) 세척한 후, hCD137L*의 5배 희석물 (196 내지 0.0025 나노몰)을 포화 양의 지정된 항체: 항체 A1/2 (200 나노그램/웰), BMS20H4.9 (3 나노그램/웰), 또는 PF83 (1000 나노그램/웰)과 혼합한다. 이어서, 혼합물을 웰에 이중으로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 온화한 교반 하에 인큐베이션한다. 세척 후, 플레이트를 표준 프로토콜에 따라 실온에서 HRP-접합된 염소 항-Fab 항체 (1:1000 희석물, 잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)와 함께 인큐베이션한다. 신호의 가시화 및 검출을 위해 TMB 퍼옥시다제 발색원성 기질 및 정지 용액을 제조업체의 지침서에 따라 사용한다.

[0139] CD137에 결합된 채로 있는 mAb의 백분율을 플롯팅하고, IC₅₀ 값을 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 곡선 피트 분석에 의해 계산한다. 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, hCD137L*는 0.401 나노몰의 IC₅₀으로 hCD137**에 대한 항체 A1/2의 결합을 완전히 차단한다. hCD137L*는 또한 1.037 나노몰의 IC₅₀으로 hCD137**에 대한 PF83의 결합을 차단한다 (30% 결합 신호가 표면 상에 남아있음). hCD137**에의 BMS20H4.9의 결합에 대한 hCD137L*의 측정가능한 효과가 존재하지 않는다.

[0140] 항체 A1/2는 BMS20H4.9 및 PF83과는 다르게 특정 아미노산 잔기에서 인간 CD137에 결합한다

[0141] 인간 CD137 점 돌연변이를 도입하여 항체 A1/2, BMS20H4.9, 및 PF83이 인간 CD137에 결합하는 아미노산 잔기를 결정한다. 상업적으로 입수가능한 부위 지정 돌연변이유발 키트 (퀵체인지(Quickchange) II 키트, 퀴아젠(Qiagen))의 표준 프로토콜을 사용하여 CD137-Fc 돌연변이체를 생성한다. 야생형 및 돌연변이체 CD137-Fc 단백질 발현시키고 정제한다. 여기서 보고되는 모든 돌연변이체는 야생형 CD137-Fc와 유사한 크기 배제 프로파일을 갖는다 (즉, 도입된 돌연변이는 단백질의 구조적 완전성을 손상시키지 않음). 항체의 결합에 대한 돌연변이의 영향을 결정하기 위해, CD137-Fc 야생형 및 돌연변이체에 대한 포인트 ELISA 검정이 이용된다. 96-웰 이플론 4HBX ELISA 플레이트의 웰을 4℃에서 온화한 교반 하에 100 마이크로리터의 PBS, pH 7.2 중에서 50 나노그램의 인간 CD137-ECD-C121S-Fc 또는 그의 돌연변이체로 밤새 코팅한다. 차단하고 (PBST 중 5% BSA 사용) 세척한 후, 지정된 항체의 5배 희석물 8-포인트 시리즈 (100 - 0.00128 나노몰)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 온화한 교반 하에 인큐베이션한다. 웰을 세척하고, HRP-접합된 2차 항체 (HRP-접합된 염소 항-Fab 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)의 1:10000 희석물)를 첨가하고, 표준 프로토콜에 따라 실온에서 인큐베이션한다. 신호의 가시화 및 검출을 위해 TMB 퍼옥시다제 발색원성 기질 및 정지 용액을 제조업체의 지침서에 따라 사용한다. 각각의 농도 포인트에 대한 흡광도 판독물은 야생형 상호작용의 흡광도에 의해 정규화된다. 각각의 돌연변이체에 대해, 8개 농도에 대한 정규화된 비의 평균이 결정된다.

[0142] 돌연변이를 하기 위치에서 인간 CD137 (서열식별번호: 1)에 개별적으로 도입하였다: P27, N42, D63, Q67, A97, G98, S100, M101, Q104, K114, K115, R130, I132, R134. 표 6은 인간 CD137의 제시된 돌연변이체에 대한 BMS20H4.9 및 항체 A1/2의 결합 프로파일을 입증한다. 표 7은 인간 CD137의 제시된 돌연변이체에 대한 PF83 및

항체 A1/2의 결합 프로파일을 입증한다. 집합적으로, 표 6 및 7은 항체 A1/2가 BMS20H4.9 및 PF-83과 비교하여 인간 CD137 상에서 특유의 아미노산 잔기에 결합한다는 것을 입증한다.

표 6

	BMS20H4.9 (야생형 hCD137에 비한 결합의 %)	항체 A1/2 (야생형 hCD137에 비한 결합의 %)
P27L*	85	100
N42S*	0	100
D63N	100	100
Q67R	100	100
Q67V	100	100
A97P	100	15
G98K	100	85
G98Q	100	100
S100T	100	100
M101R	100	100
Q104K	100	100
K114E	100	20
K115Q	100	25

*6Å에서 X선 결정학을 통해 결정시 항체 A1/2의 에피토프 외부에 있는 위치를 나타냄

표 7

	항체 A1/2 (야생형 hCD137에 비한 결합의 %)	PF83 (야생형 hCD137에 비한 결합의 %)
K115Q	25	100
R130A*	100	100
R130H*	100	100
I132V*	100	100
R134Q*	100	25

*6Å에서 X선 결정학을 통해 결정시 항체 A1/2의 에피토프 외부에 있는 위치를 나타냄

인간 종양에서의 CD137 유전자 발현

인간 종양 면역 침윤물에서의 CD137 유전자 발현 프로파일은 더 캔서 게놈 아틀라스(The Cancer Genome Atlas) (TCGA) 데이터베이스 및 컴퓨터 방법을 사용하여 분석할 수 있다. 간략하게, CD137/CD3e의 발현 비를 오믹소프트(Omicsoft) 선별된 TCGA RNASeq 결과로부터 생성한다. 동일한 조직의 종양 샘플 및 인접한 정상에서의 CD137/CD3e의 발현 비를 비교하기 위해, t-검정을 수행하고, 코헨 d를 각각의 종양 유형에 대해 계산한다. 종양 대 정상의 발현 비의 t-검정에서 < 0.05의 P 값을 갖고 코헨 d > 0.8의 큰 효과 크기를 갖는 종양 유형이 통계적으로 유의하다. 종양 대 정상 조직에서의 CD137/CD3e의 발현 비의 차이는 로그 배수 변화 (logFC)로서 계산된다.

기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 방광암 및 두경부암을 포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 암 유형에 걸쳐, 증가된 종양 CD137/CD3 비가 관찰된다 (표 8). CD137⁺ 림프구가 풍부한 종양은 항체 A1, 항체 A2 또는 항체 A1/2를 사용하는 CD137 항체 요법에 대한 후보이다.

[0152] 표 8

암	CD137/CD3 발현 비 (logFC)	P 값
방광	1.92	3.85E-03
유방	2.46	3.56E-39
담관암종	1.78	4.81E-06
결장	2.36	1.23E-19
자궁내막	2.14	4.01E-15
식도	1.07	1.71E-04
위	1.68	9.27E-10
두경부	1.90	8.06E-15
폐 선암종	1.37	2.63E-13
폐 편평 세포 암종	1.63	2.37E-13
전립선	1.04	2.73E-04
직장	1.62	1.40E-05
갑상선	1.24	2.29E-06

[0153]

[0154] 항체 A1/2는 생체내 CD3⁺ T 세포 종양 침윤을 증가시킨다

[0155] 본원에 개시된 항체가 인간화 마우스 모델에서 T 세포 종양 침윤을 변경시키는 능력은 면역조직화학 (IHC)에 의해 결정할 수 있다. 간략하게, L55 인간 비소세포 폐암 세포 (L55-CBG-2A-GFP, 펜실베이니아 대학교)를 NSG 마우스에 이식한다. 종양이 250-300 mm³ 크기에 도달할 때, 인간 PBMC (8 x 10⁶개 세포)를 주입하고, 항체를 4주 동안 매주 1회 10 밀리그램/kg으로 투여한다. 연구 종료시에, 종양을 포르말린에서 수집하고, 파라핀으로 처리하고, 절편화하고, 항-CD3 항체 (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology))로 염색한다. 영상을 아페리오(Aperio) XT 스캔스코프(ScanScope)®를 사용하여 200X 배율로 획득하고 반-정량적으로 분석한다. 총 종양 세포에 대한 CD3 양성 세포의 백분율은 아페리오 이미지스코프 소프트웨어를 사용하여 계산된다. 결과를 일원 ANOVA에 의해 비교하고, 이어서 다중 비교를 위해 홀름-시닥법으로 비교한다 (시그마 플롯 12.5, 시스타트 소프트웨어(Systat Software)).

[0156] 상기 기재된 바와 같이 수행된 실험에서, 항체 A1/2는 L55 확립된 종양에서 CD3⁺ T 세포 종양 침윤을 유도한다. 항체 A1/2에 반응하는 CD3⁺ T 세포의 백분율 (60%)은 BMS20H4.9 (18%) 또는 인간 IgG (27%) 처리와 비교하여 더 높다.

아미노산 및 뉴클레오티드 서열

SEQ ID NO: 1 (인간 CD137)

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQ
ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPAD
LSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLRFSVVKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 2 (HCDR1)

KASGGTFSSYAIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3)

ARDLMTTAPGTYFDL

SEQ ID NO: 5 (LCDR1)

QASQDIGNSLG

SEQ ID NO: 6 (LCDR2)

FDASDLET

SEQ ID NO: 7 (LCDR3)

QQGNSFPLT

SEQ ID NO: 8 (HCVR)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYF
DLWGRGTLVTV

SEQ ID NO: 9 (항체 A1 의 LCVR)

[0157]

AIRMTQSPPSLASVGDRTTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 10 (HC)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYF
DLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (항체 A1 의 LC)

AIRMTQSPPSLASVGDRTTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 (항체 A2 의 LCVR)

IRMTQSPPSLASVGDRTTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETG
VPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 13 (항체 A2 의 LC)

IRMTQSPPSLASVGDRTTITCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLETG
VPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14 (HC 의 DNA)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCC
CTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA
TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTGATGACTACGGCCC
CTGGGACGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCACTGACCAGCGCGCTGCACACCT

[0158]

TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA
CCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCC
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAATG
A

SEQ ID NO: 15 (항체 A1 의 LC 의 DNA)

ATGAGGCTGCTGCCTCTGCTGGCCCTCCTGGCCCTGTGGGGCCCAGACCCAGC
CAGAGCCGCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTT
AGGTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAACTCGTGATCTTCGAT
GCATCAGATCTGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTG
GCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACT
TACTATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACG
ACTGGAGATTAACGAACAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 16 (항체 A2 의 LC 의 DNA)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTC
CACCGGCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGG
TTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCA
TCAGATCTGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTAC
TATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACT
GGAGATTAACGAACAGTGTGGCCGACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG

[0159]

GTAACCTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 17 (항체 A1/2 의 LC 의 DNA)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTC
CACCGGCGCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTT
AGGTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAACTCGTGATCTTCGAT
GCATCAGATCTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTG
GCACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACT
TACTATTGTCAACAGGGTAACAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACG
ACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 18 (BMS20H4.9 의 HC)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHG
GYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWYF
DLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 19 (BMS20H4.9 의 LC)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPTFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIKRTV
AAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20 (PF83 의 HC)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPG
DSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQ

GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC
VECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
METDTLLLWVLLLWVPGSTGAIRMTQSPPSLSASVGDRTITCQASQDIGNSLGW
YQQKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTSLTISSLQPEDFATYYCQQG
NSFPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGECNNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 (PF83 의 LC)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0161]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> ANTI-CD137 ANTIBODIES

<130> X21288

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn

1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp

50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu

65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp

85

90

95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro

100

105

110

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

115

120

125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro

130

135

140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His

145

150

155

160

Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu

165

170

175

Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg

180

185

190

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro

195

200

205

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu

210

215

220

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

225

230

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1

5

10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser Leu Gly

1 5 10

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile
35 40 45
Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 10
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Leu Met Thr Thr Ala Pro Gly Thr Tyr Phe Asp Leu Trp

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145

150

155

160

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

165

170

175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180

185

190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195

200

205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

210

215

220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275

280

285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290

295

300

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

305

310

315

320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser

325

330

335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

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

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

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

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

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

65						70						75						80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Ser	Phe	Pro	Leu				
					85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala				
					100					105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly				
					115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala				
					130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln				
145					150					155					160				
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser				
					165					170					175				
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr				
					180					185					190				
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser				
					195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys														
210																			
<210>	12																		
<211>	106																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	Synthetic Construct																		
<400>	12																		
Ile	Arg	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp				
1				5				10				15							
Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu				
					20					25					30				
Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Phe				
					35					40					45				

Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 13
 <211> 213
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 13
 Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser Leu
 20 25 30
 Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val Ile Phe
 35 40 45
 Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 14

<211> 1359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctctctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

ccctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tcttttgttac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 atgactacgg cccttgggac gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc actgaccagc ggcgtgcaca ccttcccgcg tgctctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaa cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
 gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaagccgag 720
 ggggcaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 780
 accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
 aactggtatg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccaaga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc catcctccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca agtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctattcca agtcaccgt ggacaagagc 1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggcaaatga 1359

<210> 15

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

atgaggctgc tgctctgct ggccctcctg gccctgtggg gccagaccc agccagagcc 60

gccatccgga tgaccagtc tccacctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120

atcacttgcc aggcgagta ggacattggc aactctttag gttggtatca gcagaaacca 180

gggaaagccc ctaaactcgt gatcttcgat gcatcagatc tggaacagg ggtcccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttcagtctca ccatcagcag cctgcagcct 300

gaggattttg caacttacta ttgtcaacag ggtaacagtt tcccgtctac cttcggccaa 360

gggacacgac tggagattaa acgaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 16

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ctccaccggc 60

atccggatga cccagtctcc accctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc 120

acttgccagg cgagtcagga cattggcaac tctttaggtt ggtatcagca gaaaccaggg 180

aaagccccta aactcgtgat cttcgaatga tcagatctgg aaacaggggt cccatcaagg 240

ttcagtgcca gtggatctgg cacagatttc agtctacca tcagcagcct gcagcctgag 300

gattttgcaa cttactattg tcaacagggt aacagtttcc cgctcacctt cggccaaggg 360

acacactgg agattaaacg aactgtggcc gcaccatctg tcttcattct cccgccatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 660

agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 17

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ctccaccggc 60

gccatccgga tgaccagtc tccaccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120

atcacttgcc aggcgagtca ggacattggc aactcttttag gttggtatca gcagaaacca 180

gggaaagccc ctaaactcgt gatcttcgat gcatcagatc tggaacagg ggtcccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttcagtctca ccatcagcag cctgcagcct 300

gaggattttg caacttacta ttgtcaacag ggtaacagtt tcccgtcac cttcggccaa 360

gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 705

<210> 18

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

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

195 200 205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290

295

300

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

305

310

315

320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420

425

430

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

435

440

445

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 20

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 20

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe

180

185

190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 290 295 300

 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 21

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195	200	205
Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210		