



등록특허 10-2270618



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월30일

(11) 등록번호 10-2270618

(24) 등록일자 2021년06월23일

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

(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7013665

(22) 출원일자(국제) 2013년10월30일

심사청구일자 2018년10월24일

(85) 번역문제출일자 2015년05월22일

(65) 공개번호 10-2015-0079787

(43) 공개일자 2015년07월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/067583

(87) 국제공개번호 WO 2014/070934

국제공개일자 2014년05월08일

(30) 우선권주장
61/720,289 2012년10월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
WO2012149356 A2
WO2003040170 A2
LI FUBIN et al., SCIENCE, vol. 333, no. 6045,
(2011.08.19.)

(73) 특허권자
아멕시젠, 인코포레이티드

미국, 캘리포니아 94070, 샌 카를로스, 스위트
씨, 75 쇼어웨이 로드

(72) 발명자
장, 용케
미국, 캘리포니아 94303, 팔로 알토, 119 스톡턴
플레이스

유, 구오-리양
미국, 캘리포니아 94010, 힐스버러, 1025 토너먼트
드라이브

주, 웨이민
미국, 캘리포니아 94122, 샌프란시스코, 1870 40
번 애비뉴

(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 15 항

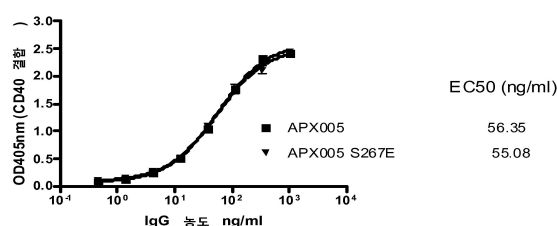
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 항-CD40 항체 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은, 암 및 기타 질환을 치료하기 위한 임의의 다양한 치료방법에 사용될 수 있는, 고친화성 항-CD40 모노클로날 항체 및 관련된 조성물을 제공한다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,
인간 CD40에 결합하고,

(i) 서열번호 3에 제시된 VHCDR1 영역, 서열번호 4에 제시된 VHCDR2 영역 및 서열번호 5에 제시된 VHCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역; (ii) 서열번호 6에 제시된 VLCDR1 영역, 서열번호 7에 제시된 VLCDR2 영역 및 서열번호 8에 제시된 VLCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (iii) EU 넘버링에 의해 정의되는 S267E 돌연변이에 의해 변형된 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 196, 197, 199 및 202 중 하나 이상에 제시된 CD40 에피토프에 결합하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호 202에 제시된 CD40 에피토프에 결합하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체가 인간화된 것인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체가 힌지 영역이 결여된 일가 항체인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체가 전체 항체(whole antibody)인, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인간 IgG1 Fc 영역이 인간 IgG1 CH1 도메인을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제6항 및 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제11항의 백터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 13

생리학적으로 허용되는 담체, 및 제1항 내지 제6항 및 제9항 중 어느 한 항에 따른 치료학적 유효량의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 암의 증상을 치료하거나 개선하기 위한 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암이 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 리툭시맵 내성 백혈병으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 리툭시맵 내성 NHL인, 조성물.

청구항 16

생리학적으로 허용되는 담체, 및 제1항 내지 제6항 및 제9항 중 어느 한 항에 따른 치료학적 유효량의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 자가면역 질환의 증상을 개선하기 위한 조성물.

청구항 17

생리학적으로 허용되는 담체, 및 제1항 내지 제6항 및 제9항 중 어느 한 항에 따른 치료학적 유효량의 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 환자의 염증 질환 증상을 개선하기 위한 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은, 2012년 10월 30일자로 제출된 미국 가출원번호 제61/720,289호를 우선권으로 주장하고, 이들 특허원은 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.

- [0003] 서열 목록에 관한 진술
- [0004] 본원과 관련된 서열 목록은 서류 사본을 대신하여 텍스트 포맷으로 제공되고, 이에 의해 명세서에 참조로서 도입된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 APEX-016_01WO_ST25.txt이다. 이 텍스트 파일은 92 kB이고, 2013년 10월 30일에 작성되었으며, EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다.
- [0005] 기술 분야
- [0006] 본 발명은 일반적으로 항-CD40 항체, 조성물 및 이의 사용방법에 관한 것이다. 이러한 항체는, 예를 들면, 다양한 종양 질환을 치료하는 방법에 유용하다.

배경 기술

- [0007] 다수의 백혈병 및 림프종은 B-계열 세포의 악성 형질전환으로부터 기원한다. 세포 표면 B-계열-제한된 항원, 예를 들면, CD20의 발현은 이를 항체 치료를 위한 매력적인 표적으로 되게 한다. 항체 치료학은 비-호지킨 림프종(NHL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 갖는 환자의 관리를 현격히 변화시켰다. 리투시맵의 승인 이래로, 항체 단독 또는 화학요법과 조합된 항체는 반응 속도, 장기간 성과 및 삶의 질을 현저히 개선시켰다[참조: Chinn P, Braslawsky G, White C, et al. Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. Cancer Immunol Immunother 2003; 52:257-280.; Rastetter W, Molina A, White CA. Rituximab: Expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases. Annu Rev Med 2004; 55:477-503]. 그러나, 상당 수의 환자는 리투시맵에 대한 주요 또는 획득 내성을 나타내고, 이는 CD20을 표적화하는 현재의 방법들이 임상적 성과에서 제한을 갖고 독특한 작용 메카니즘, 예를 들면, 항-CD40 mAb, APX005를 갖는 B 세포 림프종 및 백혈병에 대한 신규한 면역치료법을 개발함으로써 개선할 필요가 있음을 시사한다[참조: Stolz C, Schuler M. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. Leukemia and lymphoma. 2009; 50(6):873 - 885; Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: Rituximab and beyond. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007; 233-242; Dupire S, Coiffier B. Targeted treatment and new agents in diffuse large B cell lymphoma. Int J Hematol 2010; Jun 18 (online)].
- [0008] 면역 반응의 조절에서 CD40의 역할
- [0009] T 세포의 충분한 활성화는 2개의 독특한, 그러나 상승적 신호를 필요로 한다. T-세포 항원 수용체를 통해 전달된 제1 시그날은 APC 상의 항원 및 MHC 복합체에 의해 제공되고, 면역 반응의 특이성에 기인할 수 있다. 제2 또는 공자극 신호는 CD28과 B7-1(CD80)/B7-2(CD86)과의 상호작용 및 CD40과 CD40L과의 상호작용이고, 이는 전체 규모 T 세포 반응을 증가시키기 위해 요구된다. 공자극 신호의 부재하에, T 세포는 항원 자극시에 무반응(아네르기) 또는 프로그램된 세포 사멸(아포토시스)를 겪을 수 있다.
- [0010] CD40, TNF 수용체(TNFR) 상과(superfamily)의 구성원은 B 세포 및 기타 항원-제시 세포(APC), 예를 들면, 수지상 세포 및 마크로파지 상에서 주로 발현된다. CD40 리간드(CD40L)는 활성화된 T 세포에 의해 주로 발현된다.
- [0011] CD40 및 CD40L 상호작용은 T 세포 활성화를 위한 공자극 신호로 작용한다. 휴면 B 세포 상의 CD40-CD40L 결속은 증식, 면역글로불린 부류 스위칭, 항체 분비를 유도하고, 또한 배 중심의 발달 및 기억 B 세포의 생존에 중요한 역할을 담당하고, 이들 모두는 인간 면역 반응에 필수적이다[참조: Kehry MR. J Immunol 1996; 156: 2345-2348]. 수지상 세포 상의 CD40에 대한 CD40L의 결합은, B7 부류(CD80, CD86) 등의 공-자극 분자의 발현 및 인터류킨 12 등의 전염증 사이토카인의 생성을 증가시킴으로써 나타난 바와 같이 DC 성숙을 유도한다. 이들은 강력한 T 세포 반응을 유도한다[참조: Stout, R. D., J. Suttles. 1996. Immunol. Today 17:487-492; Brendan O'Sullivan, Ranjeny Thomas. Critical Reviews in Immunology 2003; 23: 83-107; Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber. J. Exp. Med. 1996; 184:747-452].
- [0012] CD40 신호 형질도입은, 활성화 단백질, c-Jun, ATF2(활성화 전사 인자-2) 및 Rel 전사 인자의 활성화[참조: Dadgostar H, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Feb 5; 99(3): 1497-502]를 통해 유전자 발현을 조절하는 NF-KappaB(핵 인자-KappaB), MAPK(미토젠-활성화된 단백질 키나제) 및 STAT3(전사-3의 신호 전달자 및 활성화인자)[참조: Pye S, et al. J Biol Chem. 2000 Jun 16; 275(24):18586-93]을 포함하는 다중 경로를 활성화시킨

다. TNFR-수용체 결합된 인자 어댑터 단백질(예: TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 및 TRAF6)은 이 수용체와 상호작용하고, 신호 전달도입의 매개인자로서 작용한다. 특정 세포 유형에 따라, CD40 결속은 특정 유전자 발현 패턴을 생성한다. CD40 신호전달에 반응하여 활성화된 유전자는 다수의 사이토카인 및 케모킨(IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-알파 및 마크로파지 염증 단백질-1알파(MIP1A1pha))를 포함한다. 특정한 세포 유형에서, CD40의 활성화는 세포독성 라디칼(Dadgostar et al., *Supra*)의 생성, COX2(사이클로옥시게나제-2) 및 NO(일산화질소)의 생성을 야기할 수 있다.

[0013] 종양에서 CD40의 역할

[0014] CD40은 정상 면역 세포에 의해 발현될 뿐만 아니라 다수의 악성 세포에 의해 발현된다. 특히, CD40은 B-계열 NHL, 만성 림프구성 백혈병(ALL), 유모 세포 백혈병(HCL), 호지킨 질환[참조: Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Myers DE, et al. Blood 1990;76:2449-2456 ; O'Grady JT, Stewart S, Lowrey J, et al. Am J Pathol 1994;144: 21-26], 다발성 골수종[참조: Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard 3N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M. Blood. 1994; 84(8):2597-603], 또한 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암 및 악성 흑색종[참조: Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, et al. Immunol Today 1998;19:502-6; Ziebold JL, Hixon J, Boyd A, et al. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2000; 48: 225-33; Gladue R, Cole S, Donovan C, et al. J Clin Oncol 2006;24 (18S):103s]에서 과발현된다.

[0015] 다수의 경우에 직접 세포독성 효과를 매개하는 종양 세포 표면 상에 CD40의 결합은 아포토시스 및 괴사를 통해 종양 퇴화를 야기한다[참조: Grewal IS, Flavell RA. Annu Rev Immunol 1998;16:111-35; van Kooten C, Banchereau J. J Leukoc Biol 2000; 67(1):2-17]. 종양 세포에서 CD40의 정확한 작용은 명확하지 않지만[참조: Tong AW, Stone MJ. Cancer Gene Ther. 2003 10(1):1-13], 시험관내에서 CD40의 진입(engagement)은 충실성 종양 세포 및 고도 B 세포 임파종 세포의 성장을 억제한다[참조: Magi Khalil and Robert H. Vonderheide. Update Cancer Ther 2007; 2(2): 61-65; Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. Immunol Today 1998;19(11):502-6; Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, et al. Blood 1994;83(10):2787-94; Hess S, Engelmann H. J Exp Med 1996;183(1):159-67; Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, et al. Oncogene 1996;13(10):2243-54; von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC. Cancer Res 1999;59(6):1287-94]. 이들 효과는 비-신생물 B 세포 및 수지상 세포 상의 CD40의 진입 후에 유도된 증식과 대비된다.

[0016] 직접 종양 억제 이외에, CD40 신호전달의 활성화는 종양-함유 숙주에서 항원-제시 세포의 작용을 구조하고, 종양-관련 항원에 대한 활성 면역 반응을 유발 또는 회복시킨다. CD40 효능제는 종양-함유 마우스에서 T-세포 내성을 극복하고 종양-관련 항원에 대해 효과적인 세포독성 T-세포 반응을 유도하며 항종양 백신의 효능을 증가시키는 것으로 보고되었다[참조: Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, et al. Mol Cell Biol 2000;20(15): 5503-15; Tong AW, Papayoti MH, Netto G, et al. Clin Cancer Res 2001;7(3):691-703].

[0017] 분자 표적으로서의 CD40

[0018] CD40은 광범위한 악성 종양에서 과발현된다. 면역계의 종양 억제 및 자극에 있어서 CD40의 역할은 CD40을 항체-기반 면역치료에 대한 매력적인 표적으로 되게 한다[참조: van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(8): 5561-5566; French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. Nat Med. 1999;5(5):548-553]. 항-CD40 항체는 다수의 메카니즘: (i) ADCC 등의 항체 효과기 작용, (ii) 종양 세포에 대한 직접 세포독성 효과 및 (iii) 항-종양 면역 반응의 활성화를 통해 암 세포에 대해 작용할 수 있다.

[0019] 개발중의 항-CD40 치료용 항체

[0020] 몇몇 항-CD40 항체는 항-종양 치료제로서 가능성을 갖는 것으로 보고되었다. CP-870,893은 화이자(Pfizer)에 의해 개발된 전체 인간 IgG₂ CD40 효능제 항체이다. 이는 3.48×10^{-10} M의 K_D에서 CD40에 결합하지만, CD40L의 결합을 차단하지 않는다[참조: 미국 특허 제7,338,660호]. CP-870893은 가능하게는 IgG2 이소형에 기인하여 ADCC 효과를 나타내지 않았다. 따라서, 이 항체는 CD40 효능제로서 작용하고(즉, CD40 결합에 영향을 미치지 않음), 전아포토시스 신호전달을 유도하고, DC 및 면역 감시를 활성화시킨다. 그러나, 이 항체는 ADCC를 매개하지 않는

다.

[0021] HCD122는 노바티스(Novartis)에 의해 개발된 전체 인간 IgG1 CD40 길항제 항체이다. 이는 5.1×10^{-10} M의 K_D 에서 CD40에 결합하고, CD40L에 대한 CD40 결합을 차단하고, B 세포 및 특정 1차 CLL 및 MM 세포에 대한 CD40-리간드 유도된 신호전달 및 생물학적 효과를 나타낸다[참조: Tai YT, et al. Cancer Res. 2005 Jul 1 ;65(13):5898-906; Luqman M, Klabunde S, et al: Blood 112:711-720, 2008]. 생체내에서 이의 항-종양 효과에 대한 주요 작용 메커니즘은 ADCC이다[참조: Long L, et al. 2005 IMF Oral Presentation and Abstract No. 3; Blood 2004, 104(11, Part 1): Abst 3281]. 이의 길항제 특성으로 인해, 이 항체는 CD40-매개된 항-종양 면역 반응을 직접 유도할 수 없다.

[0022] SGN-40은, 면역원으로서 인간 방광 암종 세포주를 사용하여 생성된 마우스 항체 클론 S2C6으로부터 시애틀 제네틱(Seattle Genetics)에 의해 개발된 인간화된 IgG1 항체이다. 이는 1.0×10^{-9} M의 K_D 에서 CD40에 결합하고, CD40과 CD40L 사이의 상호작용 증강을 통해 작용하며, 따라서 부분 효능제 효과를 나타낸다[참조: Francisco JA, et al., Cancer Res, 60: 3225-31, 2000]. SGN-40은 증식 억제 및 아포토시스 신호를 고도 비-호지킨 림프종 및 MM 세포로부터 기원한 B 림프종 세포주의 패널에 전달한다[참조: Tai YT, Catley LP, Mitsiades CS, et al. Cancer Res 2004;64(8):2846-2852]. 시험관내 및 생체내 연구는 ADCC를 통한 아포토시스 신호 및 항체 효과기 작용이 SGN-40의 항종양 활성에 기여함을 시사한다[참조: Law CL, Gordon KA, Collier J, et al: Cancer Res 2005; 65:8331-8338]. 최근의 연구는 SGN-40의 항-종양 활성이 효과기 세포와의 Fc 상호작용에 의존하고 마크로파지가 이의 치료 활성에 기여하는 주요 효과기임을 제안했다[참조: Oflazoglu E, et al. Br J Cancer. 2009 Jan 13;100(1):113-7. Epub 2008 Dec 9]. SGN-40은 부분 효능제이고 T 세포 상에서 발현된 CD40L을 필요로 하기 때문에, SGN-40은 항-종양 면역 반응을 충분히 자극하는 제한된 능력을 가질 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0023] 따라서, CD40을 표적화하고 이 표적에 대한 효능제로서 작용하며 수지상 세포 및 면역 감시를 활성화시키고 ADCC를 활성화시켜 개선된 항암 특성을 제공하는 신규한 면역치료제가 당해 기술분야에 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0024] 본 발명의 한 가지 양태는, (i) 서열번호 3에 기재된 VHCDR1 영역, 서열번호 4에 기재된 VHCDR2 영역 및 서열번호 5에 기재된 VHCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (ii) 서열번호 6에 기재된 VLCDR1 영역, 서열번호 7에 기재된 VLCDR2 영역 및 서열번호 8에 기재된 VLCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는 상기 CDR 영역에서 최대 8개의 아미노산 치환을 제외하고는 상기 (i) 및 (ii)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 상기 항체의 변이체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 본원에 기재된 항체의 일 실시형태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 양태는, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 이러한 양태의 일 실시형태에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 이러한 양태의 추가의 실시형태에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0026] 본원의 추가의 양태는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 이러한 양태의 일 실시형태에서, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0027] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 단리된 항체는 인간화된 것이다. 예시된 인간화된 항체 가변 영역은 서열 번호 9의 VH 영역 아미노산 서열 및 서열번호 10의 VL 영역 아미노산 서열에 기재되어 있다.
- [0028] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 단리된 항체는 단쇄 항체, ScFv, 힌지 영역이 결여된 일가 항체, 미니바디(minibody), Fab, Fab' 단편 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본원의 항체는 전체 항체(whole antibody)이다.
- [0029] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 단리된 항체는 인간 IgG 불변 도메인, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, IgG1 CH1 도메인 또는 IgG1 Fc 영역을 포함한다.
- [0030] 본원의 추가 실시형태는, 인간 CD40에 결합하기 위해 본원에 기재된 항-CD40 항체와 경쟁하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0031] 본원의 한 가지 양태에서, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 0.96 nM 이하의 KD에서 결합한다. 추가의 실시형태에서, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 1.0 nM 내지 0.90 nM의 KD에서 결합한다. 추가의 실시형태에서, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 1.2, 1.1, 1.0, 0.99, 0.98, 0.97, 0.96, 0.95, 0.94, 0.93, 0.92, 0.91, 0.90, 0.85, 또는 약 0.80 nM의 Kd에서 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 당해 항체는 약 2.5, 2.4, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4 또는 1.3 nM의 Kd에서 CD40에 결합한다.
- [0032] 추가의 양태에서, 본 발명은, 상기 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 CD40L에 대한 CD40의 결합을 차단하거나; CD40 효능제이거나; 항원 제시 세포를 활성화시키거나; 항원 제시 세포로부터 사이토카인 방출을 자극하거나; 종양 세포 아포토시스를 유도하거나; 종양 세포 증식을 억제하거나; 항체 의존성 세포의 세포독성, 보체 의존성 세포독성 및 항체 의존성 세포의 식세포작용으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 효과기 작용의 유도를 통해 종양 세포를 사멸시키거나; 항-종양 T 세포 반응을 자극하거나; 확립된 종양을 감소시키거나; 리톡시맵-내성 종양을 억제시키거나; 상기 언급된 것 중의 하나 이상의 조합인, 본원에 기재된 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 추가의 양태는, (i) 도 16에 도시된 어느 하나의 VH 영역의 VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (ii) 도 16에 도시된 어느 하나의 항체의 상응하는 VL 영역의 VLCDR1, VLCDR2 및 VLCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는 상기 CDR 영역에서 최대 8개의 아미노산 치환을 제외하고는 상기 (i) 및 (ii)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 상기 항체의 변이체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태는, 도 16에 도시된 어느 하나의 VH 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 이러한 항체는 도 16에 도시된 상응하는 VL 영역과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 이러한 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 도 16에 도시된 상응하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태는, 도 16에 도시된 어느 하나의 VL 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 이러한 항체는 도 16에 도시된 상응하는 VH 영역과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 이러한 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 도 16에 도시된 상응하는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.
- [0036] 본 발명은 또한 본원에 기재된 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0037] 본 발명은 또한, 생리학적으로 허용되는 담체, 및 본원에 기재된 치료학적 유효량의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태는, 생리학적으로 허용되는 담체 및 본원에 기재된 치료학적 유효량의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 암 환자에게 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는, 암 환자의 치료 방법을 제공한다. 특정한 실시형태에서, 암은 비정상 CD40 발현과 관련된다. 특정한 실시형태에서, 암은 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성

흑색종 및 림프관 내성 NHL 및 백혈병으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0039] 본 발명의 또 다른 양태는, 생리학적으로 허용되는 담체 및 본원에 기재된 치료학적 유효량의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 암 및/또는 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 환자에게 투여하여 자가면역 및 염증 질환 환자를 치료하는 것을 포괄하는, 암 및/또는 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 환자의 치료 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태는, 생리학적으로 허용되는 담체 및 본원에 기재된 치료학적 유효량의 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 암 및/또는 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 환자에게 투여하여 암 및/또는 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 환자의 증상을 완화시키는 것을 포함하는, 암 및/또는 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 환자의 증상을 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태는, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 서열번호 22에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 단리된 항체는 서열번호 22에 기재된 경쇄를 포함하고, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 추가의 양태는, 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 당해 항체는 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 당해 경쇄는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 추가의 양태는, 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 당해 항체는 서열번호 24에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 13에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0044] 특정한 양태에서, CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, CD40에 결합하는 단리된 항체는 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 28에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 28에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태는, 서열번호 28에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 28에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태는, 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 30에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 가지 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 30에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 추가의 양태는, 서열번호 30에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 실시형태에서, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 30에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태는, 중쇄 가변 영역 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 상응하는 경쇄 가변 영역 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(여기서, 상기 CDR은 도 16에 도시된 바와 같다)을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단

리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

- [0049] 본 발명의 또 다른 양태는 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 한 가지 특정 실시형태에서, 상기 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 202에 기재된 CD40 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 서열번호 196, 197, 199 또는 202에 기재된 CD40 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 3 내지 8에 기재된 CDR을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 단리된 항체는 (i) 서열번호 3에 기재된 VHCDR1 영역, 서열번호 4에 기재된 VHCDR2 영역 및 서열번호 5에 기재된 VHCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (ii) 서열번호 6에 기재된 VLCDR1 영역, 서열번호 7에 기재된 VLCDR2 영역 및 서열번호 8에 기재된 VLCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는 상기 CDR 영역에서 최대 8개의 아미노산 치환을 제외하고는 상기 (i) 및 (ii)의 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 상기 항체의 변이체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 상기 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 당해 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 상기 Fc 영역의 비변형된 버전을 포함하는 상기 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 비교하여 Fc γ RIIB에 대한 증가된 결합 친화성, 증가된 ADCC 또는 증가된 항-CD40 효능제 활성 또는 이의 조합을 갖도록 변형된 Fc 영역을 추가로 포함한다. 이와 관련하여, Fc 영역은 S267E 돌연변이를 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 항원-결합 단편; 상기 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 예상 벡터, 및 이러한 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 치료학적 유효량의 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명은 추가로 본원에 기재된 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여 환자에서 암을 치료 또는 개선시키는 방법을 제공한다. 이와 관련하여, 암은 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프성 백혈병, 모발 세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 방광, 신장, 난소, 자궁경부, 유방, 폐, 비인두, 악성 흑색종 또는 리툭시맵 내성 NHL의 암종 또는 백혈병일 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또한 서열번호 196, 197, 199 및 202로 기재된 어느 하나 이상의 CD40 에피토프에 결합하는 항체를 포함하는 조성물을 환자에게 투여함으로써 환자에서 자가면역 질환 또는 염증 질환의 증상을 개선시키는 방법을 제공한다.
- [0054] 서열의 간단한 기재
- [0055] 서열번호 1은 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VH 영역의 아미노산 서열이다.
- [0056] 서열번호 2는 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VL 영역의 아미노산 서열이다.
- [0057] 서열번호 3은 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VHCDR1 영역의 아미노산 서열이다.
- [0058] 서열번호 4는 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VHCDR2 영역의 아미노산 서열이다.
- [0059] 서열번호 5는 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VHCDR3 영역의 아미노산 서열이다.
- [0060] 서열번호 6은 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VLCDR1 영역의 아미노산 서열이다.
- [0061] 서열번호 7은 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VLCDR2 영역의 아미노산 서열이다.
- [0062] 서열번호 8은 R-8 래빗 항-CD40 항체의 VLCDR3 영역의 아미노산 서열이다.
- [0063] 서열번호 9는, 신호 펩티드 부재하의 APX005, 즉 R-8 래빗 항-CD40 항체의 인간화된 버전의 VH 영역의 아미노산 서열이다.
- [0064] 서열번호 10은, 신호 펩티드 부재하의 APX005, 즉 R-8 래빗 항-CD40 항체의 인간화된 버전의 VL 영역의 아미노산 서열이다.

- [0065] 서열번호 11 내지 21 및 33 내지 44는 작용 활성을 나타낸 래빗 항-CD40 항체 후보자의 중쇄 아미노산 서열이다 (도 16 참조).
- [0066] 서열번호 22 내지 32 및 45 내지 56은 작용 활성을 나타낸 래빗 항-CD40 항체 후보자의 경쇄 아미노산 서열이다 (도 16 참조).
- [0067] 서열번호 57 내지 79는 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VHCDR1 아미노산 서열이다.
- [0068] 서열번호 80 내지 102는 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VHCDR2 아미노산 서열이다.
- [0069] 서열번호 103 내지 125는 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VHCDR3 아미노산 서열이다.
- [0070] 서열번호 126 내지 148은 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VLCDR1 아미노산 서열이다.
- [0071] 서열번호 149 내지 171은 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VLCDR2 아미노산 서열이다.
- [0072] 서열번호 172 내지 194는 도 16에 도시된 항-CD40 항체에 대한 VLCDR3 아미노산 서열이다.
- [0073] 서열번호 195는 S267E 치환을 갖는 Fc 영역을 포함하는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열이다.
- [0074] 서열번호 196은 APX005 항체가 결합된 에피토프로서 동정된 아미노산 92 내지 107이다.
- [0075] 서열번호 197은 APX005 항체가 결합된 에피토프로서 동정된 인간 CD40의 아미노산 125 내지 144이다.
- [0076] 서열번호 198은 인간 CD40의 아미노산 서열이다.
- [0077] 서열번호 199는 CD40의 잔기 84 내지 102로부터 CD40 CLIPS 펩티드의 아미노산 서열이다.
- [0078] 서열번호 200은 위치 91 및 96에서 시스테인 잔기에 대한 세린 치환을 갖는 CD40의 잔기 84 내지 102의 아미노산 서열이다.
- [0079] 서열번호 201은 인간 CD40의 아미노산 잔기 122 내지 125이다.
- [0080] 서열번호 202는 APX005 항체가 결합된 인간 CD40의 아미노산 잔기 92 내지 102이다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1a 내지 1d는 실시예 1에 기재된 바와 같이 DC 성숙 및 T 세포 활성화를 측정함으로써 효능제 항체의 스크리닝 결과를 나타낸다. 1a: CD83 발현; 1b: CD80 발현; 1c: CD86 발현; 1d: 혼합된 임파구 반응에서 T 세포 증식.
- 도 2는 라모스(Ramos) 세포 증식의 억제에 있어서 리드 후보자의 비교를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 ADCC 분석 결과를 나타내는 막대 그래프이다. 40:1의 효과기(인간 PBMC): 표적 세포(라모스 세포) 비.
- 도 4a 및 도 4b는 항-CD40 후보의 항-종양 활성의 생체내 스크리닝 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 APX005가 CD40에 선택적으로 결합하지만 다른 TNFR 부류 구성원과 결합하지 않음을 입증하는 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 APX005가 CD40에 대한 CD40L의 결합을 차단함을 입증하는 ELISA 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 APX005가 CD40 양성 세포에 대한 결합에 의해 국지화되지 않음을 나타내는 그래프이다.
- 도 8a 및 도 8b는 CD40 양성 라모스(도 8A) 및 다우디(Daudi)(도 8B) 종양 세포의 APX005-매개된 ADCC를 나타내는 그래프이다.
- 도 9a 및 도 9b는 APX005에 의한 라모스 종양 세포 증식의 시험관내 억제를 나타내는 그래프이다. 패널 A: Fc 교차결합 부재; 패널 B: Fc 교차결합 존재.
- 도 10은 APX005에 의한 DC 활성의 유도를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 11a 및 도 11b는 APX005가 인간 및 원숭이 CD40에 결합하지만 마우스 CD40에 결합하지 않음을 나타낸다.
- 도 12a는 라모스 모델에서 종양 성장의 APX005 억제를 나타내는 그래프이다. 도 12b는 34일차, 최종 투약후 2일

차의 마우스에서 혈청 인간 IgG의 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

도 13a 및 도 13b는 마우스 모델에서 리툽시맵 전처리된 및 내성 종양의 억제제를 나타내는 그래프이다.

도 14는 라지(Raji) 마우스 모델에서 종양 성장의 APX005 억제제를 나타내는 그래프이다.

도 15는 IM-9 이종이식편 모델에서 인간 다발성 골수종에 대한 APX005의 강력한 항-종양 활성을 나타내는 그래프이다.

도 16a 내지 도 16f는 래빗 항-CD40 중쇄(도 16a 내지 16f) 및 경쇄(도 16g 내지 16l) 항체 서열의 서열 배열이다. 중쇄 및 경쇄 CDR 1-3은 밑줄로 되어 있다. 서열번호는 다음과 같다: 중쇄: R-3 및 R-6: 서열번호 11, 12; R-8: 서열번호 1; R-9, -16, -18, -24, -33, -36, 19-21, -45, -59: 각각 서열번호 13-21; R-2, R-5, R-7, R-10, R-12, R-20, R-26, R-30, R-35, 19-35, 19-41, 19-57: 각각 서열번호 33-44. 경쇄: R-3 및 R-6: 서열번호 22 및 23; R-8: 서열번호 2; R-9, -16, -18, -24, -33, -36, 19-21, -45, -59: 각각 서열번호 24-32; R-2, R-5, R-7, R-10, R-12, R-20, R-26, R-30, R-35, 19-35, 19-41, 19-57: 각각 서열번호 45-56. 아미노산 서열은 VH 및 VL 신호 펩티드를 포함한다. R-8 VHCDR 및 VLCDR 아미노산 서열은 서열번호 3-8에 기재되어 있다. 나머지 항체에 대한 VHCDR 아미노산 서열 및 VLCDR 아미노산 서열은 각각 서열번호 57-125 및 서열번호 126-194에 기재되어 있다.

도 17a 및 17b는, SGN-40 및 리툽시맵과 비교하여 APX005에 의한 라모스 모델에서 종양 성장의 억제제를 나타낸다.

도 18a 및 18b는 리툽시맵-내성 인간 나말와(Namalwa) 임파종 이종이식편 모델에서 종양 성장의 APX005에 의한 억제제를 나타낸다.

도 19는 CD40에 대한 APX005 및 APX005S267E 결합의 비교를 나타낸다.

도 20은 다른 항-CD40 항체와 비교하여 APX005 및 APX005 S267E 돌연변이체의 결합 친화성을 나타낸다.

도 21은 APX005 S267E 돌연변이체의 CD40 효능제 활성을 나타낸다. 이 실험에 대한 ED50(ng/ml)는 APX005: 24.35; APX005 S267E: 4.15; SGN-40: 1264.00; CP870893: 37.00; 19-21: 74.65이다.

도 22는 APX005 S267E 돌연변이체의 ADCC 활성을 나타낸다.

도 23은 CD40 구조 3QD6의 카툰 렌더링(도 23A) 및 표면 렌더링(도 23B) 상에서 APX005 에피토프의 가시화를 나타낸다. 에피토프 영역 $_{92}$ TSEACESVLHRSCLSP $_{107}$ (서열번호 196)은 CD40의 결정 구조 상에 맵핑되고 볼드체로 제시되어 있다. APX005 항체가 결합하는 것으로 또한 밝혀진 잔기 125 내지 144는 구조 3QD6에서 해결되지 않지만, 시스테인 결합에 대한 이용가능한 데이터에 기반하여, 잔기 92 내지 107에 인접하여 존재하는 것으로 예상된다. 따라서, 기준 및 가시화 목적을 위해, 잔기 122 내지 125(서열번호 201)이 제시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 본 발명은, CD40에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원-결합 단편, 특히 특정한 에피토프 특이성 및 작용 특성을 갖는 항체에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시형태는, CD40에 결합할 수 있고 CD40-매개된 하류 세포 신호전달 및 생물학적 효과를 유도/증강시킴으로써 CD40 효능제로서 작용할 수 있는 특정한 인간화된 항체 및 이의 단편을 포함한다. 본 발명의 보다 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 매우 높은 친화성, 예를 들면, 적어도 980 내지 950 피코몰, 적어도 970 내지 950 피코몰의 친화성 및 특정한 실시형태에서 960 피코몰의 친화성으로 CD40에 특이적으로 결합한다. 본원에 기재된 항체는, 기타 특성 중에서, 종양 세포에서 CD40 신호전달을 유도하고, 수지상 세포 및 면역 감시를 활성화시키고, 종양 세포에 대한 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC)를 활성화시키고, CD40L에 대한 CD40의 결합을 차단하고, CD40 작동 활성을 갖고; 항원 제시 세포를 활성화시키고; 항원 제시 세포로부터 사이토카인 방출을 자극하고; 종양 세포 아포토시스를 유도하고; 종양 세포 증식을 억제하고; 이로써 한정되는 것은 아니지만, ADCC, CDC 및 ADCP를 포함하는 효과적 작용의 유도를 통해 종양 세포를 사멸시키고; 항-종양 T 세포 반응을 자극하고; 확립된 종양을 감소시키고; 리툽시맵-내성 종양을 억제시킨다. 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 이들 특성 또는 활성의 조합을 갖거나 유도할 수 있다.

[0083] 본 발명의 실시형태는, CD40 또는 이의 비정상 발현과 관련된 질환 및 질병의 진단, 평가 및 치료를 위한 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도에 관한 것이다. 대상 항체는 기타 질환 중에서, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈

병, 다발성 골수종, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 림프종 내성 NHL 및 백혈병을 포함하는 암, 자가면역 질환 및 염증성 질환의 치료 또는 예방에 사용된다.

[0084] 본 발명의 실시는, 특별히 반대로 명시하지 않는 한, 당해 기술분야에서 통상의 바이러스학, 면역학, 미생물학, 분자생물학 및 재조합 DNA 기술의 방법을 사용할 것이며, 이중 다수는 설명을 위해 하기에 기재된다. 이러한 기술은 문헌[참조: *Current Protocols in Molecular Biology* or *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)] 및 기타 유사 참조문헌에 충분히 설명되어 있다.

[0085] 본 명세서 및 첨부 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수형 "하나(a, an)" 및 "상기(the)"는, 당해 내용이 달리 명시하지 않는 한, 복수 관계를 포함한다.

[0086] 본 명세서 전반에 걸쳐, 당해 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 어구 "포함하는", 또는 "포함한다" 또는 "포함한" 등의 변형태는 언급된 요소 또는 완전체 또는 당해 요소 또는 완전체 그룹의 포함을 의미하는 것으로 이해될 것이며, 임의의 다른 요소 또는 완전체 또는 요소 또는 완전체 그룹의 배제를 의도하지 않는다.

[0087] 본 명세서에서 각각의 실시형태는, 달리 명시되지 않는 한, 필요에 따라 모든 기타 실시형태에도 적용되어야 한다.

[0088] 표준 기술은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 조직 배양 및 형질전환(예: 전기천공, 리포펙션)에 사용될 수 있다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업자의 명세에 따라 또는 당해 기술분야에서 통상적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 실시할 수 있다. 이들 및 관련 기술 및 공정은 당해 기술분야에 공지되어 있고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 및 언급된 다양한 일반 및 보다 특정 참조문헌에 기재된 바와 같은 통상의 방법에 따라 일반적으로 수행될 수 있다. 구체적 정의가 제공되지 않는 한, 본원에 기재된 분자 생물학, 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학 및 약제 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 이들의 실험 공정 및 기술은 공지되어 있고 당해 기술분야에서 통상 사용되는 것들이다. 표준 기술은 재조합 기술, 분자 생물학, 미생물학, 화학적 합성, 화학적 분석, 약제학적 제조, 제형 및 전달 및 환자 치료에 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명의 실시형태는 CD40에 결합하는 항체에 관한 것이다. 특히, 본원에 기재된 항체는 예상치 않게 높은 친화성으로 CD40에 특이적으로 결합하고, CD40 신호전달 활성을 증강시키고, 면역계를 활성화시키고, ADCC를 활성화시키고, 비정상 발현 CD40과 관련된 질환을 치료하기 위한 치료학적 용도를 갖는다.

[0090] 예시적 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이의 상보성 결정 영역(CDR)의 서열은 서열번호 1 내지 194에 기재되어 있다.

[0091] 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 항체는 면역글로불린 분자의 가변 영역에 위치한 적어도 하나의 에피토프 인식 부위를 통해 표적, 예를 들면, 탄소화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적 결합이 가능한 면역글로불린 분자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 당해 용어는 순수한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 뿐만 아니라 이의 단편(예: dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단쇄(ScFv), 이의 합성 변이체, 천연 발생 변이체, 항체 부분을 필요한 특이성의 항원-결합 단편과 함께 포함하는 융합 단백질, 인간화된 항체, 키메라 항체, 및 요구된 특이성의 항원-결합 부위 또는 단편(에피토프 인식 부위)를 포함하는 임의의 기타 변형된 배열의 면역글로불린 분자를 포함한다. 유전자 융합에 의해 작제된 다가 또는 다중특이적 단편인 "디아바디"[참조: W094/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993]도 또한 본원에서 고려되는 특정 형태의 항체이다. CH3 도메인에 결합된 scFv를 포함하는 미니바디도 또한 본원에 포함된다[참조: S. Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996]. [참조예: Ward, E. S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989); Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988); PCT/US92/09965; W094/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993; Y. Reiter *et al.*, *Nature Biotech.*, 14, 1239-1245, 1996; S. Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996].

[0092] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단편"은 목적하는 항원, 특히 CD40에 결합하는 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄

의 적어도 하나의 CDR을 함유하는 폴리펩티드 단편을 지칭한다. 이와 관련하여, 본원에 기재된 항체의 항원-결합 단편은 CD40에 결합하는 항체로부터 본원에 기재된 VH 및 VL 서열의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모든 CDR을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 CD40-특이적 항체의 항원-결합 단편은 CD40에 결합할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 항원-결합 단편 또는 항원-결합 단편을 포함하는 항체는 CD40에 대한 CD40L 결합을 방지하거나 억제한다. 특정한 실시형태에서, 항원-결합 단편은 인간 CD40에 특이적으로 결합하고/하거나 인간 CD40의 생물학적 활성을 증강시키거나 조절한다. 이러한 생물학적 활성은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 세포 신호전달, 수지상 세포의 활성화를 포함한다.

[0093] 용어 "항원"은 선택적 결합제(예: 항체)에 의해 결합될 수 있고 당해 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 생성하기 위해 동물에서 사용될 수 있는 분자 또는 분자 일부를 지칭한다. 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.

[0094] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 대한 특이적 결합이 가능한 임의의 결정소, 바람직하게는 폴리펩티드 결정소를 포함한다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원 영역이다. 특정한 실시형태에서, 에피토프 결정소는 분자의 화학적 활성 표면 그룹, 예를 들면, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐을 포함하고, 특정한 실시형태에서 특정한 3차원 구조 특징 및/또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 특정한 실시형태에서, 항체는, 단백질 및/또는 거대분자의 복합 혼합물에서 이의 표적 항원을 우선적으로 인식할 때, 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 말해진다. 항체는, 평형 해리 상수가 $\leq 10^{-7}$ 또는 10^{-8} M인 경우에 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 말해진다. 일부 실시형태에서, 평형 해리 상수는 $\leq 10^{-9}$ M 또는 $\leq 10^{-10}$ M일 수 있다.

[0095] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체 및 이의 항원-결합 단편은, CDR에 대한 지지체를 제공하고 서로에 대해 CDR의 공간적 관계를 규정하는 중쇄 및 경쇄 골격 영역(FR) 세트 사이에 각각 개재된 중쇄 및 경쇄 CDR 세트를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CDR 세트"는 중쇄 또는 경쇄 V 영역의 3개 초가변 영역을 지칭한다. 중쇄 또는 경쇄의 N-말단으로부터 시작하여, 이들 영역은 각각 "CDR1", "CDR2" 및 "CDR3"으로 표시된다. 따라서, 항원-결합 부위는 각각의 중쇄 및 경쇄 V 영역으로부터 CDR 세트를 포함하는 6개 CDR을 포함한다. 단일 CDR을 포함하는 폴리펩티드(예: CDR1, CDR2 또는 CDR3)은 본원에서 "분자 인식 단위"로서 지칭된다. 다수 항원-항체 복합체의 결정학적 분석은 CDR의 아미노산 잔기가 결합된 항원과의 광범위한 접촉을 형성하는 것을 입증했고, 여기서 가장 광범위한 항원 접촉은 중쇄 CDR3과의 접촉이다. 따라서, 분자 인식 단위는 항원-결합 부위의 특이성에 주로 기인할 수 있다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "FR 세트"는 중쇄 또는 경쇄 V 영역의 CDR 세트의 CDR을 구성하는 4개 양태 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 FR 잔기는 결합된 항원을 접촉할 수 있지만, FR은 주로 V 영역을 항원-결합 부위, 특히 CDR에 바로 인접한 FR 잔기에 중첩시키는 것에 기여할 수 있다. FR 내에서, 특정한 아미노 잔기 및 특정한 구조적 특징은 고도로 보존되어 있다. 이와 관련하여, 모든 V 영역 서열은 대략 90개 아미노산 잔기의 내부 디설파이드 루프를 함유한다. V 영역이 결합-부위 내로 중첩하는 경우, CDR은 항원-결합 표면을 형성하는 루프 모티프를 돌출하는 것으로 표시된다. 정확한 CDR 아미노산 서열과 무관하게, 특정한 "표준" 구조내의 CDR 루프의 중첩 형상에 영향을 미치는 FR의 보조된 구조 영역이 존재한다는 것이 일반적으로 인식된다. 추가로, 특정한 FR 잔기는 항체 중쇄 및 경쇄의 상호작용을 안정화시키는 비-공유 도메인간 접촉에 관여하는 것으로 공지되어 있다.

[0097] 면역글로불린 가변 도메인의 구조 및 위치는 문헌[참조: Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, 1987], 및 현재 인터넷(immuno.bme.nwu.edu)에서 이용가능한 이의 업데이트를 참조하여 결정할 수 있다.

[0098] "모노클로날 항체"는 모노클로날 항체가 에피토프의 선택적 결합에 관여하는 아미노산(천연 발생 및 비천연 발생)으로 구성되는 상동성 항체 모 집단을 지칭한다. 모노클로날 항체는, 단일 에피토프에 대해 지시되는 고도 특이적이다. 용어 "모노클로날 항체"는 순수한 모노클로날 항체 및 전장 모노클로날 항체 뿐만 아니라 이의 단편(예: Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단쇄(ScFv), 이의 변이체, 항원-결합 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 모노클로날 항체, 키메라 모노클로날 항체, 및 요구된 특이성 및 에피토프에 결합하는 능력의 항원-결합 단편(에피토프 인식 부위)를 포함하는 기타 변형된 배열의 면역글로불린 분자를 포함한다. 이는 항체의 공급원 또는 제조되는 방식과 관련하여 한정되는 것으로 의도되지 않는다(예를 들면, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합체 발현, 유전자이식 동물 등). 당해 용어는 "항체"의 정의하에 상기 기재된 단편 등 뿐만 아니라 이의 면역글로불린을 포함한다.

- [0099] 단백질분해 효소 파괴인은 몇몇 단편을 수득하기 위해 IgG 분자를 우선적으로 개열시키고, 2개 각각(F(ab 단편)은 순수한 항원-결합 부위를 포함하는 공유 헤테로이합체를 포함한다. 효소 캡신은 IgG 분자를 개열시켜, 항원-결합 부위를 포함하는 F(ab')₂ 단편을 포함하는 몇몇 단편을 제공할 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에 따라 사용하기 위한 Fv 단편은 IgM 및 드문 경우에 IgG 또는 IgA 면역글로불린 분자의 우선적 단백질분해 개열에 의해 생성될 수 있다. 그러나, Fv 단편은 당해 기술분야에 공지된 재조합 기술을 사용하는 보다 통상적으로 유도된다. Fv 단편은, 천연 항체 분자의 항원 인식 및 결합 능력 대부분을 보유하는 항원-결합 부위를 포함하는 비-공유 V_H:V_L 헤테로이합체를 포함한다[참조: Inbar *et al.* (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659-2662; Hochman *et al.* (1976) *Biochem* 15:2706-2710; and Ehrlich *et al.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096].
- [0100] 특정한 실시형태에서, 단쇄 Fv 또는 scFv 항체가 고려된다. 예를 들면, 카파 바디[참조: Ill *et al.*, *Prot. Eng.* 10: 949-57 (1997)]; 미니바디[참조: Martin *et al.*, *EMBO J* 13: 5305-9 (1994)]; 디아바디[참조: Holliger *et al.*, *PNAS* 90: 6444-8 (1993)]; 또는 야누신[참조: Traunecker *et al.*, *EMBO J* 10: 3655-59 (1991) 및 Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 51-52 (1992)]은 목적하는 특이성을 갖는 항체 선별과 관련하여 본원의 교시에 따라 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 리간드를 포함하는 이중특이적 또는 키메라 항체가 제조될 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체는 상이한 항체로부터 CDR 및 골격 영역을 포함할 수 있고, 하나의 결합 도메인을 통해 CD40에 및 제2 결합 도메인을 통해 제2 분자에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체가 생성될 수 있다. 이들 항체는 재조합 분자 생물학 기술을 통해 생성될 수 있거나 함께 물리적으로 접합시킬 수 있다.
- [0101] 단쇄 Fv(sFv) 폴리펩티드는, 폴리펩티드-코딩 링커에 의해 연결된 V_H:V_L 코딩 유전자를 포함하는 유전자 융합으로부터 발현되는 공유 결합된 V_H:V_L 헤테로이합체이다. 다수의 방법은, 항체 V 영역으로부터 천연 응집된(그러나, 화학적으로 단리된) 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드 쇄를 항원-결합 부위의 구조와 실질적으로 유사한 3차원 구조로 중첩시킬 수 있는 sFv 분자로 전환시키는 화학적 구조를 식별하는 것으로 기재되어 있다[참조: 미국 특허 제 5,091,513호 및 제 5,132,405호, Huston *et al.*; 및 미국 특허 제 4,946,778호, Ladner *et al.*].
- [0102] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 CD40 결합 항체는 디아바디 형태이다. 디아바디는 폴리펩티드의 다합체이고, 각각의 폴리펩티드는 면역글로불린 경쇄의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인 및 면역글로불린 중쇄의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하고, 2개 도메인은 연결(예: 폴리펩티드 링커)되지만 항원 결합 부위를 형성하기 위해 서로 결합할 수 없고, 항원 결합 부위는 다합체 내에 하나의 폴리펩티드의 제1 도메인과 다합체 내의 또 다른 폴리펩티드의 제2 도메인과의 결합에 의해 형성된다(W094/13804).
- [0103] 항체의 dAb 단편은 VH 도메인으로 이루어져 있다[참조: Ward, E. S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)].
- [0104] 이중특이적 항체가 사용되는 경우, 이들은 통상의 이중특이적 항체(이는 다양한 방식으로 제조될 수 있고[참조: Holliger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993)], 예를 들면, 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조될 수 있다)일 수 있거나, 상기 언급된 임의의 이중특이적 항체 단편일 수 있다. 디아바디 및 scFv는 가변 도메인만을 사용하여 Fc 영역 없이 작제되어, 가능하게는 항-유전자형 반응의 효과를 감소시킬 수 있다.
- [0105] 이중특이적 디아바디는, 이중특이적 전체 항체와 대조적으로, 용이하게 작제되어 이. 콜라이에서 발현될 수 있기 때문에, 또한 특히 유용할 수 있다. 적절한 결합 특이성의 디아바디(및 다수의 기타 폴리펩티드, 예를 들면, 항체 단편)는 라이브러리로부터 파지 디스플레이(W094/13804)를 사용하여 용이하게 선택될 수 있다. 디아바디의 하나의 암이, 예를 들면, 항원 X에 대해 지시된 특이성으로 일정하게 유지되는 경우, 다른 암이 변화되고 적절한 특이성의 항체가 선택되는 라이브러리가 제조될 수 있다. 이중특이적 전체 항체는 흑-대-구멍 유전자조작에 의해 제조될 수 있다[참조: J. B. B. Ridgeway *et al.*, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996].
- [0106] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 유니바디(UniBody®)의 형태로 제공될 수 있다. 유니바디®는 제거된 힌지 영역을 갖는 IgG4 항체이다[참조: GenMab Utrecht, The Netherlands; 예를 들면, US20090226421]. 이러한 독점적 항체 기술은, 현재의 작은 항체 형태보다 예상된 보다 긴 치료 윈도우를 갖는 안정한, 보다 작은 항체 형태를 생성한다. IgG4 항체는 불활성인 것으로 간주되고, 따라서 면역계와 상호작용하지 않는다. 전체 인간 IgG4 항체는 항체의 힌지 영역을 제거함으로써 변형시켜, 상응하는 순수한 IgG4와 비교하여 독특한 안정성 특성을 가지는 절반-분자 단편을 수득할 수 있다(GenMab, Utrecht). IgG4 분자의 반감은 동족 항원(예: 질환 표적)에 결합할 수 있는 유니바디® 상에 한 부분만을 잔류시키고, 유니바디®는 따라서 표적 세포 상의 하나의 부

위에만 1가로 결합한다. 특정한 암 세포 표면 항원의 경우, 이러한 1가 결합은, 동일한 항원 특이성을 갖는 2가 항체를 사용하여 관찰할 수 있는 바와 같이, 암 세포의 성장을 자극할 수 없고, 따라서 유니바디® 기술은 통상의 항체를 사용한 처리로 감당할 수 없는 일부 유형의 암에 대한 치료 옵션을 제공할 수 있다. 유니바디®의 작은 크기는 일부 형태의 암을 치료할 때에 큰 잇점일 수 있고, 이는 보다 큰 충실성 종양보다 분자의 보다 양호한 분포 및 잠재적으로 증가하는 효능을 가능하게 한다.

[0107] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 나노바디의 형태를 취할 수 있다. 나노바디는 단일 유전자에 의해 코딩되고, 실질적으로 모든 원핵 및 진핵 숙주, 예를 들면, 이. 콜라이(미국 특허 제6,765,087호), 곰팡이(예를 들면, 아스페르길루스(*Aspergillus*) 또는 트리코데르마(*Trichoderma*)) 및 효모(예를 들면, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 클루이베르마이세스(*Kluyvermyces*), 한센울라(*Hansenula*) 또는 피키아(*Pichia*)(미국 특허 제6,838,254호)호에서 효율적으로 생성된다. 생성 방법은 확장가능하고, 몇 킬로그램 양의 나노바디가 생성되었다. 나노바디는 긴 저장 수명을 갖는 반감기를 즉시-사용 용액으로 제형화될 수 있다. 나노클론 방법(예: WO 06/079372)은, B-세포의 자동화 고효율 선택에 기반하여, 목적하는 표적에 대해 나노바디를 형성하는 적절한 방법이다.

[0108] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항-CD40 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화된 것이다. 이는, 비-인간 종으로부터의 면역글로불린으로부터 유도된 항원-결합 부위를 갖고 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기반한 분자의 면역글로불린 구조를 보유하는, 일반적으로 재조합체 기술을 사용하여 제조된 키메라 분자를 지칭한다. 항원-결합 부위는 불변 도메인으로 융합된 경쟁 가변 도메인을 포함하거나, 가변 도메인 내의 적절한 골격 영역 내로 그래프트된 CDR만을 포함할 수 있다. 에피토프 결합 부위는 야생형일 수 있거나, 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 이는 인간 개체에서 면역원으로서 불변 영역을 제거하지만, 외래 가변 영역에 대한 면역 반응의 가능성은 유지한다[참조: LoBuglio, A. F. *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4220-4224; Queen *et al.*, *PNAS* (1988) 86:10029-10033; Riechmann *et al.*, *Nature* (1988) 332:323-327]. 본원에 기재된 항-CD40 항체의 인간화를 위한 예시적 방법은 미국 특허 제7,462,697호에 기재된 방법을 포함한다. 본 발명의 특정한 실시형태에 따르는 예시적 인간화된 항체는 서열번호 9 및 10에서 제공된 인간화된 항체를 포함한다.

[0109] 또 다른 접근법은 인간-유도된 불변 영역을 제공하는 것 뿐만 아니라, 가변 영역을 변형시켜 가능한 한 인간 형태에 근접하게 이들을 개조하는 것에 초점을 맞춘다. 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역이 3차원 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하고, 당해 상보성 결정 영역은, 소정 종에서 비교적 보존되어 있고 CDR에 대한 스캐폴드를 추정적으로 제공하는 4개 골격 영역(FR)에 의해 플랭킹된 당해 에피토프에 따라 달라지고 결합 능력을 결정한다는 것이 공지되어 있다. 비인간 항체가 특정 에피토프에 대해 제조되는 경우, 가변 영역은 변형되는 인간 항체에 존재하는 FR 상에 비인간 항체로부터 유도된 CDR을 그래프팅시킴으로써 "개조" 또는 "인간화"될 수 있다. 다양한 항체에 대한 이러한 접근법의 적용은 문헌[참조: Sato, K., *et al.*, (1993) *Cancer Res* 53:851-856; Riechmann, L., *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M., *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A., *et al.*, (1991) *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H., *et al.*, (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D., *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4181-4185; Tempest, P. R., *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S., *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Carter, P., *et al.*, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-4289; and Co, M. S. *et al.*, (1992) *J Immunol* 148:1149-1154]에 보고되어 있다. 일부 실시형태에서, 인간화된 항체는 모든 CDR 서열(예를 들면, 마우스 항체로부터의 모든 6개 CDR을 함유하는 인간화된 마우스 항체)을 보존한다. 다른 실시형태에서, 인간화된 항체는 본래 항체에 대해 변화되어 있는 하나 이상의 CDR(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개)을 갖고, 이는 또한 본래 항체로부터 하나 이상의 CDR로 "부터 유도된" 하나 이상의 CDR로 명명된다.

[0110] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체일 수 있다. 이와 관련하여, 키메라 항체는 작동적으로 연결되거나 달리는 상이한 항체의 이종성 Fc 부분에 융합된 항-CD40 항체의 항원-결합 단편으로 구성된다. 특정한 실시형태에서, 이종성 Fc 도메인은 인간 기원의 것이다. 다른 실시형태에서, 이종성 Fc 도메인은, IgA(아부류 IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgG(아부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함) 및 IgM을 포함하는, 모 항체의 상이한 Ig 부류로부터의 것일 수 있다. 추가의 실시형태에서, 이종성 Fc 도메인은 하나 이상의 상이한 Ig 부류로부터의 CH2 및 CH3 도메인으로 구성될 수 있다. 인간화된 항체와 관련하여 상기 주목한 바와 같이, 키메라 항체의 항-CD40 항원-결합 단편은 본원에 기재된 항체의 하나 이상의 CDR만을 포함할 수 있거나(예: 본원에 기재된 항체의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 CDR), 전체 가변 도메인(VL, VH 또는 이들 둘 다)를 포함할 수 있다.

- [0111] 특정한 실시형태에서, CD40-결합 항체는 본원에 기재된 항체의 하나 이상의 CDR을 포함한다. 이와 관련하여, 항체의 VHCDR3 단독의 전이는 목적하는 특이적 결합을 여전히 보유하면서 실시될 수 있는 일부 경우에서 밝혀졌다 [참조: Barbas *et al.*, *PNAS* (1995) 92: 2529-2533]. [참조예: McLane *et al.*, *PNAS* (1995) 92:5214-5218, Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116:2161-2162].
- [0112] 문헌[참조: Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 1992, 10:779-783]은, 가변 도메인 부분의 5' 말단에서 또는 이에 인접하여 유도된 컨센서스 프라이머가 인간 VH 유전자의 제3 골격 영역에 대한 컨센서스 프라이머와 결합하여 사용되어, CDR3을 결여하는 VH 가변 도메인의 레퍼토리를 제공하는, 항체 가변 도메인의 레퍼토리를 생성하는 방법을 기재한다. 마크 등은 또한 이러한 레퍼토리가 특정 항체의 CDR3과 어떻게 조합될 수 있는지를 추가로 기재한다. 유사한 기술을 사용하여, 본원에 기재된 항체의 CDR3-유도된 서열은 CDR3을 결여하는 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리와 혼합될 수 있고, 혼합된 경쟁 VH 또는 VL 도메인은 동족 VL 또는 VH 도메인과 조합되어 CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 이어서, 당해 레퍼토리는 국제공개공보 제W092/01047호의 파지 디스플레이 시스템 등의 적합한 숙주 시스템에서 발현되어, 적합한 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 선택될 수 있다. 레퍼토리는 적어도 약 10^4 개개 구성원으로부터 몇 차수 크기, 예를 들면, 약 10^6 내지 10^8 또는 10^{10} 이상 구성원으로 이루어질 수 있다. 유사한 혼합 또는 조합 기술은 또한 문헌[참조: Stemmer, *Nature*, 1994, 370: 389-391]에 기재되어 있고, 이들은 β -락타마제 유전자와 관련한 기술을 기재하지만 당해 접근법이 항체의 생성에 사용될 수 있는 것을 언급한다.
- [0113] 추가의 대안은, 전체 가변 도메인 내에 돌연변이를 생성하기 위해 하나 이상의 선택된 VH 및/또는 VL 유전자의 랜덤 돌연변이를 사용하는 본원에 기재된 발명 실시형태의 하나 이상의 CDR-유도된 서열을 함유하는 신규한 VH 또는 VL 영역을 생성하는 것이다. 이러한 기술은 에러-경향 PCR을 사용하는 문헌[참조: Gram *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 3576-3580]에 기재되어 있다. 사용될 수 있는 또 다른 방법은 VH 또는 VL 유전자의 CDR 영역에 대해 돌연변이를 유도하는 것이다. 이러한 기술은 문헌[참조: Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813 및 Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567]에 기재되어 있다.
- [0114] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 특정한 VH 및/또는 VL은 목적하는 특성, 예를 들면, CD40에 대한 증가된 친화성을 갖는 항체를 동정하기 위해 상보성 가변 도메인의 라이브러리를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 문헌[참조: Portolano *et al.*, *J. Immunol.* (1993) 150:880-887; Clarkson *et al.*, *Nature* (1991) 352:624-628]에 기재되어 있다.
- [0115] 다른 방법은 또한 목적하는 결합 활성, 예를 들면, CD40에 대한 결합을 갖는 항체를 동정하기 위해 CDR을 혼합 및 매칭시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 문헌[참조: Klimka *et al.*, *British Journal of Cancer* (2000) 83: 252-260]은 마우스 VH로부터 보유된 CDR3 및 FR4를 갖는 마우스 VL 및 인간 VH 라이브러리를 사용하는 스크리닝 방법을 기재한다. 항체를 수득한 후, VH를 인간 VL 라이브러리에 대해 스크리닝하여 항원에 결합된 항체를 수득한다. 문헌[참조: Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2000) 296:833-849]는 전체 마우스 중쇄 및 인간 경쇄 라이브러리를 사용하는 스크리닝 방법을 기재한다. 항체를 수득한 후, 하나의 VL은 보유된 마우스의 CDR3을 갖는 인간 VH 라이브러리와 조합되었다. 항원에 결합할 수 있는 항체가 수득되었다. 문헌[참조: Rader *et al.*, *PNAS* (1998) 95:8910-8915]은 상기 베이보어(Beiboer) 등과 유사한 방법을 기재한다.
- [0116] 이들 상기한 기술은, 자체로, 당해 기술분야에 공지되어 있다. 그러나, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는, 당해 기술분야의 통상의 방법을 사용하여, 본원에 기재된 발명의 몇몇 실시형태에 따라 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 수득하기 위해 이러한 기술을 사용할 수 있을 것이다.
- [0117] 또한, 본원에는, CD40 항원에 특이적인 항체 항원 결합 도메인을 수득하는 방법이 기재되어 있고, 상기 방법은, 예를 들면, 본원에 기재된 VH 도메인의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입을 제공하는 단계(여기서, VH 도메인은 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체이다), 이렇게 제공된 VH 도메인을 하나 이상의 VL 도메인과 임의로 조합하는 단계, 및 VH 도메인 또는 VH/VL 조합 또는 조합물을 시험하여, CD40에 특이적이고 임의로 하나 이상의 목적하는 특성을 갖는 특이적 결합 구성원 또는 항체 항원 결합 도메인을 동정하는 단계를 포함한다. VL 도메인은 본원에 실질적으로 기재되어 있는 아미노산 서열을 가질 것이다. 본원에 기재된 VL 도메인의 하나 이상의 변이체가 하나 이상의 VH 도메인과 조합되어 있는 유사한 방법이 사용될 수 있다.
- [0118] 항체 또는 폴리펩티드에 "특이적으로 결합하는" 또는 "우선적으로 결합하는"(본원에서 상호교대로 사용됨) 에피

토프는 당해 기술분야에서 잘 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 또는 우선적 결합을 측정하는 방법은 당해 기술분야에 또한 공지되어 있다. 분자는, 당해 분자가 또 다른 세포 또는 물질에서 하는 것보다 특정 세포 또는 물질과 보다 큰 기간 및/또는 보다 큰 친화성으로 보다 빈번히 및 신속하게 다른 물질에 반응 또는 결합하는 경우에 "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"을 나타내는 것으로 말해진다. 항체는, 당해 항체가 다른 물질에 결합하는 것보다 보다 큰 친화성, 친화력, 보다 용이하게 및/또는 보다 긴 기간 동안 결합하는 경우에 표적에 "특이적으로 결합"하거나 "우선적으로 결합"한다. 예를 들면, CD40 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체는 다른 CD40 에피토프 또는 비-CD40 에피토프에 결합하는 것보다 큰 친화성, 친화력, 보다 용이하게 및/또는 보다 긴 기간 동안 하나의 CD40 에피토프에 결합하는 항체이다. 또한, 이 정의를 읽음으로써, 예를 들면, 제 1 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 항체(또는 잔기 또는 에피토프)는 제 2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 결합하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 반드시 배타적 결합을 요구하는 것(포함할 수는 있지만)은 아니다. 일반적으로, 반드시 그렇지는 않지만, 결합에 대한 기준은 우선적 결합을 의미한다.

[0119] 면역학적 결합은, 예를 들면, 설명이 목적이지만 한정하는 것은 아닌, 정전기, 이온, 친수성 및/또는 소수성 인력 또는 반발, 입체적 힘, 수소 결합, 반 데르 발스 힘 및 기타 상호작용의 결과로서, 면역글로불린이 특이적인 면역글로불린 분자 및 항원 사이에서 발생하는 유형의 비공유 상호작용을 지칭한다. 면역글로불린 결합 상호작용의 강도 또는 친화성은 상호작용의 해리 상수(K_d)로서 표시되며, 여기서 보다 작은 K_d 는 보다 큰 친화성을 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역학적 결합 특성은 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 정량화할 수 있다. 이러한 한 가지 방법은 항원-결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 것을 수반하고, 여기서 이들 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화성 및 두 방향에서 당해 속도에 동등하게 영향을 미치는 기하 파라미터에 의존한다. 따라서, "결합 속도 상수"(K_{on}) 및 "해리 속도 상수"(K_{off}) 둘 다는 농도와 결합 및 해리의 실제 속도의 계산에 의해 측정할 수 있다. K_{off}/K_{on} 의 비는 친화성과 관련되지 않은 모든 파라미터의 무효를 가능하게 하고, 따라서 해리 상수 K_d 와 동등하다[참조: 일반적으로, Davies *et al.* (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473].

[0120] 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 항-CD40 항체는 약 100, 150, 155, 160, 170, 175, 180, 185, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198 또는 199 피코몰의 친화성을 갖고, 일부 실시형태에서 당해 항체는 CD40에 대해 보다 높은 친화성을 가질 수도 있다.

[0121] 용어 "면역학적으로 활성"은, 에피토프가 면역학적으로 활성이거나 "면역학적으로 활성을 유지하는"과 관련하여, 상이한 조건하에, 예를 들면, 당해 에피토프를 환원 및 변성 조건하에 처리한 후에, 당해 에피토프에 결합하는 항체(예: 항-CD40 항체)의 능력을 지칭한다.

[0122] 본원의 특정 바람직한 실시형태에 따르는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, CD40에 결합하기 위해, (i) 항원에 특이적으로 결합하고 (ii) 본원에 기재된 VH 및/또는 VL 도메인을 포함하거나 본원에 기재된 VH CDR3 또는 이들의 임의의 변이체를 포함하는 본원에 기재된 임의의 항체와 경쟁하는 것일 수 있다. 항체 사이의 경쟁은, 예를 들면, ELISA를 사용하고/하거나 표지되지 않은 다른 항체의 존재하에 검출될 수 있는 소정 항체에 특정 리포터 분자를 표지하여 동일한 에피토프 또는 중첩 에피토프에 결합하는 특이적 항체의 동정을 가능하게 함으로써 시험관내에서 용이하게 분석할 수 있다. 따라서, 본원에는, CD40에 결합하는 본원에 기재된 항체와 경쟁하는 인간 항체 항원-결합 부위를 포함하는, 특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다.

[0123] 이와 관련하여, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "와 경쟁하는", "결합을 억제하는" 및 "결합을 차단하는"(예: CD40에 대한 CD40L의 결합을 억제/차단하는 것을 지칭하거나 CD40에 대한 항-CD40 항체의 결합하는 억제/차단하는 것을 지칭함)은 상호 교대로 사용되고, 부분 및 완전 억제/차단 둘 다를 포함한다. 억제 및 차단은 또한 항-CD40 항체와 접촉하지 않는 리간드와 비교하여 본원에 기재된 항-CD40 항체와 접촉할 때에 CD40에 대한 CD40L의 결합에 있어서 임의의 측정가능한 감소, 예를 들면, 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%까지 CD40에 대한 CD40L의 차단을 포함하는 것으로 의도된다.

[0124] 면역글로불린의 불변 영역은 가변 영역보다 적은 서열 다양성을 나타내고, 중요한 생화학적 사건을 유도하기 위해 다수의 천연 단백질의 결합에 기인할 수 있다. 인간에 있어서는, IgA(아부류 IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgG(아부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함) 및 IgM을 포함하는, 5개의 상이한 부류의 항체가 있다. 이들 항체 부류 사이의 구별되는 특징은, 보다 약간의 차이가 V 영역에 존재할 수는 있지만, 이들의 불변 영역이다.

- [0125] 항체의 Fc 영역은 다수의 Fc 리포터 및 리간드와 상호작용하고, 이는 효과기 작용으로 지칭되는 중요한 작용 능력의 배열을 제공한다. IgG의 경우, Fc 영역은 Ig 도메인 CH2 및 CH3, 및 CH2 내로 유도하는 N-말단 힌지를 포함한다. IgG 부류를 위한 중요한 부류의 Fc 수용체는 Fc 감마 수용체(Fc γ R)이다. 이들 수용체는 항체와 면역계의 세포 압 사이의 소통을 매개한다[참조: Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch *et al.*, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290]. 인간에 있어서, 이러한 단백질 부류는, 이소형 Fc γ RIa, Fc γ Ib 및 Fc γ Ic를 포함하는 Fc γ RI(CD64); 이소형 Fc γ RIIa(동종이인자형 H131 및 R131 포함), Fc γ RIIb(Fc γ RIIb-1 및 Fc γ RIIb-2 포함) 및 Fc γ RIIc를 포함하는 Fc γ RII; 및 이소형 Fc γ RIIIa(동종이인자형 V158 및 F158) 및 Fc γ RIIIb(동종이인자형 Fc γ RIIIb-NA1 및 Fc γ RIIIb-NA2 포함)을 포함하는 Fc γ RIII을 포함한다[참조: Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65]. 이들 수용체는 전형적으로 Fc에 대한 결합을 매개하는 세포의 도메인, 막 폭 영역, 및 세포 내의 일부 신호전달 사건을 매개할 수 있는 세포내 도메인을 갖는다. 이들 수용체는 단핵구, 마크로파지, 호중구, 수지상 세포, 호산구, 마스트 세포, 혈소판, B 세포, 거대 과립상 림프구, 랑게르한스 세포, 천연 킬러(NK) 세포 및 T 세포를 포함하는 다양한 면역 세포에서 발현된다. Fc/Fc γ R 복합체의 형성은 결합된 항원의 부위로 이들 효과기 세포를 모집하고, 이는 전형적으로 세포 내의 신호전달 사건, 및 염증 매개체의 방출, B 세포 활성화, 세포내흡수, 식세포작용 및 세포독성 공격 등의 중요한 후속 면역 반응을 야기한다.
- [0126] 세포독성 및 식세포 효과기 작용을 매개하는 능력은 항체가 표적 세포를 파괴하는 강력한 메카니즘이다. Fc γ R을 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응은 항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)로서 지칭된다[참조: Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie *et al.*, 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch *et al.*, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290]. Fc γ R을 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 식세포작용을 유발하는 세포-매개된 반응은 항체 의존성 세포-매개된 식세포작용(ADCP)으로서 지칭된다. 모든 Fc γ R은 Cg2(CH2) 도메인의 N-말단 및 선행 힌지에서 Fc 상의 동일한 영역에 결합한다. 이러한 상호작용은 구조적으로 잘 특성화되어 있고[참조: Sondermann *et al.*, 2001, J Mol Biol 309:737-749], 인간 Fc γ RIIIb의 세포의 도메인에 결합된 인간 Fc의 몇몇 구조는 해석되었다(pdb 접근 코드 1E4K)[참조: Sondermann *et al.*, 2000, Nature 406:267-273.] (pdb 접근 코드 1IIS 및 1IIX)[참조: Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:16469-16477.].
- [0127] 상이한 IgG 아부류는 Fc γ R에 대해 상이한 친화성을 갖고, IgG1 및 IgG3은 전형적으로 IgG2 및 IgG4보다 당해 수용체에 실질적으로 보다 양호하게 결합한다[참조: Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65]. 모든 Fc γ R는 IgG Fc 상의 동일한 영역에 상이한 친화성(고친화성 결합제 Fc γ RI은 IgG1에 대해 10^{-8} M⁻¹의 Kd를 갖는다)으로 결합하는 반면, 보다 낮은 친화성 수용체 Fc γ RII 및 Fc γ RIII은 일반적으로 각각 10^{-6} 및 10^{-5} 에서 결합한다. Fc γ RIIIa 및 Fc γ RIIIb의 세포의 도메인은 96% 동일하지만, Fc γ RIIIb는 세포내 신호전달 도메인을 갖지 않는다. 추가로, Fc γ RI, Fc γ RIIa/c 및 Fc γ RIIIa는, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티브(ITAM)를 갖는 세포내 도메인을 가짐을 특징으로 하는 면역 복합체-유발된 활성화의 양성 조절제이고, Fc γ RIIb는 면역수용체 티로신-기반 억제 모티브(ITIM)을 갖고 따라서 억제성이다. 따라서, 전자는 활성화 수용체로서 지칭되고, Fc γ RIIb는 억제 수용체로서 지칭된다. 당해 수용체는 또한 상이한 면역 세포에 대한 발현 패턴 및 수준이 상이하다. 또 다른 수준의 복잡성은 인간 프로테오미에서 다수의 Fc γ R 다형태의 존재이다. 임상적 중요성을 갖는 특정 관련 다형태는 V158/F158 Fc γ RIIIa이다. 인간 IgG1은 F158 이종이인자형보다 큰 친화성으로 V158 이종이인자형에 결합한다. 친화성, 및 잠재적으로 ADCC 및/또는 ADCP에 대한 이의 효과에 있어서의 이러한 차이는 항-CD20 항체 리툽시맵(Rituxan[®], IDEC 파마슈티칼즈 코포레이션의 등록 상표명)의 효능의 중요한 결정인자인 것으로 밝혀졌다. V158 이종이인자형을 갖는 환자는 리툽시맵 처리에 양호하게 반응하지만, 보다 저친화성 F158 이종이인자형을 갖는 환자는 불충분하게 반응한다[참조: Cartron *et al.*, 2002, Blood 99:754-758]. 대략 10-20%의 인간은 V158/V158 동종형이고, 45%는 V158/F158 이종형이고, 35-45%의 인간은 F158/F158 동종형이다[참조: Lehrnbecher *et al.*, 1999, Blood 94:4220-4232; Cartron *et al.*, 2002, Blood 99:754-758]. 따라서, 80-90%의 인간은 불충분한 반응자이고, 즉 이들은 이들이 F158FcRIIIa의 적어도 하나의 대립인자를 갖는다.
- [0128] Fc 영역은 또한 보체 캐스케이드의 활성화에 수반된다. 고전적 보체 경로에서, C1은 항원(들)과의 복합체를 형성한 IgG 또는 IgM의 Fc 단편에 이의 C1q 아단위와 함께 결합한다. 본 발명의 특정한 실시형태에서, Fc 영역에 대한 변형은 보체 시스템을 활성화시키는 본원에 기재된 CD40-특이적 항체의 능력을 변화(증강 또는 감소)시키는 변형을 포함한다(참조예: 미국 특허 제7,740,847호). 보체 활성화를 평가하기 위해, 보체-의존성 세포독성

(CDC) 분석이 수행될 수 있다[참조: Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)].

- [0129] 따라서, 특정한 실시형태에서, 본 발명은, 감소되거나 증강된 CDC, ADCC 또는 ADCP 활성, 또는 특이적 Fc γ R에 대한 증강된 결합 친화성 또는 증가된 혈청 반감기 등의 변화된 작용 특성을 갖는 변형된 Fc 영역을 갖는 항-CD40 항체를 제공한다. 본원에서 기재된 기타 변형된 Fc 영역은, 예를 들면, 미국 특허 7,317,091; 7,657,380; 7,662,925; 6,538,124; 6,528,624; 7,297,775; 7,364,731; 공개된 미국 특허원 US2009092599; US20080131435; US20080138344; 및 공개된 국제 특허원 WO2006/105338; WO2004/063351; WO2006/088494; WO2007/024249에 기재되어 있다.
- [0130] 일 실시형태에서, Fc 중의 하나 이상의 치환은 Fc γ RIIB에 대한 결합 친화성을 증가시키고, CD40 분자의 가교결합을 증강시키고, 항-CD40 항체에 의한 보다 강력한 CD40 활성화를 유도할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명은 위치 267에서 변형된 Fc 영역을 갖는 항-CD40 항체를 제공한다[참조: EU numbering; see *e.g.*, Edelman, G.M. *et al.*, 1969 Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85; see also the ImMunoGeneTics (IMGT) database website at imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering]. 일 실시형태에서, 본원의 항-CD40 항체는 S267E 치환을 포함하는 변형된 Fc를 포함한다[참조: Li Fu, Ravetch JV. 2011 Science 333:1030; see also J. Immunol. 2011, 187:1754-1763; mAbs 2010, 2:181-189]. 예시의 변형된 Fc를 포함하는 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 195에 기재되어 있다.
- [0131] 따라서, 특정한 실시형태에서, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합된다. 특정한 실시형태에서, 융합은 힌지, C_H2 및 C_H3 영역의 적어도 일부를 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인과의 것이다. 융합체의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 요구되는 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(C_H1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및, 필요에 따라, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터에 삽입되고, 적합한 숙주 세포 내로 공-형질감염된다. 이는, 작체에 사용된 상이한 비율의 3개 폴리펩티드 쇄가 목적하는 이중특이적 항체의 최적 생성을 제공하는 실시형태에서 3개 폴리펩티드 단편의 상호 비율의 조절하는데 보다 큰 가요성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율에서 적어도 2개 폴리펩티드 쇄의 발현이 높은 생성을 야기하거나 당해 비율이 목적하는 쇄 조합의 생성에 현저한 영향을 미치지 않을 때, 2개 또는 3개 모든 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다.
- [0132] 본 발명의 항체(및 이의 항원-결합 단편 및 변이체)는 또한, 예를 들면, 정제 또는 진단 분야에 사용하기 위해 에피토프 태그 또는 표지를 포함하도록 변형시킬 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,208,020호 또는 유럽 특허 제0 425 235 B1호 및 문헌[참조: Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992)]에 기재된 것들을 포함하여 항체 접합체를 제조하는 당해 기술분야에 공지된 다수의 연결 그룹이 있다. 당해 연결 그룹은, 상기 확인된 특허에 기재된 바와 같은, 디설파이드 그룹, 티오에테르 그룹, 산 불안정성 그룹, 광불안정성 그룹, 펩티다제 불안정성 그룹 또는 에스테라제 불안정성 그룹을 포함하고, 디설파이드 및 티오에테르 그룹이 바람직하다.
- [0133] 또 다른 고려된 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD40-특이적 항체는 본원에서 접합체로서 지칭되는 또 다른 치료학적 화합물에 접합되거나 작동적으로 연결될 수 있다. 당해 접합체는 세포독성제, 화학치료제, 사이토카인, 항-혈관형성제, 티로신 키나제 억제제, 독소, 방사선동위원소 또는 기타 치료학적 활성제일 수 있다. 화학치료제, 사이토카인, 항-혈관형성제, 티로신 키나제 억제제 및 기타 치료제는 상기 기재되어 있고, 이들 상술한 치료제 모두는 항체 접합체로서의 용도를 찾을 수 있다.
- [0134] 대체 실시형태에서, 항체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 이의 단편 및/또는 변이체를 포함하여, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 및 효적 활성 독서소를 포함하는, 독소에 접합되거나 작동적으로 연결된다. 소분자 독소는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 사포린[참조: Kuroda K, *et al.*, The Prostate 70:1286-1294 (2010); Lip, WL. *et al.*, 2007 Molecular Pharmaceutics 4:241-251; Quadros EV., *et al.*, 2010 Mol Cancer Ther; 9(11); 3033-40; Polito L., *et al.* 2009 British Journal of Haematology, 147, 710-718], 칼리케아미신, 마이탄신(미국 특허 제5,208,020호), 트리코텐 및 CC1065를 포함한다. 독소는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, RNase, 젤로닌, 에네딘, 리신, 아브린, 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 젤로닌, 슈도모나스 외독소(PE40), 시겔라 독소, 클로스트리디움 퍼프린젠(*Clostridium perfringens*) 독소 및 미국자리공 항바이러스 단백질을 포함한다.
- [0135] 일 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하나 이상의 마이탄시노이드 분자에 접합된다. 마이탄시노이드는 투블린 중합을 억제시킴으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 마이탄신은 먼저 동아프리카 관목 마이테누스(Maytenus)세라타(미국 특허 제3,896,111호)로부터 분리했다. 이어서, 특정한 미생물은 또한 마

이탄시노이드, 예를 들면, 마이탄시놀 및 C-3 마이탄시놀 에스테르(미국 특허 제4,151,042호)를 생성하는 것으로 발견되었다. 합성 마이탄시놀 및 이의 유도체 및 동족체는, 예를 들면, 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 기재되어 있다. 마이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 이의 치료학적 용도는, 예를 들면, 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 제0 425 235 B1호에 기재되어 있다. 문헌[참조: Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 유도된 모노클로날 항체 C242에 연결된 마이탄시노이드 지정된 DM1을 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 당해 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 나타냈다.

[0136] 항체-마이탄시노이드 접합체는, 항체 또는 마이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 현저히 감소시키지 않고서, 항체를 마이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 항체 분자당 접합된 평균 3-4 마이탄시노이드 분자는, 독소/항체 중의 하나의 분자가 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증강시킬 것으로 예상되지만, 당해 항체의 작용 또는 용해도에 부정적으로 영향을 미치지 않고서, 표적 세포의 세포독성의 증강에서 효능을 나타냈다. 마이탄시노이드는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 공지된 기술에 의해 합성될 수 있거나 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 적합한 마이탄시노이드는, 예를 들면, 미국 특허 제5,208,020호 및 기타 특허 및 상기 본원에서 지칭되는 비특허 공보에 기재되어 있다. 바람직한 마이탄시노이드는 마이탄시놀 및, 다양한 마이탄시놀 에스테르 등과 같이 방향족 환 또는 마이탄시놀 분자의 기타 위치에서 변형된 마이탄시놀 유사체이다.

[0137] 목적하는 또 다른 접합체는 하나 이상의 칼리케미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 칼리케미신 부류의 항생제는 피코몰 이하 농도에서 이중-나선 DNA 개열을 생성할 수 있다. 칼리케미신의 구조적 유사체도 또한 사용될 수 있다[참조: Hinman *et al.*, 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode *et al.*, 1998, Cancer Research 58:2925-2928](미국 특허 제5,714,586호; 미국 특허 제5,712,374호; 미국 특허 제5,264,586호; 미국 특허 제5,773,001호). 오리스타틴 E(AE) 및 모노메틸오리스타틴 E(MMAE) 등의 돌라스타틴 10개 유사체는 본원에 기재된 항체 또는 이의 변이체를 위한 접합체로서 사용할 수 있다[참조: Doronina *et al.*, 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco *et al.*, 2003 Blood 102(4):1458-65]. 유용한 효소적 활성 독소는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄(슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르친, 크로틴, 사파오나리아 오피시날릴스(*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테세네스를 포함한다[참조: PCT WO 93/21232]. 본 발명은, 접합체 또는 융합체가 본원에 기재된 CD40-특이적 항체와 핵분해 활성을 갖는 화합물, 예를 들면, 데옥시리보뉴클레아제(DNase) 등의 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제 사이에서 형성되는 실시형태를 추가로 고려한다.

[0138] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 방사선 동위원소에 접합되거나 작동적으로 연결되어 방사선 접합체를 형성할 수 있다. 다양한 방사활성 동위원소는 방사선 접합체 항체의 생성에 이용가능하다. 이의 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, ^{90}Y , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At 및 ^{212}Bi 를 포함한다.

[0139] 본원에 기재된 항체는 특정한 기타 실시형태에서 세포독소(예: 세포정지 또는 세포파괴 제제), 치료제 또는 방사활성 원소(예: 알파-방사체, 감마-방사체 등) 등의 치료학적 잔기에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포성제는 세포에 유해한 임의의 제제를 포함한다. 이의 예는, 파클리탁셀/파클리탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토코산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-테하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 한 가지 바람직한 예시적 세포독소는 사포린(어드벤스드 타겟팅 시스템(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)에서 이용가능)이다. 치료제는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 항대사물질(예: 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 테카빈), 알킬 화제(예: 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 마이토마이신 C 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예: 다우노루비신(이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예: 닥티노마이신(이전에 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC), 및 항-유사분열 제제

(예: 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다.

[0140] 더욱이, CD40-특이적 항체(항원-결합 단편 등의 본원에 기재된 이의 작용 단편을 포함)은 특정한 실시형태에서 방사선감속 이온의 접합에 유용한 방사활성 물질 또는 매크로사이클릭 킬레이트제 등의 치료학적 잔기에 접합될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 매크로사이클릭 킬레이트제는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이고, 이는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있다. 이러한 링커 분자는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 문헌[참조: Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; and Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50]에 기재되어 있다.

[0141] 또 다른 실시형태에서, 항체는 종양 전표적화에서 사용하는 "수용체"(예: 스트렙타비딘)에 접합될 수 있고, 여기서 항체-수용체 접합체는 환자에게 투여되고, 이어서 정화제를 사용하여 순환으로부터 비결합 접합체를 제거한 다음, 세포독성제(예: 방사뉴클레오티드)에 접합되는 "리간드"(예: 아비딘)가 투여된다. 대체 실시형태에서, 당해 항체는 항체 의존성 효소 매개된 프로드럭 치료(ADEPT)를 사용하기 위해 효소에 접합되거나 작동적으로 연결된다. ADEPT는 당해 항체를 프로드럭-활성화 효소에 접합 또는 작동적으로 연결시킴으로써 사용될 수 있고, 상기 효소는 프로드럭(예: 펩티딜 화학치료제, PCT WO 81/01145)을 활성 항암 약물로 전환시킨다[참조: PCT WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호]. ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 이를 이의 보다 활성 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 프로드럭에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다. 이들 및 관련 실시형태의 방법에 유용한 효소는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 포스페이트-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 포스파타제; 설페이트-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴설페타제; 무독성 5-플루오로사이토신을 항암 약물, 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 사이토신 데아미나제; 펩티드-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들면, 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텡신(예: 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 프로드럭을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카복시펩티다제; 글리코실화 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-개열 효소, 예를 들면, -갈라토시다제 및 뉴라미시다제; 락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 베타-락타마제; 및 이들의 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 그룹으로 각각 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아미다제, 예를 들면, 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제를 포함한다. 대안적으로, 당해 기술분야에서 "에브자임"으로 또한 공지된 효소적 활성을 갖는 항체를 사용하여 프로드럭을 유리 활성 약물로 전환시킬 수 있다[참조: Massey, 1987, Nature 328: 457-458]. 항체-에브자임 접합체는 당해 에브자임의 종양 세포 모집단으로의 전달을 위해 제조될 수 있다.

[0142] 면역접합체는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예를 들면, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예: 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예: 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예: 비스-(p-디아조니움벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아이트(예: 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루린 화합물(예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 특정한 커플링제는 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)[참조: Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 [1978]] 및 N-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펩타노에이트(SPP)을 포함하여 디설파이드 결합을 제공한다. 당해 링커는 하나 이상의 개열 성분의 방출을 촉진하는 "개열가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산-불안정성 링커를 사용할 수 있다[참조: Cancer Research 52: 127-131 (1992); U.S. Pat. No. 5,208,020].

[0143] 본 발명의 항체(및 폴리펩티드)의 다른 변형체가 본원에서 또한 고려된다. 예를 들면, 당해 항체는 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중의 하나에 연결될 수 있다. 당해 항체는 또한, 예를 들면, 코아세트베이션 기술 또는 계면 중합화(예: 각각 하이드록시메틸셀룰로즈 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트)마이크로캡슐)에 의해 제조된 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에 또는 마이크로에멀전에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 기재되어 있다.

[0144] 본원에 사용된 "담체"는 사용된 용량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 무독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충액이다. 생리학적으로 허용되는 담체의 예는 완충제, 예를 들면, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기 산; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴

또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류, 및 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들면, EDTA; 당 알코올, 예를 들면 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예를 들면 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, 폴리솔베이트 20(TWEENTM) 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 폴록사머(PLURONICSTM) 등을 포함한다.

[0145] 본원에서 달리 주목한 바와 같이, 본 발명의 항체는 종양 세포에서 CD40 신호전달을 유도하고, 수지상 세포 및 면역 감시를 활성화시키고, 종양 세포에 대한 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 활성화시키고; CD40L에 대한 CD40의 결합을 차단하고; CD40 작동 활성을 갖고; 항원 제시 세포를 활성화시키고, 항원 제시 세포로부터 사이토카인 방출을 자극하고; 종양 세포 아포토시스를 유도하고; 종양 세포 증식을 억제하고; 이로써 한정되는 것은 아니지만, ADCC, CDC 및 ADCP를 포함하는 효과기 작용의 유도를 통해 종양 세포를 사멸시키고; 리톡시맵-내성 종양을 억제한다. 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 이들 특성 또는 활성의 조합을 갖거나 이를 유도할 수 있다. 항-CD40 항체의 목적하는 작용 특성은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 다양한 방법, 예를 들면, 친화성/결합 분석(예: 표면 플라스몬 공명, 경쟁 결합 분석); 세포독성 분석, 세포 생존력 분석, 세포 증식, 활성화 또는 분화 분석, ADCC 및 CDC 분석, CD40 세포 신호전달 사건으로부터 발생하는 기타 세포 활성(예: STAT3 포스포릴화, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-Alpha 및 MIP1Alpha를 포함하는 사이토카인의 생성), 및 시험관 내 또는 생체내 모델을 사용한 암 세포 및/또는 종양 성장 억제를 사용하여 평가할 수 있다. 기타 분석은 CD40 또는 CD40-매개된 반응, 예를 들면, 세포 신호전달, 세포 활성화(예: 면역 세포 활성화, 증식; 항원 제시 세포 활성화(예: 수지상 세포, B 세포, 마크로파지) 및 성숙 분석), 면역 반응(세포 매개된 및 인간 반응을 포함) 등에 대한 정상 CD40L 결합을 차단하는 본원에 기재된 항체의 능력을 시험할 수 있다. 본원에 기재된 항체는 또한 CD40 내부화에 대한 효과, 시험관내 및 생체내 효능 등에 대해 시험할 수 있다. 이러한 분석은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 잘-확립된 프로토콜[참조: Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)] 또는 상업적으로 이용가능한 키트를 사용하여 수행될 수 있다.

[0146] 본 발명은 또한 특정한 실시형태에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 핵산, 예를 들면, 본원에 기재된 CDR 또는 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 핵산을 제공한다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함한다. 이들 및 관련 실시형태는 본원에 기재된 바와 같은 CD40에 결합하는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈, cDNA 또는 합성 기원 또는 이의 일부 조합의 폴리뉴클레오티드를 의미하고, 이는 이의 기원의 양태에서 (1) 단리된 폴리뉴클레오티드가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드 전부 또는 일부와 결합하지 않거나, (2) 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오티드에 연결되거나, (3) 보다 큰 서열의 일부로서 자연에서 발생하지 않는다.

[0147] 용어 "작동적으로 연결된"은 당해 용어가 적용되는 성분이 적합한 조건하에 이들의 고유 작용을 운반하는 관계에 있는 것을 의미한다. 예를 들면, 단백질 코딩 서열에 "작동적으로 연결된" 전사 조절 서열은 단백질 코딩 서열의 발현이 조절 서열의 전사 활성화와 비교가능한 조건하에 달성되도록 이에 결합되어 있다.

[0148] 본원에서 사용된 용어 "조절 서열"은 이들이 결합되거나 작동적으로 연결되어 있는 코딩 서열의 발현, 처리 또는 세포내 국지화에 영향을 미칠 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 생물체에 의존할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 원핵생물에 대한 전사 조절 서열은 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 기타 특정 실시형태에서, 진핵생물에 대한 전사 조절 서열은 전사 인자를 위한 하나 또는 복수의 인식 부위를 포함하는 프로모터, 전사 인핸서 서열, 전사 종결 서열 및 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 특정한 실시형태에서, "조절 서열"은 리더 서열 및/또는 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.

[0149] 본원에서 지칭하는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단쇄 또는 이중쇄 핵산 중합체를 의미한다. 특정한 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 변형된 형태의 어느 유형의 뉴클레오티드일 수 있다. 상기 변형은 염기 변형체(예: 브로모우리딘), 리보스 변형체(예: 아라비노사이드 및 2',3'-디데옥시리보스) 및 뉴클레오티드간 연결 변형체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포라닐라테이트 및 포스포로아미데이트)를 포함한다. 용어 "폴리뉴클레오티드"는 구체적으로는 단쇄 및 이중쇄 형태의 DNA를 포함한다.

- [0150] 용어 "천연 발생 뉴클레오타이드"는 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 용어 "변형된 뉴클레오타이드"는 변형된 또는 치환된 당 그룹 등을 갖는 뉴클레오타이드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드 연결"은 올리고뉴클레오타이드 연결, 예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀로노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라테이트, 포스포로아미데이트 등을 포함한다[참조:LaPlanche *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Stec *et al.*, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Zon *et al.*, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec *et al.*, U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543, 이의 개시내용은 임의의 목적을 위해 참조로서 본원에 도입된다]. 올리고뉴클레오타이드는 검출가능한 표지를 포함하여 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 하이브리드화의 검출을 가능하게 할 수 있다.
- [0151] 용어 "벡터"는 코딩 정보를 숙주 세포로 전달하는데 사용된 임의의 분자(예: 핵산, 플라스미드 또는 바이러스)를 지칭하기 위해 사용된다. 용어 "발현 벡터"는, 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 이중성 핵산 서열의 발현을 유도 및/또는 조절하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 지칭한다. 발현은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 전사, 해독 및 RNA 스플라이싱(인트론이 존재하는 경우) 등의 처리를 포함한다.
- [0152] 당해 기술분야의 숙련자에게 이해되는 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드는, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 등을 발현하거나 발현에 적용될 수 있는, 게놈 서열, 게놈외 및 플라스미드-코딩된 서열 및 보다 작은 조작된 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다. 이러한 세그먼트는 자연적으로 분리되거나, 당해 숙련가에 의해 합성적으로 변형될 수 있다.
- [0153] 또한, 당해 기술분야의 숙련가에 의해 인지되는 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드는 단쇄(코딩 또는 안티센스) 또는 이중쇄일 수 있고, DNA(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자는 HnRNA 분자(이는 인트론을 함유하고 일대일 방식으로 DNA 분자에 상응한다) 및 mRNA 분자(이는 인트론을 함유하지 않는다)를 포함할 수 있다. 추가의 코딩 또는 비-코딩 서열은, 필수는 아니지만, 본 발명에 따라 폴리뉴클레오타이드에 존재할 수 있고, 폴리뉴클레오타이드는, 필수는 아니지만, 다른 분자 및/또는 지지체 물질에 연결될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 천연 서열을 포함할 수 있거나, 이러한 서열의 변이체 또는 유도체를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0154] 따라서, 이들 및 관련 실시형태에 따라, 본 발명은 또한 본원에 기재된 항-CD40 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이러한 폴리뉴클레오타이드의 보체의 일부 또는 전부를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.
- [0155] 기타 관련 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 변이체는 본원에 기재된 항-CD40 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 실질적 동일성을 가질 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드는, 본원에 기재된 방법(예를 들면, 하기 기재된 표준 파라미터를 사용한 BLAST 분석)을 사용하여 본원에 기재된 항체를 코딩하는 서열 등의 참조 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교하여, 적어도 70% 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 이들 값이 적절하게 조절되어, 코돈 축퇴, 아미노산 유사성, 판독 프레임 위치결정 등을 고려하여 2개 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 단백질의 상응하는 유사성을 결정할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0156] 전형적으로, 폴리뉴클레오타이드 변이체는, 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 항체의 결합 친화성이 본원에 구체적으로 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 항체와 비교하여 실질적으로 감소되지 않도록, 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 함유할 것이다.
- [0157] 특정한 기타 관련 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 단편은 본원에 기재된 항체를 코딩하는 서열과 동일하거나 상보적인 다양한 길이의 서열의 연속 스트레치를 포함하거나 실질적으로 이들로 구성될 수 있다. 예를 들면, 이들 사이의 모든 중간 길이 뿐만 아니라 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 서열의 적어도 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500 또는 1000개 또는 그 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하거나 실질적으로 이들로 이루어진 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 이와 관련하여, "중간 길이"는 인용된 값 사이의 임의의 길이, 예를 들면, 50, 51, 52, 53 등; 100, 101, 102, 103 등; 150, 151, 152, 153 등; 200 내지 500의 모든 정수; 500 내지 1,000의 모든 정수 등을 의미한다. 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열은 천연 서열에서 발견되지 않는 추가의 뉴클레오타이드에 의해 하나 또는 두 말단에서 연장될 수 있다. 이러한 추가의 서열은, 본원에 기재

된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 어느 말단 또는 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 양 말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.

[0158] 또 다른 실시형태에서, 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편 또는 이의 상보성 서열에 적절한 내지 고도의 엄격한 조건하에 하이브리드화할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 하이브리드화 기술은 분자 생물학 기술분야에 공지되어 있다. 설명을 위해, 본원 제공된 폴리뉴클레오티드와 다른 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화를 시험하는 적절한 적절하게 엄격한 조건은 5×SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0)의 용액에서 예비세척; 50℃-60℃, 5×SSC에서 하룻밤 동안 하이브리드화; 이어서 각각 0.1% SDS를 함유하는 2×, 0.5× 및 0.2×SSC로 65℃에서 20분 동안 2 회 세척을 포함한다. 당해 기술분야의 숙련가는 하이브리드화의 엄격성이, 예를 들면, 하이브리드화 용액의 염 함량 및/또는 하이브리드화가 수행되는 온도를 변화시킴으로써 용이하게 관리될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 다른 실시형태에서, 적합한 고도 엄격한 하이브리드화 조건은, 하이브리드화 온도가, 예를 들면, 60℃-65℃ 또는 65℃-70℃로 증가되는 것을 제외하고는, 상술한 것들을 포함한다.

[0159] 특정한 실시형태에서, 상기 기재된 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 변이체, 단편 및 하이브리드화 서열은 CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩한다. 다른 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 본원에 구체적으로 기재된 항체 서열 뿐만 아니라 CD40에 적어도 약 50%, 적어도 약 70% 및 특정한 실시형태에서 적어도 약 90% 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 CDR을 코딩한다. 추가의 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 항체보다 높은 친화성으로 CD40에 결합하는, 예를 들면, 본원에 구체적으로 기재된 항체 서열 뿐만 아니라 적어도 약 105%, 106%, 107%, 108%, 109% 또는 110% 정량적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 CDR을 코딩한다.

[0160] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 대표적인 폴리펩티드(예를 들면, 본원에 제공된 변이체 CD40-특이적 항체, 예를 들면, 본원에 기재된 항원-결합 단편을 갖는 항체 단백질)의 3차원 구조의 측정은 통상의 방법을 통해 이루어질 수 있고, 이에 의해 선택된 천연 또는 비천연 아미노산을 갖는 하나 이상의 아미노산의 치환, 부가, 결실 또는 삽입은 이렇게 유도된 구조적 변이체가 본원에 기재된 종의 공간-충전 특성을 보유하는지를 측정할 목적으로 실질적으로 모델링될 수 있다. 다양한 컴퓨터 프로그램은, 예를 들면, 친화성이 유지되거나 보다 우수한 친화성이 달성되도록, 항체 내에서 적절한 아미노산 치환(또는 당해 아미노산 서열을 코딩하는 적절한 폴리뉴클레오티드)을 결정하기 위해 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0161] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편은, 코딩 서열 자체의 길이와 무관하게, 다른 DNA 서열, 예를 들면, 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 기타 코딩 세그먼트 등과 조합되어, 이들의 전체 길이가 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용될 수 있는 것으로 고려되며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합체 DNA 프로토콜의 제조 용이성 및 용도에 의해 제한된다. 예를 들면, 약 10,000, 약 5000, 약 3000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50 염 기쌍 길이의 전체 길이를 갖는 예시적 폴리뉴클레오티드 세그먼트(모든 중간 길이를 포함)는 유용한 것으로 고려된다.

[0162] 폴리뉴클레오티드 서열을 비교하는 경우, 2개 서열은, 하기한 바와 같이 최대 대응을 위해 배열할 때에 2개 서열 내의 뉴클레오티드 서열이 동일한 경우에 "동일한" 것으로 말해진다. 2개 서열 사이의 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교하기 위해 비교 윈도우에 걸쳐 서열을 비교함으로써 수행된다. 본원에 사용된 "비교 윈도우"는, 2개 서열을 최적으로 배열한 후에 소정 서열을 동일한 수의 연속 위치의 참조 서열과 비교할 수 있는, 적어도 약 20개 연속 위치, 통상 30 내지 약 75, 40 내지 약 50개 연속 위치의 세그먼트를 지칭한다.

[0163] 비교를 위한 서열의 최적 배열은, 디펄트 파라미터를 사용하여, 생물정보학 소프트웨어의 레이저진 스위트(DNASTAR, Inc., Madison, WI)에서 메가라인 프로그램을 사용하여 수행할 수 있다. 이 프로그램은 하기 참조문헌에 기재된 몇몇 배열 도식을 실시한다[참조: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., *Unified Approach to Alignment and Phylogenies*, pp. 626-645 (1990); *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., *CABIOS* 5:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., *CABIOS* 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., *Comb. Theor* 11:105

(1971); Santou, N. Nes, M., *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726-730 (1983)].

- [0164] 대안적으로, 비교를 위한 서열의 최적 배열은 국소 동일성 알고리즘[참조: Smith and Waterman, *Add. APL. Math* 2:482 (1981)], 동일성 배열 알고리즘[참조: Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)], 유사성 방법의 연구[참조: Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988)], 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행[참조: GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA, the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI] 또는 검사에 의해 수행할 수 있다.
- [0165] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 측정하는데 적합한 알고리즘의 한 가지 바람직한 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 문헌[참조: Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977), and Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 각각 기재되어 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은, 예를 들면, 본원에 기재된 파라미터와 함께 사용되어, 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 중에서 서열 동일성 퍼센트를 측정할 수 있다. BLAST 분석을 실시하는 소프트웨어는 국립 생물공학 정보 센터(the National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용가능하다. 한 가지 예시적 예에서, 누적 스코어는, 뉴클레오티드 서열의 경우, 파라미터 M(매칭 잔기 쌍에 대한 보상 스코어; 항상 > 0) 및 N(미스매칭 잔기에 대한 벌점 스코어; 항상 < 0)을 사용하여 계산할 수 있다. 각 방향에서 단어 맞춤의 확장은, 누적 정렬 스코어가 이의 최대 달성된 값으로부터 양 X에 의해 저하되는 경우; 누적 스코어가 하나 이상의 음성-스코어 잔기 정렬의 누적에 기인하여 0 이하로 되는 경우; 또는 어느 서열의 말단이 도달되는 경우에 중단한다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 당해 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오티드 서열의 경우)은 디플트로서 단어 길이(W) 11 및 예상치(E) 10, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스[참조: Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)] 정렬, (B) 50, 예상치(E) 10, M=5, N=-4 및 두 가닥의 비교를 사용한다.
- [0166] 특정한 실시형태에서, "서열 동일성 퍼센트"는 적어도 20개 위치의 치료 윈도우에 걸쳐 2개의 최적 배열된 서열을 비교함으로써 결정되며, 여기서 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오티드 서열 부분은, 2개 서열의 최적 배열을 위해 참조 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여, 20% 이하, 통상적으로 5 내지 15% 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 당해 퍼센트는, 매칭된 위치의 수를 수득하기 위해 동일한 핵산 염기가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 측정하고, 매칭된 위치 수를 참조 서열(즉, 윈도우 크기) 중의 전체 위치 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 퍼센트를 수득함으로써 계산된다.
- [0167] 유전자 코드의 축퇴의 결과로서, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 다수의 뉴클레오티드 서열이 존재한다는 것은 당해 기술분야의 숙련자에게 인지될 것이다. 이들 폴리뉴클레오티드 중 일부는, CD40에 결합하는 항체를 코딩하는 천연 또는 최초 폴리뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 최소 서열 동일성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용에서의 차이에 기인하여 달라지는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 의해 명백하게 고려된다. 특정한 실시형태에서, 포유동물 발현을 위해 코돈-최적화되는 서열은 구체적으로 고려된다.
- [0168] 따라서, 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 부위-특이적 돌연변이유발 등의 돌연변이유발 방법을 본원에 기재된 항체의 변이체 및/또는 유도체의 제조에 사용할 수 있다. 이러한 방법에 의해, 폴리펩티드 서열에서의 특이적 변형이 이들을 코딩하는 주요 폴리뉴클레오티드의 돌연변이유발을 통해 이루어질 수 있다. 이들 기술은, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 변화를 폴리뉴클레오티드에 도입함으로써, 하나 이상의 상기 고려사항을 도입한 서열 변이체를 제조 및 시험하는 간단한 방법을 제공한다.
- [0169] 부위-특이적 돌연변이유발은 충분한 수의 인접한 뉴클레오티드 뿐만 아니라 목적하는 돌연변이의 DNA 서열을 코딩하는 특이적 올리고뉴클레오티드 서열을 통해 돌연변이체의 생성을 가능하게 하여, 충분한 크기 및 서열 복잡성의 프라이머 서열을 제공하여 횡단되는 결실 접합부의 양 양태 위에 안정한 이중가닥을 형성한다. 돌연변이는 선택된 폴리뉴클레오티드 서열에서 사용되어, 폴리뉴클레오티드 자체의 특성을 개선, 변경, 감소, 변형 또는 달리 변화시키고/시키거나 코딩된 폴리펩티드의 특성, 활성, 조성, 안정성 또는 1차 서열을 변화시킬 수 있다.
- [0170] 특정한 실시형태에서, 본 발명자들은 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하여 코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 특성, 예를 들면, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 친화성 또는 특정 Fc 영역의 작용, 또는 특정 Fc γR에 대한 Fc 영역의 친화성을 변화시키는 폴리뉴클레오티드 서열의 돌연변이유발을 고려한다. 부위-특이적 돌연변이유발 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 둘 다의 변이체를 생성하기 위해 광범위하게 사용되고 있다. 예를 들면, 부위-특이적 돌연변이유발은 종종 DNA 분자의 특정 부분을 변화시키기 위해 사용된다. 이러한 실시형태에서, 전형적으로 약 14 내지 약 25개 뉴클레오티드

길이를 포함하는 프라이머가 사용되고, 서열의 접합부의 양 양태에 약 5 내지 약 10개 잔기가 변화된다.

- [0171] 당해 기술분야의 숙련가에게 인지되는 바와 같이, 부위-특이적 돌연변이유발 기술에는 종종 단쇄 및 이중쇄 형태 둘 다에 존재하는 파지 벡터가 사용되어 왔다. 부위-유도된 돌연변이유발에 유용한 전형적인 벡터는 M13 파지 등의 벡터를 포함한다. 이들 파지는 상업적으로 용이하게 입수가능하고, 이들의 용도는 당해 기술분야의 숙련가에게 일반적으로 공지되어 있다. 이중쇄 플라스미드는 또한 목적하는 유전자를 플라스미드로부터 파지로 전달하는 단계를 생략하는 부위 지시된 돌연변이유발에 통상 사용된다.
- [0172] 일반적으로, 본 발명에 따르는 부위-지시된 돌연변이유발은 먼저 단쇄 벡터를 수득하거나, 목적하는 펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 이의 서열내에 포함하는 이중쇄 벡터의 2개 가닥을 별도로 용해시킴으로써 수행된다. 목적하는 돌연변이된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 일반적으로 합성에 의해 제조한다. 이어서, 이 프라이머를 단쇄 벡터와 어닐링시키고, 이. 콜라이 폴리머라제 I 클레노브 단편 등의 DNA 중합화 효소로 처리하여 돌연변이 함유 가닥의 합성을 완성한다. 따라서, 이중성 이중가닥이 형성되고, 여기서 하나의 가닥은 최초 비-돌연변이된 서열을 코딩하고, 제2 가닥은 목적하는 돌연변이를 함유한다. 이어서, 이러한 이중성 이중가닥 벡터는 이. 콜라이 등의 적절한 세포를 형질전환시키는데 사용되고, 돌연변이된 서열 배열을 함유하는 재조합체 벡터를 포함하는 클론이 선택된다.
- [0173] 부위-지시된 돌연변이유발을 사용하여 선택된 펩티드-코딩 DNA 세그먼트의 서열 변이체의 제조는 잠재적으로 유용한 종을 생성하는 수단을 제공하고, 펩티드 및 이들을 코딩하는 DNA 서열의 서열 변이체가 수득될 수 있는 기타 방법으로 제한하는 것을 의미하지 않는다. 예를 들면, 목적하는 펩티드 서열을 코딩하는 재조합체 벡터는 돌연변이유발체, 예를 들면, 하이드록실아민으로 처리하여 서열 변이체를 수득할 수 있다. 이들 방법 및 프로토콜에 관한 구체적 상세는 문헌[참조: Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; and Maniatis et al., 1982, 각각은 당해 목적을 위해 본원에서 참조로서 도입된다]의 교시에서 발견된다.
- [0174] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오타이드 지시된 돌연변이유발 공정"은 주형-의존성 공정 및 벡터-매개된 전파를 지칭하고, 이는 이의 초기 농도와 비교하여 특정한 핵산 분자의 농도의 증가 또는 증폭 등의 검출가능한 신호의 농도의 증가를 야기한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오타이드 지시된 돌연변이유발 공정"은 프라이머 분자의 주형-의존적 연장을 수반하는 공정을 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 주형 의존적 공정은 RNA 또는 DNA 분자의 핵산 합성을 지칭하고, 여기서 핵산의 새롭게 합성된 가닥의 서열은 상보성 염기 쌍의 공지된 법칙에 의해 지시된다[참조: Watson, 1987]. 전형적으로, 벡터 매개된 방법은 DNA 또는 RNA 벡터 내로 핵산 단편의 도입, 당해 벡터의 클론 증폭 및 증폭된 핵산 단편의 회수를 수반한다. 이러한 방법의 예는 본원에서 이의 전체가 참조로서 구체적으로 도입된 미국 특허 제4,237,224호에 제공된다.
- [0175] 폴리펩티드 변이체의 생성을 위한 또 다른 방법에서, 미국 특허 제5,837,458호에 기재된 바와 같은 순환 서열 재조합을 사용할 수 있다. 이러한 방법에서, 재조합 및 스크리닝 또는 선별의 반복 사이클은, 예를 들면, 증가된 결합 친화성을 갖는 개개 폴리뉴클레오타이드 변이체를 "발달"시키기 위해 수행된다. 특정한 실시형태는 또한 작제물을, 본원에 기재된 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태로 제공한다.
- [0176] 다수의 실시형태에서, 당해 모노클로날 항체를 코딩하는 핵산이 직접 숙주 세포 내로 도입되고, 당해 세포는 코딩된 항체의 발현을 유도하기에 충분한 조건하에 배양된다. 본 발명의 항체는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 표준 기술을 사용하여 본원에 기재된 폴리펩티드 및 핵산 서열과 조합하여 제조된다. 당해 폴리펩티드 서열은 본원에 기재된 특정 항체를 코딩하는 적절한 핵산 서열을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 핵산 서열은, 당해 기술분야의 통상의 숙련가에게 공지된 표준 방법에 따라 다양한 발현 시스템에 대한 특정 코돈 "선호도"를 반영하기 위해 최적화될 수 있다.
- [0177] 특정한 관련 실시형태에 따라, 본원에 기재된 하나 이상의 작제물을 포함하는 재조합체 숙주 세포; 임의의 항체, CDR, VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 핵산 또는 이의 항원-결합 단편; 및 코딩 핵산으로부터의 발현을 포함하는, 코딩된 생성물의 생성 방법이 제공된다. 발현은 적절한 조건하에 핵산을 함유하는 재조합체 숙주 세포를 배양함으로써 달성할 수 있다. 발현에 의한 생성 후, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 적합한 기술을 사용하여 분리 및/또는 정제할 수 있고, 이어서 필요에 따라 사용할 수 있다.
- [0178] 본원에서 제공되고 핵산 분자 및 벡터를 코딩하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 예를 들면, 이들의 천연 환경으로부터, 실질적으로 순수한 또는 균질한 형태로 또는, 핵산의 경우에, 목적하는 작용을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열 이외에 본래 핵산 또는 유전자를 포함하지 않거나 실질적으로 포함하지 않는 형태로 분리 및/

또는 정제할 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고, 전체적으로 또는 부분적으로 합성할 수 있다. 본원에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 대한 참조는 지정된 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고, 달리 명시하지 않는 한, T가 U로 치환되어 있는 지정된 서열을 갖는 RNA 분자를 포함한다.

[0179] 각종 상이한 숙주 세포에서 폴리펩티드를 클로닝 및 발현시키는 시스템은 공지되어 있다. 적합한 숙주 세포는 세균, 포유동물 세포, 효모 및 바쿨로바이러스 시스템을 포함한다. 이중성 폴리펩티드를 발현시키기 위해 당해 기술분야에서 이용가능한 포유동물 세포주는 차이나이즈 햄스터 난소 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 세포, NSO 마우스 흑색종 세포 등을 포함한다. 통상 바람직한 세균 숙주는 이. 콜라이이다.

[0180] 이. 콜라이 등의 원핵 세포에서 항체 및 항원-결합 단편의 발현은 당해 기술분야에서 잘 확립되어 있다. 조사를 위해, 문헌[참조: Pluckthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)]을 참조한다. 배양중 진행 세포에서의 발현은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하기 위한 옵션으로서 당해 기술분야의 숙련가에게 또한 이용가능하다[참조: 최근 연구, 예를 들면, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J. J. *et al.* (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560].

[0181] 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자, 및 적절한 경우 기타 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하는 적합한 벡터가 선택 또는 작제될 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스(예: 파지) 또는, 적절한 경우, 파지미드일 수 있다. 추가의 상세는 문헌[참조: Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press]을 참조한다. 예를 들면, 핵산 작제물의 제조, 돌연변이유발, 서열분석, 세포 내로의 DNA의 도입 및 유전자 발현에서 핵산의 조작, 및 단백질 분석을 위한 다수의 공지된 기술 및 프로토콜은 문헌[참조: Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992] 또는 이에 대한 후속 업데이트에 상세히 기재되어 있다.

[0182] 용어 "숙주 세포"는, 본원에 기재된 하나 이상의 항체를 코딩하는 핵산 서열이 도입되거나 도입될 수 있고 목적하는 선택된 유전자, 예를 들면, 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 유전자를 추가로 발현시키거나 발현시킬 수 있는 세포를 지칭하기 위해 사용된다. 당해 용어는, 선택된 유전자가 존재하는 한, 자손이 최초 모체의 형태 또는 유전자 구성과 동일하든지 또는 동일하지 않든지, 모 세포의 자손을 포함한다. 따라서, 이러한 핵산을 숙주 세포에 도입하는 것을 포함하는 방법이 고려된다. 도입은 임의의 이용가능한 기술을 사용할 수 있다. 진핵생물 세포의 경우, 적합한 기술은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공, 리포솜-매개된 형질감염 또는 레트로바이러스 또는 기타 바이러스, 예를 들면, 백시니아 또는 (곤충 세포의 경우) 바쿨로바이러스를 사용한 형질도입을 포함할 수 있다. 세균 세포의 경우, 적합한 기술은 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 사용한 형질감염을 포함할 수 있다. 당해 도입은, 후속적으로, 예를 들면, 유전자의 발현을 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양함으로써 핵산으로부터의 발현을 유발하거나 가능하게 한다. 일 실시형태에서, 핵산은 숙주 세포의 계놈(예: 염색체) 내로 통합된다. 통합은 표준 기술에 따라 계놈과의 재조합을 촉진시키는 서열의 함유에 의해 촉진될 수 있다.

[0183] 본 발명은 또한, 특정한 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD40-특이적 항체 등의 특정 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 발현 시스템에서 상기 언급된 작제물의 사용을 포함하는 방법을 제공한다. 용어 "형질도입"은 통상 파지에 의한 하나의 세균으로부터 다른 세균으로 유전자의 전달을 지칭하기 위해 사용된다. "형질도입"은 또한 레트로바이러스에 의한 진핵생물 세포 서열의 인식 및 전달을 지칭한다. 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외인성 또는 외래 DNA의 흡수를 지칭하기 위해 사용되고, 세포는, 외래 DNA가 세포 막 내부로 도입되는 경우에 "형질도입"된 것이다. 다수의 형질도입 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재되어 있다[참조: Graham *et al.*, 1973, Virology 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al.*, 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; and Chu *et al.*, 1981, Gene 13:197]. 이러한 기술은 적합한 숙주 세포 내로 하나 이상의 외래 DNA 잔기를 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0184] 본원에 사용된 용어 "형질전환"은 세포의 유전자 특성의 변화를 지칭하고, 세포는 새로운 DNA를 함유하도록 변형된 경우에 형질전환된 것이다. 예를 들면, 세포는 이의 천연 상태에서부터 유전자적으로 변형된 경우에 형질전환된 것이다. 형질감염 또는 형질도입 후, 형질전환 DNA는 당해 세포의 염색체 내로의 물리적 통합에 의해 세포의 DNA와 조합될 수 있거나, 복제되지 않고서 에피솜 요소로서 일시적으로 유지될 수 있거나, 플라스미드로서 독립적으로 복제될 수 있다. 세포는, DNA가 세포 분화와 함께 복제되는 경우에 안정하게 형질전환된 것으로 간주된다. 핵산 분자, 폴리펩티드, 숙주 세포 등과 같은 생물학적 물질과 관련하여 사용될 때의 용어 "천연 발생"

또는 "천연"은 자연에서 발견되고 인간에 의해 조작되지 않은 물질을 지칭한다. 유사하게는, 본원에서 사용된 "비천연 발생" 또는 "비-천연"은 자연에서 발견되지 않고 인간에 의해 구조적으로 변형되거나 합성된 물질을 지칭한다.

[0185] 용어 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드" 및 "당단백질"은 상호교대로 사용되고, 임의의 특정 길이로 한정되지 않는 아미노산의 중합체를 의미한다. 당해 의미는 미리스틸화, 설페이트화, 글리코실화, 포스포릴화 및 신호 서열의 부가 또는 결실 등의 변형을 배제하는 것은 아니다. 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 하나 이상의 아미노산 쇄를 의미하고, 여기서 각각의 쇄는 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산을 포함하고, 상기 폴리펩티드 또는 단백질은 천연 단백질, 즉 천연 발생 및 구체적으로는 비재조합 세포 또는 유전자-조작된 또는 재조합 세포에 의해 생성된 단백질의 서열을 갖는, 펩티드 결합에 의해 비공유 및/또는 공유 결합된 복수의 쇄를 포함할 수 있으며, 천연 단백질의 아미노산 서열을 갖는 분자, 또는 천연 서열의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 분자를 포함한다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 구체적으로는 본 발명의 CD40에 결합하는 항체, 또는 항-CD40 항체의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다. 따라서, "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 하나("단량체"로서 지칭됨) 또는 복수("다량체"로서 지칭됨)의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다.

[0186] 본원에서 언급된 용어 "단리된 단백질"은, 대상 단백질이 (1) 특성에서 통상적으로 밝혀질 수 있는 적어도 일부 기타 단백질을 함유하지 않고, (2) 동일한 공급원, 예를 들면, 동일한 종으로부터 기타 단백질을 본질적으로 함유하지 않고, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발견되고, (4) 적어도 약 50%의 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물 또는 특성상 관련되는 기타 물질로부터 분리되고, (5) "단리된 단백질"이 특성상 관련되는 단백질의 일부와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 관련되지 않고, (6) 특성상 관련되지 않는 폴리펩티드와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 작동가능하게 관련되거나, (7) 특성상 발생하지 않음을 의미한다. 이러한 단리된 단백질은 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 기타 RNA에 의해 코딩될 수 있거나, 합성 기원일 수 있거나 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 실시형태에서, 단리된 단백질은 실질적으로 이의 사용(치료, 진단, 예방, 연구 또는 다른 상태로)을 간섭하는 이의 자연 환경에서 발견된 단백질 또는 폴리펩티드 또는 기타 오염물질을 함유하지 않는다.

[0187] 용어 "폴리펩티드 단편"은 단량체 또는 다량체일 수 있고, 아미노-말단 결실, 카복실 말단 결실 및/또는 천연 발생 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩티드의 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500개 아미노산 길이의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450개 아미노산 길이라는 것이 인지된다. 특히 유용한 폴리펩티드 단편은 항원 결합 도메인 또는 항체의 단편을 포함하는 작용성 도메인을 포함한다. 항-CD40 항체의 경우에, 유용한 단편은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 다음을 포함한다: CDR 영역, 특히 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 영역; 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역; 항체 쇄의 부분 또는 단지 두 CDR을 포함하는 가변 영역 등.

[0188] 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 신호 (또는 리더) 서열을 포함할 수 있고, 이는 단백질의 전달을 공해독 또는 후해독에 의해 지시한다. 신호 펩티드를 포함하는 본원에 제공된 임의의 폴리펩티드 아미노산 서열은 또한 상기 신호 또는 리더 펩티드 없이 본원에서 기재된 임의의 용도로 예상된다. 통상의 숙련가에 의해 인지되는 바와 같이, 신호 펩티드는 일반적으로 처리 동안 개열되고, 활성 항체 단백질에 포함되지 않는다. 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드(예: 폴리-His)의 합성, 정제 또는 동정의 용이함을 위해 또는 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 향상시키기 위해 프레임에 융합시킬 수 있거나 링커 또는 기타 서열에 접합시킬 수 있다.

[0189] 펩티드 링커/스페이서 서열은 또한 각 폴리펩티드가 경우에 따라 이의 2차 및/또는 3차 구조물로 중첩된다는 것을 보장하기에 충분한 거리로 다수의 폴리펩티드 성분을 분리하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 펩티드 링커 서열은 당해 기술 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 융합 폴리펩티드로 도입될 수 있다.

[0190] 특정의 펩티드 스페이서 서열은, 예를 들면, (1) 가요성 연장 구조를 채택하는 이들의 능력; (2) 제1 및 제2 폴리펩티드 상에서 작용성 에피토프와 상호작용할 수 있는 2차 구조를 채택하는 이들의 무능; 및/또는 (3) 폴리펩티드 작용성 에피토프와 반응할 수 있는 소수성 또는 하전된 잔기의 부족에 기반하여 선택될 수 있다.

[0191] 하나의 예시적 실시형태에서, 펩티드 스페이서 서열은, 예를 들면, Gly, Asn 및 Ser 잔기를 함유한다. 기타 거의 중성 아미노산, 예를 들면, Thr 및 Ala도 또한 스페이서 서열에 포함될 수 있다.

- [0192] 스페이서로 유용하게 사용될 수 있는 기타 아미노산 서열은 문헌[참조: Maratea et al., Gene 40:39 46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); 미국 특허 제4,935,233호 및 미국 특허 제4,751,180호]에 기재된 것들을 포함한다.
- [0193] 기타 예시적 스페이서는, 예를 들면, Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp[참조: Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070] 및 Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp[참조: Bird et al., 1988, Science 242:423-426]를 포함할 수 있다.
- [0194] 일부 실시형태에서, 스페이서 서열은, 제1 및 제2 폴리펩티드가 작용성 도메인을 분리하고, 입체 간섭을 억제하기 위해 사용될 수 있는 비필수 N-말단 아미노산 영역을 갖는 경우에는 필요하지 않다. 두 코딩 서열은 임의의 스페이서 없이 직접 또는, 예를 들면, 1 내지 3회 반복된 펜타머 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser로 이루어진 가요성 폴리링커를 사용하여 융합시킬 수 있다. 이러한 스페이서는 VH와 VL 사이에 삽입시킴으로써 단쇄 항체(scFv)를 작제하는데 사용되었다[참조: Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5979-5883].
- [0195] 펩티드 스페이서는, 특정 실시형태에서, 단쇄 항체의 가변 영역을 형성하는 두 베타-시트 사이의 상호작용을 고정할 수 있도록 설계된다.
- [0196] 특정의 예시적 실시형태에서, 펩티드 스페이서는 1 내지 5 아미노산 사이, 5 내지 10 아미노산 사이, 5 내지 25 아미노산 사이, 5 내지 50 아미노산 사이, 10 내지 25 아미노산 사이, 10 내지 50 아미노산 사이, 10 내지 100 아미노산 사이, 또는 임의의 중간 범위의 아미노산이다.
- [0197] 기타 예시적 실시형태에서, 펩티드 스페이서는 길이 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0198] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 예상된다. 예를 들면, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 향상시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 변형체는 적합한 뉴클레오타이드 변화를, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의쇄에 도입하거나 펩티드 합성으로 제조할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 내의 잔사로부터 결실, 및/또는 잔사의 삽입 및/또는 잔사의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 항체에 도달하기 위해 수행될 수 있고, 단 최종 작제물은 목적하는 특성(CD40에 결합하는 높은 친화성)을 포함한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치 변화와 같은 항체의 해독후 공정을 변경할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 대해 상기 기재된 임의의 변형 및 변경은 본 발명의 항체에 포함될 수 있다.
- [0199] 본 발명은 본원에서 기재된 항체의 변이체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형체 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 이의 CDR은 본원에 구체적으로 기재된 항체 서열 뿐만 아니라 CD40에 적어도 약 50%, 적어도 약 70%, 및 특정 실시형태에서는 적어도 약 90% 결합한다. 추가의 실시형태에서, 이러한 변형체 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 이의 CDR은 본원에 구체적으로 제시된 항체 서열 뿐만 아니라, 예를 들면, 적어도 약 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 또는 110% 정량적으로 결합하는 본원에 기재된 항체보다 높은 친화성으로 CD40에 결합한다.
- [0200] 특정한 실시형태에서, 대상 항체는 a) 본원에 기재된 항-CD40 항체의 중쇄 가변 영역과 적어도 80% 동일한, 적어도 95% 동일한, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 b) 본원에 기재된 항-CD40 항체의 경쇄 가변 영역과 적어도 80% 동일한, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다. 예시적 중쇄 및 경쇄 영역의 아미노산 서열은 서열번호 1 내지 56에 제시한다.
- [0201] 특정한 실시형태에서, 항체는 a) i. 아미노산 서열에서 본원에 기재된 선택 항체의 중쇄 CDR1 영역과 동일한 CDR1 영역; ii. 아미노산 서열에서 선택 항체의 중쇄 CDR2 영역과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 아미노산 서열에서 선택 항체의 중쇄 CDR3 영역과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 b) i. 아미노산 서열에서 선택 항체의 경쇄 CDR1 영역과 동일한 CDR1 영역; ii. 아미노산 서열에서 선택 항체의 경쇄 CDR2 영역과 동일한 CDR2 영역; 및 iii. 아미노산 서열에서 선택 항체의 경쇄 CDR3 영역과 동일한 CDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 항체는 특이적으로 선택 표적물(예: CD40)을 결합한다. 추가의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 변이체가 VH 및 VL 영역의 CDR 영역에서 최대 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 제외하고, 선택 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변이체

항체이다. 이와 관련하여, 선택 항체의 CDR 영역에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 특정 실시형태에서, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 아미노산 치환이 존재할 수 있다. 치환은 VH 및/또는 VL 영역 중의 CDR에서 존재할 수 있다[참조: Muller, 1998, Structure 6:1 153-1167].

[0202]

대표적인 폴리펩티드(예: 본원에서 제공된 변형체 CD40-특이적 항체, 예를 들면, 본원에서 제공된 항원 결합 단편을 갖는 항체 단백질)의 3차원 구조의 측정은 선택된 천연 또는 비천연 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환, 부가, 결실 또는 삽입이 그렇게 유도된 구조 변형체가 현재 기재된 종의 공간 충전 특성을 유지시키는지를 측정할 목적으로 실질적으로 모델링될 수 있도록 통상의 방법론을 통해 수행될 수 있다[참조: Donate et al., 1994 Prot. Sci. 3:2378; Bradley et al., Science 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., Science 310:638 (2005); Dietz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244 (2006); Dodson et al., Nature 450:176 (2007); Qian et al., Nature 450:259 (2007); Raman et al. Science 327:1014-1018 (2010)]. 이들 및 관련 실시형태, 예를 들면, 본원에서 제공된 이의 CD40-특이적 항체 항원 결합 도메인의 합리적 설계를 위해 사용될 수 있는 컴퓨터 알고리즘의 일부 추가의 비제한적인 예는 3D 그래픽 및 빌트-인 스크립팅을 사용하여 거대한 생체분자 시스템을 표시하고 애니메이션화하고 분석하기 위한 분자 가시화 프로그램인 VMD를 포함한다[참조: the website for the Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois at Urbana-Champaign, at ks.uiuc.edu/Research/vmd/]. 많은 기타 컴퓨터 프로그램은 당해 분야에 공지되어 있고, 통상의 숙련가에게 이용가능하고, 에너지 최소화 구조의 공간 충전 모델(반 데르 발스 반경)으로부터 원자 치수를 측정하도록 하고; 상이한 화학적 그룹에 대한 높은 친화성 영역을 측정하여 결합을 향상시키는 것을 추구하는 GRID, 수학적 정렬을 계산하는 몬테 카를로(Monte Carlo) 연구, 및 힘 장 계산을 평가하는 CHARMM[참조: Brooks et al. (1983) J. Comput. Chem. 4:187-217] 및 AMBER[참조: Weiner et al (1981) J. Comput. Chem. 106: 765] 및 분석[참조: Eisenfield et al. (1991) Am. J. Physiol. 261:C376-386; Lybrand (1991) J. Pharm. Belg. 46:49-54; Froimowitz (1990) Biotechniques 8:640-644; Burbam et al. (1990) Proteins 7:99-111; Pedersen (1985) Environ. Health Perspect. 61:185-190; and Kini et al. (1991) J. Biomol. Struct. Dyn. 9:475-488]이 공지되었다. 각종 적합한 전산 컴퓨터 프로그램이 또한, 예를 들면, 슈뢰딩거(Schrodinger)(Munich, Germany)로부터 시판된다.

[0203]

본 발명의 또 하나의 실시형태에서, 항-CD40 항체 및 이의 인간화된 버전은 래빗 모노클로날 항체로부터 유도되고, 특히 RabMab® 기술을 사용하여 생성된다. 이들 항체들은, 이들이 최소 서열 변형을 필요로 하고, 이에 의해 돌연변이 혈통 가이드된(MLG) 인간화 기술을 사용한 인간화후 작용성 특성의 유지를 촉진시킬 때 유리하다(참조: 미국 특허 제7,462,697호). 따라서, 본 발명의 항-CD40 항체를 제조하기 위한 예시적 방법은, 예를 들면, 미국 특허 제5,675,063호 및 제7,429,487호에 기재된 RabMab® 래빗 모노클로날 항체 기술을 포함한다. 이와 관련하여, 특정 실시형태에서, 본 발명의 항-CD40 항체는 래빗에서 생성된다. 특정한 실시형태에서, 래빗 비장 세포와 융합할 수 있는 래빗 유래된 불멸 B-림프구를 사용하여 항체를 생성하는 하이브리드 세포를 생성한다. 불멸의 B-림프구는 내생적 면역글로불린 중쇄를 검출가능하게 발현하지 않고, 특정 실시형태에서는 변화된 면역글로불린 중쇄 코딩 유전자를 함유할 수 있다.

[0204]

조성물 및 사용 방법

[0205]

본 발명은 CD40-특이적 항체를 포함하는 조성물, 이의 항원 결합 단편 및 각종 치료학적 세팅에서 이러한 조성물의 투여를 제공한다.

[0206]

본원에서 기재된 CD40-특이적 항체의 순수한 형태 또는 적합한 약제학적 조성물로의 투여는 유사한 유용성을 제공하기 위한 제제의 임의의 허용되는 투여 방식을 통해 수행될 수 있다. 약제학적 조성물은 항체 또는 항체 함유 조성물을 적합한 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 배합하여 제조될 수 있고, 고체, 반고체, 액체 또는 기상 형태의 제제, 예를 들면, 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 연고제, 용액제, 좌제, 주사액, 흡입제, 젤제, 미소구 및 에어로졸로 제형화될 수 있다. 또한, 기타 약제학적 활성 성분(본원 다른 곳에서 기재된 기타 항암제를 포함) 및/또는 적합한 부형제, 예를 들면, 염, 완충제 및 안정화제는, 필요하지는 않지만, 조성물 내에 존재할 수 있다. 투여는 경구, 비경구, 비내, 정맥내, 피내, 피하 또는 국소를 포함하는 각종 상이한 경로로 달성될 수 있다. 바람직한 투여 방식은 치료하거나 예방하려는 상태의 특성에 좌우된다. 투여 후, 암의 진행 및/또는 전이를 감소시키고, 억제하고, 예방하거나 지연시키는 양은 효과적이라고 간주된다.

[0207]

특정 실시형태에서, 투여되는 양은 생존가능한 종양의 양에서 통계학상 유의적 감소, 예를 들면, 적어도 종양 질량의 50% 감소 또는 변경된(예: 통계학상 유의성과 함께 감소된) 스캔 치수로 지시된 바와 같이, 종양 퇴화를

유도하기에 충분하다. 기타 실시형태에서, 투여되는 양은 숙련된 임상에게 공지된 특별한 질환 징후의 증상에서 임상적으로 관련된 감소를 유도하기에 충분하다.

- [0208] 정확한 투약량 및 치료 지속 기간은 치료될 질환의 함수이고, 공지된 시험 프로토콜을 사용하여 실험적으로 또는 당해 분야에 공지된 모델 시스템에서 조성물을 시험하고 이로부터 추정하여 측정할 수 있다. 통제된 임상 실험도 또한 수행될 수 있다. 용량은 또한 경감될 상태의 중증도에 따라서 변할 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 치료학적으로 유용한 효과를 발휘하기 위해 제형화되고 투여된다. 당해 조성물은 한번에 투여될 수 있거나 시간 간격으로 투여되는 다수의 적은 용량으로 분배될 수 있다. 임의의 특별한 환자의 경우, 특별한 용량 섭생이 개제 필요에 따라 경시적으로 조정될 수 있다.
- [0209] CD40-특이적 항체 함유 조성물은 단독으로 또는 기타 공지된 암 치료, 예를 들면, 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광역학적 요법 등과 함께 투여될 수 있다. 당해 조성물은 또한 항체와 함께 투여될 수 있다.
- [0210] 따라서, 이러한 및 관련 약제학적 조성물의 통상적인 투여 경로는, 제한 없이, 경구, 국소, 경피, 흡입, 비경구, 설하, 구강, 직장, 질 및 비강내를 포함한다. 본원에 사용된 용어 비경구는 피하 주입, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 본 발명의 특정 실시형태에 따르는 약제학적 조성물은 함유된 활성 성분이 환자에게 조성물의 투여시 생체이용 가능하도록 허용하기 위해 제형화된다. 대상 또는 환자에게 투여될 조성물은 하나 이상의 투약 단위의 형태를 취할 수 있고, 예를 들면, 정제는 단일 투약 단위로 존재할 수 있고, 에어로졸 형태의 본원에 기재된 CD40-특이적 항체의 용기는 복수의 투약 단위를 유지시킬 수 있다. 이러한 투약 형태의 실제 제조방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있거나 자명하고, 예를 들면, 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)]을 참조한다. 투여될 조성물은 어떠한 경우에도 본원 교시에 따라 관심이 있는 질환 또는 상태를 치료하기 위한 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 함유한다.
- [0211] 약제학적 조성물은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 담체(들)는 미립자여서 조성물은, 예를 들면, 정제 또는 산제 형태로 존재한다. 담체(들)는 액체일 수 있고, 따라서 조성물은, 예를 들면, 경구 오일, 주사가능한 액체 또는 에어로졸이고, 이는, 예를 들면, 흡입 투여하는데 유용하다. 경구 투여용으로 의도될 경우, 약제학적 조성물은 바람직하게는 고체 또는 액체 형태로 존재하고, 반고체, 반액체, 현탁액 및 겔 형태는 고체 또는 액체로서 본원에서 간주된 형태에 포함된다.
- [0212] 경구 투여용 고체 조성물로서, 약제학적 조성물은 산제, 과립제, 압축 정제, 환제, 캡슐제, 추잉 껌, 웨이퍼 등으로 제형화될 수 있다. 이러한 고체 조성물은 통상적으로 하나 이상의 불활성 희석제 또는 식용가능한 담체를 함유한다. 또한, 다음 중 하나 이상이 존재할 수 있다: 결합제, 예를 들면, 카복시메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스, 검 트라카간트 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들면, 전분, 락토스 또는 텍스트린, 붕해제, 예를 들면, 알긴산, 소듐 알기네이트, 프리모겔, 옥수수 전분 등; 윤활제, 예를 들면, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로텍스; 활주제, 예를 들면, 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예를 들면, 수크로스 또는 사카린; 향미제, 예를 들면, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제; 및 착색제. 약제학적 조성물이 캡슐제, 예를 들면, 젤라틴 캡슐 형태로 존재할 경우, 이는, 상기한 형태의 물질 이외에, 액체 담체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜 또는 오일을 함유할 수 있다.
- [0213] 약제학적 조성물은 액체 형태, 예를 들면, 엘릭시르, 시럽, 용액, 에멀전 또는 현탁액으로 존재할 수 있다. 액체는, 두 예로서, 경구 투여용 또는 주사 전달용으로 존재할 수 있다. 경구 투여용으로 의도될 경우, 바람직한 조성물은, 본 화합물 이외에, 하나 이상의 감미제, 방부제, 염료/착색제 및 향 증강제를 함유한다. 주사로 투여되도록 의도된 조성물에, 하나 이상의 계면활성제, 방부제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 및 등장성 제제가 포함될 수 있다.
- [0214] 액체 약제학적 조성물은, 이들이 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태이든, 하나 이상의 다음 보조제를 포함할 수 있다: 멸균 희석액, 예를 들면, 주사용수, 식염수, 바람직하게는 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 불활성 오일, 예를 들면, 용매 또는 현탁화 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 향균제, 예를 들면, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 산화방지제, 예를 들면, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예를 들면, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들면, 아세트이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 긴장성 조정제, 예를 들면, 염화나트륨 또는 텍스트로스. 비경구 제제는 앰플, 1회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다수 투약 바이알에 포함될 수 있다. 생리 식염수가 바람직한 보조제이다. 주사가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.

- [0215] 비경구 또는 경구 투여용으로 의도된 액체 약제학적 조성물은 적합 용량이 수득되도록 본원에서 기재된 바와 같이 CD40-특이적 항체의 양을 함유해야 한다. 통상적으로, 이 양은 조성물 중의 항체의 적어도 0.01%이다. 경구 투여용으로 의도될 경우, 이 양은 0.1 내지 약 70 중량%의 조성물이도록 가변적일 수 있다. 특정의 경구 약제학적 조성물은 약 4% 내지 약 75%의 항체를 함유한다. 특정 실시형태에서, 본 발명에 따르는 약제학적 조성물 및 제제는 비경구 투약 단위가 회석 전에 항체를 0.01 내지 10 중량% 함유하도록 제조된다.
- [0216] 약제학적 조성물은 국소 투여용으로 의도될 수 있고, 이러한 경우, 담체는 적합하게는 용액, 에멀전, 연고 또는 겔 기제를 포함할 수 있다. 기제는, 예를 들면, 하나 이상의 다음 성분을 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀랍, 광유, 희석제, 예를 들면, 물 및 알콜, 및 유화제 및 안정화제. 증점제가 국소 투여용 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 경피 투여용으로 의도될 경우, 당해 조성물은 경피 패취 또는 이온 도입 장치를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은, 예를 들면, 직장에서 용융되어 약물을 방출시키는 좌제 형태로 직장 투여용으로 의도될 수 있다. 직장 투여용 조성물은 적합한 비자극성 부형제로서 유지성 기제를 함유할 수 있다. 이러한 기제는, 제한 없이, 라놀린, 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0217] 약제학적 조성물은 고체 또는 액체 투약 단위의 물리적 형태를 변형시키는 각종 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 당해 조성물은 활성 성분 주위에 코팅 셸을 형성하는 물질을 포함할 수 있다. 코팅 셸을 형성하는 물질은 통상적으로 불활성이고, 예를 들면, 당, 셀락 및 기타 장 코팅제로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 젤리탄 캡슐로 싸일 수 있다. 고체 또는 액체 형태의 약제학적 조성물은 본 발명의 항체에 결합하여 화합물의 전달에 도움을 주는 제제를 포함할 수 있다. 이러한 역량으로 작용할 수 있는 적합한 제제는 기타 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 하나 이상의 단백질 또는 리포솜을 포함한다. 약제학적 조성물은 본질적으로 에어로졸로서 투여될 수 있는 투약 단위로 구성될 수 있다. 용어 에어로졸은 콜로이드성 특성으로부터 압축된 팍키지로 이루어진 시스템에 이르는 각종 시스템을 나타내기 위해 사용된다. 전달은 약화 가스 또는 압축 가스에 의해 또는 활성 성분을 분배하는 적합한 펌프 시스템에 의한 것일 수 있다. 에어로졸은 활성 성분(들)을 전달하기 위해, 단일 상, 이-상 또는 삼-상 시스템으로 전달될 수 있다. 에어로졸의 전달은 필요한 용기, 활성화제, 밸브, 서브용기 등을 포함하고, 이는 함께 키트를 형성할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 과도한 실험 없이 바람직한 에어로졸을 결정할 수 있다.
- [0218] 약제학적 조성물은 약제 분야에서 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 주사 투여되도록 의도된 약제학적 조성물은 용액을 형성하기 위해 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체 및 임의로, 하나 이상의 염, 완충제 및/또는 안정화제를 포함하는 조성물을 멸균성 증류수와 배합함으로써 제조될 수 있다. 계면활성제를 첨가하여 균질한 용액 또는 현탁액의 형성을 촉진시킬 수 있다. 계면활성제는 수성 전달 시스템에서 항체의 용해 또는 균질한 현탁을 촉진시키기 위해 항체 조성물과 비공유적으로 상호작용하는 화합물이다.
- [0219] 조성물은 치료학적 유효량으로 투여될 수 있고, 이는 사용되는 특정 화합물(예: CD40-특이적 항체)의 활성; 화합물의 대사 안정성 및 작용 길이; 환자의 나이, 체중, 일반 건강, 성별 및 식이; 투여 방식 및 시간; 배출 속도; 약물 병용물; 특정 장애 또는 상태의 중증도; 및 치료를 경험하는 대상을 포함하는 각종 인자에 따라 변한다. 일반적으로, 치료학적으로 유효한 1일 투여량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 0.001mg/kg(즉, 0.07mg) 내지 약 100mg/kg(즉, 7.0g)이고; 바람직하게는 치료학적 유효량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 0.01mg/kg(즉, 0.7mg) 내지 약 50mg/kg(즉, 3.5g)이고; 보다 바람직하게는 치료학적 유효량은 (70kg 포유동물의 경우) 약 1mg/kg(즉, 70mg) 내지 약 25mg/kg(즉, 1.75g)이다.
- [0220] 본 발명의 CD40-특이적 항체를 포함하는 조성물은 또한 하나 이상의 기타 치료제의 투여와 함께 동시에, 투여 전에 또는 투여 후에 투여될 수 있다. 이러한 병용 요법은 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 추가의 활성제를 함유하는 단일 약제학적 투약 제형의 투여 뿐만 아니라 본 발명의 항체 및 그 자체의 개별 약제학적 투약 제형 중의 각 활성제를 포함하는 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원에서 기재된 항체 및 기타 활성제는 단일 경구 투약 조성물로, 예를 들면, 정제 또는 캡슐로 함께 환자에게 투여될 수 있거나, 각 제제는 별도의 경구 투약 제형으로 투여된다. 유사하게, 본원에서 기재된 항체 및 기타 활성제는 단일 비경구 투약 조성물, 예를 들면, 식염수 용액 또는 기타 생리학적으로 허용되는 용액으로 함께 환자에게 투여될 수 있거나, 각 제제는 별도의 비경구 투약 제형으로 투여된다. 별도의 투약 제형이 사용될 경우, 항체 및 하나 이상의 추가의 활성제를 포함하는 조성물은 본질적으로 같은 시간에, 즉 동시에, 또는 별도로 교차 시간에, 즉 순차적으로 및 임의의 순으로 투여될 수 있고; 병용 요법은 이들 섹션 모두를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0221] 따라서, 특정 실시형태에서, 하나 이상의 기타 치료제와 함께 본 발명의 항-CD40 항체 조성물의 투여가 또한 예상된다. 이러한 치료제는 본원에서 기재된 특별한 질환 상태, 예를 들면, 류마티스 관절염, 염증 또는 암의 표

준 치료로서 당해 기술 분야에서 허용될 수 있다. 예상되는 예시적 치료제는 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항-염증제, 화학요법제, 방사성요법제, 또는 기타 활성 및 보조제를 포함한다.

[0222]

특정 실시형태에서, 본원에서 기재된 항-CD40 항체는 임의의 수의 화학요법제와 함께 투여될 수 있다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들면, 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN™); 알킬 설포네이트, 예를 들면, 부실판, 임프로실판 및 피포실판; 아지리딘, 예를 들면, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민(알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 질소 머스타드, 예를 들면, 클로르암부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로로에타민, 메클로로에타민 옥사이드, 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들면, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들면, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사산물, 예를 들면, 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 동족체, 예를 들면, 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메토크세이트; 푸린 동족체, 예를 들면, 플루다라빈, 6-머캅토프린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 동족체, 예를 들면, 안시타빈, 아자시딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들면, 칼루스테론, 드로모스타놀론, 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예를 들면, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타; 엽산 보급제, 예를 들면, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미놀레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠론; 엘포르미틴; 엘립티움 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드로키우레아; 렌티난; 로니다민; 미토글루아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 페토스타틴; 펜아메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK.RTM.; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈테신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들면, 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 클루르암부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토프린; 메토크세이트; 백금 동족체, 예를 들면, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 셀로다; 아이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오메틸로미틴(DMFO); 레틴산 유도체, 예를 들면, Targretin™(백사로텐), Panretin™(알리트레티노인); ONTAK™(데닐류킨 디프티톡스); 에스페라미신; 카팩시타빈; 및 약제학적으로 허용되는 임의의 상기의 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 이 정의에, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 항-호르몬제, 예를 들면, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY1 17018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 항-안드로겐, 예를 들면, 플루타미드, 닐루타미드, 비갈루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 임의의 상기의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 또한 포함된다.

[0223]

각종 기타 치료제가 본원에서 기재된 항-CD40 항체와 함께 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항체는 항-염증제와 함께 투여된다. 항-염증제 또는 약물은 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부테소니드, 텍사메타손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론 포함), 아스피린을 포함하는 비스테로이드성 항-염증 약물(NSAIDS), 이부프로펜, 나프록센, 메토크세이트, 설파살라진, 레플루노미드, 항-TNF 약제, 사이클로포스파미드 및 미코페놀레이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0224]

예시적 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 억제제, 예를 들면, VIOXX®(로페콕시브) 및 CELEBREX®(셀레콕시브), 및 시알릴레이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 진통제는 아세트아미노펜, 옥시코돈, 프로포시펜, 하이드로클로라이드의 트라마돌로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 글루코코르티코이드는 코르티손, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론 또는 프레드니손으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 생물학적 반응 개질제는 세포 표면 마커에 대해 지시된 분자(예: CD4,

CD5 등), 사이토카인 억제제, 예를 들면, TNF 길항제(예: 에타네르셉(ENBREL[®]), 아달리루맵(HUMIRA[®]) 및 인플릭시맵(REMICADE[®])), 케모카인 억제제 및 접착 분자 억제제를 포함한다. 생물학적 반응 개질제는 모노클로날 항체 뿐만 아니라 분자의 재조합 형태를 포함한다. 예시적 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 메토트렉세이트, 페니실라민, 레플루노미드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 골드(경구 (오라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0225] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 사이토카인과 함께 투여된다. 본원에 사용된 "사이토카인"이란 세포 간 중재자로서 또 다른 세포 상에서 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질의 일반 명칭을 의미한다. 이러한 사이토카인의 예는 림포카인, 모노카인 및 전통적 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토카인에는 성장 호르몬, 예를 들면, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 과라갑상선 호르몬; 티로신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예를 들면, 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체형성 호르몬(LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반성 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 물리 억제 물질; 마우스 고나도트로핀 관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자, 예를 들면, NGF-베타; 혈소판 성장 인자; 형질전환 성장 인자(TGF), 예를 들면, TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린형 성장 인자-I 및 인슐린 성장 인자-II; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예를 들면, 인터페론-알파, 베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자(CSF), 예를 들면, 마크로파지-CSF(M-CSF); 과립구-마크로파지-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터류킨(ILs), 예를 들면, IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, 종양 괴사 인자, 예를 들면, TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용된 용어 사이토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터 단백질, 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0226] 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체를 포함하는 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 림프관 내성 NHL 및 백혈병, 자가면역 및 염증성 질환을 포함하는, 본원에서 기재된 질환으로 고통받고 있는 개체에게 투여될 수 있다. 자가면역 질환은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 관절염(류마티스 관절염, 반응성 관절염 포함), 전신 홍반성 낭창(SLE), 건선 및 염증성 장 질환(IBD), 뇌척수염, 포도막염, 중증근무력증, 다발성 경화증, 인슐린 의존성 당뇨병, 에디슨병, 셀리악병(celiac disease), 만성 피로 증후군, 자가면역성 간염, 자가면역성 탈모, 강직성 척추염, 궤양성 대장염, 크론병, 섬유근육통, 심상성 천포창, 쇼그렌 증후군, 가와사키병, 갑상선 기능 항진증/그레이브스병, 갑상선 기능 저하증/하시모토병, 자궁내막증, 경피증, 악성 빈혈, 굿 파스처 증후군(Goodpasture syndrome), 췌장-바레 증후군, 베게너병, 사구체신염, 재생 불량성 빈혈(복합적으로 수혈된 재생 불량성 빈혈 환자 포함), 재발성 야간 혈색소뇨증, 골수이형성 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 에반 증후군, 인자 VIII 억제제 증후군, 전신성 혈관염, 피부근염, 다발성근염 및 류마티스 열, 자가면역성 림프구성식성 증후군(ALPS), 자가면역성 수포성 유 천포창, 파킨슨병, 유육종증, 백반, 원발성 담즙성 간경변 및 자가면역 심근염을 포함한다.

[0227] 염증성 질환은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 크론병, 대장염, 피부염, 건선, 게실염, 간염, 민감성 장 증후군(IRS), 홍반성 낭창, 신염, 파킨슨병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증(MS), 알츠하이머병, 관절염, 류마티스 관절염, 천식, 및 각종 심혈관 질환, 예를 들면, 아테롬성 동맥경화증 및 맥관염을 포함한다. 특정 실시형태에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 당뇨병, 통풍, 크리오피린 관련 주기적 증후군, 및 만성 폐색성 폐 장애로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이와 관련하여, 한 실시형태는 이를 필요로 하는 환자에게 항-CD40 항체를 포함하는 본원에서 기재된 조성물의 치료학적 유효량을 투여함으로써 염증 또는 염증성 질환을 치료하고, 이의 중증도를 감소시키거나 이를 예방하는 방법을 제공한다.

[0228] 인간 질환을 치료하기 위한 생체내 사용을 위해, 본원에서 기재된 항체는 일반적으로 투여 전에 약제학적 조성물에 도입된다. 약제학적 조성물은 본원에 기재된 하나 이상의 항체를 본원 다른 곳에서 기재된 생리화적으로 허용되는 담체와 함께 포함한다. 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 하나 이상의 화합물의 유효량을 특별한 투여 방식에 적합한 것으로 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 임의의 약제학적 담체(들) 또는 부형제와 혼합한다. 약제학적 담체는 액체, 반고체 또는 고체일 수 있다. 비경구, 피내, 피하 또는 국소 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은, 예를 들면, 멸균성 희석제(예: 물), 식염수 용액, 불휘발성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항균제(예: 벤질 알콜 및 메틸 파라벤); 산화방지제(예: 아스

코르브산 및 중아황산나트륨) 및 킬레이트제(예: 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)); 완충제(예: 아세테이트, 시트레이트 및 포스페이트)를 포함할 수 있다. 정맥내로 투여될 경우, 적합한 담체는 생리 식염수 또는 포스페이트 완충된 식염수(PBS), 및 증점제 및 가용화제, 예를 들면, 글루코스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 이의 혼합물을 함유하는 용액을 포함한다.

[0229] 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체를 포함하는 조성물은 신체로부터 신속한 방출로부터 항체를 보호하는 담체, 예를 들면, 시간 방출 제형 또는 코팅으로 제조될 수 있다. 이러한 담체는 조절 방출 제형, 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 이식체 및 미세캡슐화 전달 시스템, 및 생체분해가능한, 생체적합성 중합체, 예를 들면, 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, PEG, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 기타를 포함한다.

[0230] CD40을 결합하는 항체를 사용하는 치료 방법이 본원에서 제공된다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 항체는 부 적당한 CD40의 발현을 포함하는 질환을 갖는 환자에게 투여되고, 이는 본 명세서의 문맥상, 예를 들면, 존재하는 단백질의 양의 변경(예: 통계학상 유의한 증가 또는 감소) 또는 돌연변이 단백질의 존재 또는 이들 둘 다에 기인하여 비정상 CD40 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환 및 장애를 포함하는 것을 의미한다. 과잉은 분자 수준에서의 과발현, 작용 부위에서 연장되거나 축적된 외관, 또는 보통 검출가능한 것에 비해 CD40의 증가된(예: 통계학상 유의한 방식으로) 활성을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 원인에 기인할 수 있다. 이러한 CD40의 과잉은 CD40 신호전달 사건의 표준 발현, 외관 또는 활성에 대해 측정될 수 있고, 이러한 측정은 본원에서 기재된 항체의 발생 및/또는 임상적 시험에서 중요한 역할을 할 수 있다.

[0231] 본 발명의 항체는 각종 암의 치료용으로 유용하다. 특정 실시형태에서, 본원에서 기재된 항체는 항종양 면역 반응을 활성화시킴으로써 항종양 활성을 발휘한다. 특정 실시형태에서, 본 항체는 CD40의 비정상적 발현과 관련되는 각종 암의 치료용으로 유용하다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 암 환자에게 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체의 치료학적 유효량을 투여하여, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 리툽시맵 내성 NHL 및 백혈병을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다. 투여 후, 암의 진행 및/또는 전이를 통계학상 유의한 방식으로(즉, 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 바와 같이 적합한 대조군과 비교하여) 억제하고, 예방하거나 지연시키는 양이 유효한 것으로 간주된다.

[0232] 또다른 실시형태는 암 환자에게 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체의 치료학적 유효량(예: 투여 후, 즉, 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 바와 같이 적합한 대조군에 비해 암의 진행 및/또는 전이를 통계학상 유의한 방식으로 억제하고, 예방하거나 지연시키는 양)을 투여하여, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 리툽시맵 내성 NHL 및 백혈병을 포함하는 암의 전이를 예방하는 방법을 제공한다.

[0233] 또다른 실시형태는 암 환자에게 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체의 치료학적 유효량을 투여하여, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 리툽시맵 내성 NHL 및 백혈병을 포함하는 암을 예방하는 방법을 제공한다.

[0234] 또다른 실시형태는 이들 질환 중의 하나 이상으로 고통받는 환자에게 본원에서 기재된 CD40-특이적 항체의 치료학적 유효량을 투여하여, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 유모 세포 백혈병, 급성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 췌장암, 결장암, 위장암, 전립선암, 방광암, 신장암, 난소암, 자궁경부암, 유방암, 폐암, 인두암, 악성 흑색종 및 리툽시맵 내성 NHL 및 백혈병을 치료하고, 이의 증상을 경감시키고, 이의 진행을 억제하거나 이들을 예방하는 방법을 제공한다.

[0235] 또다른 실시형태는 이들 질환 중의 하나 이상으로 고통받는 환자에게 본원에서 기재된 항-CD40 항체의 치료학적 유효량을 투여하여, 자가면역 질환을 치료하고, 이의 증상을 경감시키고, 이의 진행을 억제하거나 이들을 예방하는 방법을 제공한다. 이와 관련하여, 자가면역 질환은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 관절염(류마티스 관절염, 반응성 관절염 포함), 전신 홍반성 낭창(SLE), 건선 및 염증성 장 질환(IBD), 뇌척수염, 포도막염, 중증 근無力증, 다발성 경화증, 인슐린 의존성 당뇨병, 에디슨병, 셀리악병, 만성 피로 증후군, 자가면역성 간염, 자가면역성 탈모, 강직성 척추염, 췌양성 대장염, 크론병, 섬유근육통, 심상성 천포창, 쇼그렌 증후군, 가와사키 병, 갑상선 기능 항진증/그레이브스병, 갑상선 기능 저하증/하시모토병, 자궁내막증, 경피증, 악성 빈혈, 궤 과

스처 증후군, 켈랑-바레 증후군, 베게너병, 사구체신염, 재생 불량성 빈혈(복합적으로 수혈된 재생 불량성 빈혈 환자 포함), 재발성 야간 혈색소뇨증, 골수이형성 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 에반 증후군, 인자 VIII 억제제 증후군, 전신성 혈관염, 피부근염, 다발성근염 및 류마티스 열, 자가면역성 림프구증식성 증후군(ALPS), 자가면역성 수포성 유 천포창, 파킨슨병, 유육종증, 백반, 원발성 담즙성 간경변 및 자가면역 심근염을 포함한다.

[0236] 또 다른 실시형태는 이들 질환 중의 하나 이상으로 고통받는 환자에게 본원에서 기재된 항-CD40 항체의 치료학적 유효량을 투여하여, 염증성 질환을 치료하고, 이의 증상을 경감시키고, 이의 진행을 억제하거나 이들을 예방하는 방법을 제공한다. 염증성 질환은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 크론병, 대장염, 피부염, 건선, 궤양성 대장염, 간염, 민감성 장 증후군(IRS), 홍반성 낭창, 신염, 파킨슨병, 폐양성 대장염, 다발성 경화증(MS), 알츠하이머병, 관절염, 류마티스 관절염, 천식, 및 각종 심혈관 질환, 예를 들면, 아테롬성 동맥경화증 및 맥관염을 포함한다. 특정 실시형태에서, 염증성 질환은 류마티스 관절염, 당뇨병, 통풍, 크리오피린 관련 주기적 증후군, 및 만성 폐색성 폐 장애로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0237] 또다른 실시형태에서, 본 발명의 항-CD40 항체는 결합된 항원의 구조, 예를 들면, 구조 에피토프를 측정하는데 사용되고, 이어서 이 구조는, 예를 들면, 화학적 모델링 및 SAR 방법을 통해 이 구조를 갖거나 이 구조를 모방하는 화합물을 발생시키는데 사용될 수 있다.

[0238] 본 발명의 각종 기타 실시형태는 부분적으로 CD40을 발현시키는 세포 또는 조직의 존재를 검출하기 위한 진단학적 적용에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은, 예를 들면, CD40을 발현시키는 세포 또는 조직의 검출과 같은 샘플에서 CD40을 검출하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 면역조직화학(IHC), 면역세포화학(ICC), 동일 반응계 하이브리드화(ISH), 전체-마운트 동일반응계 하이브리드화(WISH), 형광 DNA 동일반응계 하이브리드화(FISH), 유동 세포 계측법, 효소 면역-검정(EIA), 및 효소 결합된 면역검정(ELISA)을 포함하는 각종 공지된 검출 포맷에 적용될 수 있다.

[0239] ISH는 세포 또는 조직(동일 반응계), 또는 조직이 충분히 작을 경우, 전체 조직(전체 마운트 ISH)의 부분 또는 절편에서 특이적 DNA 또는 RNA 서열을 국소화하기 위해 표지된 상보성 DNA 또는 RNA 가닥(즉, 1차 결합제)를 사용하는 하이브리드화의 일종이다. 당해 분야의 숙련가는, 이는 조직 절편에서 1차 결합제로서 항체를 사용하여 단백질을 국부화하는 면역조직화학으로부터 구분된다는 것을 이해한다. DNA ISH는 게놈 DNA에 사용하여 염색체의 구조를 측정할 수 있다. 형광성 DNA ISH(FISH)는, 예를 들면, 의학 진단에 사용되어 염색체 완전성을 평가할 수 있다. RNA ISH(하이브리드화 조직화학)는 조직 절편 또는 전체 마운트 내에서 mRNA 및 기타 전사물을 측정하고 국소화하는데 사용된다.

[0240] 각종 실시형태에서, 본원에서 기재된 항체는 직접 또는 간접적으로 검출될 수 있는 검출가능한 표지에 접합된다. 이와 관련하여, 항체 "접합체"는 검출가능한 표지에 공유 결합된 항-CD40 항체를 의미한다. 본 발명에서, DNA 프로브, RNA 프로브, 모노클로날 항체, 이의 항원 결합 단편, 및 이의 항체 유도체, 예를 들면, 단쇄-가변성 단편 항체 또는 에피토프 태그 항체는 모두 검출가능한 표지에 공유 결합될 수 있다. "직접 검출"에서, 단지 하나의 검출가능한 항체, 즉 1차 검출가능한 항체가 사용된다. 따라서, 직접 검출은, 검출가능한 표지에 접합된 항체가 제2 항체(2차 항체)를 첨가할 필요 없이 그 자체로 검출될 수 있다는 것을 의미한다.

[0241] "검출가능한 표지"는 샘플 중에 표지의 존재 및/또는 농도를 나타내는 검출가능한 (예를 들면, 시각적으로, 전자적으로 또는 다르게) 신호를 생성할 수 있는 분자 또는 물질이다. 항체에 접합될 때, 검출가능한 표지를 사용하여 표적물을 특이적 항체가 지시하는 곳에 위치시키고/시키거나 정량화할 수 있다. 이에 의해, 샘플 중의 표적물의 존재 및/또는 농도는 검출가능한 표지로 생성된 신호를 검출함으로써 검출할 수 있다. 검출가능한 표지는 직접 또는 간접적으로 검출될 수 있고, 상이한 특이적 항체에 접합된 다수의 상이한 검출가능한 표지는 하나 이상의 표적물을 검출하기 위해 병용하여 사용될 수 있다.

[0242] 직접 검출될 수 있는 검출가능한 표지의 예는 형광성 염료 및 방사활성 물질 및 금속 입자를 포함한다. 대조적으로, 간접적 검출은 1차 항체의 적용 후, 하나 이상의 추가의 항체, 즉, 2차 항체의 적용을 필요로 한다. 따라서, 검출은 1차 검출가능한 항체에 대한 2차 항체 또는 결합제의 결합의 검출에 의해 수행된다. 2차 결합제 또는 항체의 첨가를 필요로 하는 1차 검출가능한 결합제 또는 항체의 예는 효소 검출가능한 결합제 및 합텐 검출가능한 결합제 또는 항체를 포함한다.

[0243] 일부 실시형태에서, 검출가능한 표지는 (예: ISH, WISH, 또는 FISH 공정에서) 제1 결합제를 포함하는 핵산 중합체에 접합된다. 기타 실시형태에서, 검출가능한 표지는 (예: IHC 공정에서) 제1 결합제를 포함하는 항체에 접합

된다.

- [0244] 본 발명의 방법에 사용된 항체에 접합될 수 있는 검출가능한 표지의 예는 형광 표지, 효소 표지, 방사성 동위원소, 화학발광 표지, 전기화학발광 표지, 생물발광 표지, 중합체, 중합체 입자, 금속 입자, 합텐 및 염료를 포함한다.
- [0245] 형광 표지의 예는 5-(및 6)-카복시플루오레세인, 5- 또는 6-카복시플루오레세인, 6-(플루오레세인)-5-(및 6)-카복시아미도 핵산, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 테트라메틸로다민, 및 염료, 예를 들면, Cy2, Cy3, 및 Cy5, AMCA, PerCP를 포함하는 임의로 치환된 쿠마린, R-피코에리트린(RPE) 및 알로피코에리트린(APC)을 포함하는 피코빌리단백질, 텍사스 레드, 프린세톤 레드, 그린 형광성 단백질(GFP) 및 이의 동족체, 및 R-피코에리트린 또는 알로피코에리트린의 접합체, 무기 형광 표지, 예를 들면, 코팅된 CdSe 나노결정물과 같은 반도체 재료에 기반하는 물질을 포함한다.
- [0246] 중합체 입자 표지의 예는 형광성 염료로 매립될 수 있는, 폴리스티렌, PMMA 또는 실리카의 마이크로 입자 또는 라텍스 입자, 또는 염료, 효소 또는 기질을 함유하는 중합체 미셀 또는 캡슐을 포함한다.
- [0247] 금속 입자 표지의 예는 은 착색체에 의해 전환될 수 있는 금 입자 및 코팅된 금 입자를 포함한다. 합텐의 예는 DNP, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 비오틴 및 디곡시게닌을 포함한다. 효소 표지의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP), 알칼리성 포스파타제(ALP 또는 AP), β -갈락토시다제(GAL), 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제, β -N-아세틸글루코사미니다제, β -글루쿠로니다제, 인버타제, 크산틴 옥시다제, 반딧불이 루시페라제 및 글루코스 옥시다제(GO)를 포함한다. 서양고추냉이 퍼옥시다제용으로 통상 사용되는 기질의 예는 3,3'-디아미노벤지딘(DAB), 니켈 증대된 디아미노벤지딘, 3-아미노-9-에틸카바졸(AEC), 벤지딘 디하이드로클로라이드(BDHC), 헹커-에이즈(Hanker-Yates) 시약(HYR), 인도판 블루(IB), 테트라메틸벤지딘(TMB), 4-클로로-1-나프톨(CN), 알파.-나프톨 피로닌(.알파.-NP), o-디아니시딘(OD), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸륨(NBT), 2-(p-요오도페닐)-3-p-니트로페닐-5-페닐 테트라졸륨 클로라이드(INT), 테트라니트로 블루 테트라졸륨(TNBT), 5-브로모-4-클로로-3-인독실-베타-D-갈락토시드/페로-페리시아니드(BCIG/FF)를 포함한다.
- [0248] 알칼리성 포스파타제용으로 통상 사용되는 기질의 예는 나프톨-AS-B 1-포스페이트/신속 레드 TR(NABP/FR), 나프톨-AS-MX-포스페이트/신속 레드 TR(NAMP/FR), 나프톨-AS-B1-포스페이트/- 신속 레드 TR(NABP/FR), 나프톨-AS-MX-포스페이트/신속 레드 TR(NAMP/FR), 나프톨-AS-B1-포스페이트/신규 푸스친(NABP/NF), 브로모클로로인돌릴 포스페이트/니트로블루 테트라졸륨(BCIP/NBT), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-b--d-갈락토피라노시드(BCIG)를 포함한다.
- [0249] 발광 표지의 예는 루미놀, 이소루미놀, 아크리디늄 에스테르, 1,2-디옥세탄 및 피리도피리다진을 포함한다. 전기화학발광 표지의 예는 루테늄 유도체를 포함한다. 방사활성 표지의 예는 요오드, 코발트, 셀레늄, 트리튬, 탄소, 황 및 인의 방사활성 동위원소를 포함한다.
- [0250] 검출가능한 표지는 본원에서 기재된 항체 또는 흥미있는 생물학적 마커에 특이적으로 결합하는 임의의 기타 분자, 예를 들면, 항체, 핵산 프로브 또는 중합체에 결합될 수 있다. 또한, 당해 기술분야의 숙련가는, 검출가능한 표지는 또한 제2, 및/또는 제3, 및/또는 제4, 및/또는 제5의 결합제 또는 항체 등에 접합될 수 있다는 것을 인지한다. 또한, 통상의 숙련가는, 흥미있는 생물학적 마커를 특성화하는데 사용되는 각각의 추가의 결합제 또는 항체가 단일 증폭 단계로서 작용할 수 있다는 것을 인지한다. 생물학적 마커는, 예를 들면, 광 현미경, 형광 현미경, 전자 현미경을 사용하여 시각적으로 검출될 수 있고, 여기서 검출가능한 물질은, 예를 들면, 염료, 콜로이드성 금 입자, 발광성 시약이다. 생물학적 마커에 결합된 시각적으로 검출가능한 물질은 또한 분광광도계를 사용하여 검출할 수 있다. 검출가능한 물질이 방사활성 동위원소일 경우, 검출은 방사능사진촬영에 의해 시각적으로 또는 섬광 계수기를 사용하여 비시각적으로 수행될 수 있다[참조: Larsson, 1988, Immunocytochemistry: Theory and Practice, (CRC Press, Boca Raton, Fla.); Methods in Molecular Biology, vol. 80 1998, John D. Pound (ed.) (Humana Press, Totowa, N.J.)].
- [0251] 본 발명은 CD40 또는 샘플에서 CD40을 발현시키는 세포 또는 조직을 검출하기 위한 키트를 추가로 제공하고, 여기서, 키트는 본원에서 기재된 적어도 하나의 항체, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 숙주 세포를 함유한다. 특정 실시형태에서, 키트는 완충제, 효소, 표지, 기질, 비드 또는 본 발명의 항체가 부착된 기타 표면 등 및 사용 지침서를 포함할 수 있다.

- [0252] 실시예
- [0253] 실시예 1
- [0254] 항-CD40 항체의 생산 및 인간화
- [0255] 4마리의 뉴질랜드 흰색 래빗을 재조합 래빗 Fc-hCD40으로 면역화했다. 인간 CD40에 대한 특이적 결합의 최고 혈청 적정농도를 갖춘 래빗을 세포 융합을 위해 선택했다. 총 172개의 하이브리도마가 가용성 Fc-hCD40에 대한 양성 결합제로서 동정되었고, 이중 44개의 클론은 세포 표면 CD40에 대한 양성 결합제인 것으로 밝혀졌다. 에피토프 클러스터링 검정 후, 24개의 대표적 하이브리도마를 재조합 발현 및 추가의 특성화용으로 선택했다. 제2 작용성 스크리닝을 이하 추가로 기재된 바와 같이 수행했고, 1) CD80, CD83, CD86 상향조절에 의해 측정된 DC 성숙 유도(효능제 활성화); 2) 직접 종양 성장 억제의 유도(효능제 활성화); 및 3) ADCC 항체 효과기 기능을 포함했다. 후보자들은 두 개의 암: 1) 결합 친화성, 항체 내재화, 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 항체 의존성 세포 식세포작용(ADCP); 및 2) 효능제 DC 활성화/성숙 기능, 수용체-리간드 상호작용, 혼합 림프구 반응(MLR), 세포 증식 및 아폽토시스를 포함하는 이중 작용성 스크리닝에 기반하여 선택했다.
- [0256] 수지상 세포 성숙을 통한 효능제 항체 스크리닝
- [0257] 항-CD40 항체의 내부 패널의 효능제 또는 길항제 효과를 추가로 명백하게 하기 위해, DC 성숙 검정을 작용성 항체를 스크리닝하기 위한 지시계로서 사용했다. 항-CD40 또는 대조군 항체를 2일 동안 인간 단핵구-유도 DC 배양 용액에 첨가했다. 인간 수지상 세포의 최고 공지된 성숙 마커 중의 하나인 CD83의 상향조절을 측정하여 효능제 항체를 스크리닝했다. 수지상 세포 성숙을 유도하는 마우스 모노클로날 항체, 5C11은 양성 대조군으로 사용했다. 항체 R-3, R-6, R-8, R-9, R-16, R-18, R-24, R-33, R-36, 19-21, 19-45 및 19-59는 Ig 대조군에 비해 CD83 발현을 50% 이상 증가시켰다(도 1a). DC 성숙은 선택된 항체를 위한 공-자극 분자 CD80 및 CD86의 항체 유도 상향조절을 측정함으로써 추가로 측정했다. 도 1b 및 도 1c에 도시된 바와 같이, 항체 R-3, R-8, R-9, R-33 및 19-21은 CD80 및 CD86 둘 다를 상향조절하는 반면, 기타 항체는 단지 적당한 효과를 가졌다. 이러한 결과는 이들 항체에 의한 CD83 조절 효과와 일치했다. 흥미롭게, DC 성숙을 유도할 수 있는 항체들 중에서, 클론 19-21만이 혼합 림프구 반응에서 T 세포 증식을 증강시키는 강한 활성을 나타냈다(도 1d).
- [0258] 종양 성장의 직접 억제를 위한 스크리닝
- [0259] 효능제 항-CD40 항체의 패널을 CD40 발현 종양 세포의 종양 성장 억제를 유도하는 능력에 대해 추가로 평가했다. 시험된 모든 항-CD40 항체는 종양 세포 증식을 억제했다. 항체 19-21은 최고 효능을 입증했다(도 2).
- [0260] ADCC 활성을 위한 스크리닝
- [0261] APC 활성화 및 종양 성장 억제의 유도 이외에, 항체 효과기 기능, ADCC를 항체 후보자를 스크리닝하고 분류하기 위한 중요한 기준으로서 사용했다. 인간 PBMC를 사용하여 ADCC 검정을 사용하기 위해, 선택된 항체 모두를 래빗 Fab 및 인간 IgG1을 사용하여 래빗 mAb로부터 키메라 mAb로 전환시켰다. 도 3에 도시된 바와 같이, 선택된 후보자 모두가 IgG1 대조군에 비해 상당한 ADCC 활성을 나타냈다. 최대 ADCC 활성을 기준으로 하여, 선두 mAb는 다음과 같이 분류될 수 있다: cR-8 > cR-3 > cR-33 > c19-21 > cR-9 > C19-59.
- [0262] 4개 후보자(c19-21, cR-8, cR-3, cR-33)를 시험관내 작용성 스크리닝에 기반하여 선택했다. 이들 시험관내 특성화를 표 1에 요약한다. 항체 c19-21은 DC 활성화 및 종양 성장 억제를 강하게 증강시키는 반면, 항체 cR-8 및 cR-3은 보다 강력한 ADCC 활성을 나타냈다.

표 1

- [0263] 4개 후보자 항-CD40 항체의 특성:

항체	c19-21	cR-8	cR3	cR33
CD40L 결합의 차단	예	예	예	예
DC 성숙의 증강	강함	강함	강함	강함

전-아포토시스 활성(IC50)	0.02 $\mu\text{g/ml}$	0.45 $\mu\text{g/ml}$	0.57 $\mu\text{g/ml}$	0.90 $\mu\text{g/ml}$
ADCC(1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 라모스 세포의 세포독성(%))	26%	33%	30%	29%

[0264] 생체내 항-종양 활성 스크리닝

[0265] 상위 4개 후보자가 상이한 시험관내 검정에서 상이한 효능을 나타냈기 때문에, 본 발명자들은 리드 선택에 대한 이들의 항-종양 활성을 평가하여 비교하기 위해 생체내 연구를 수행했다. 라모스 종양 이종이식 모델을 사용했다. 종양 함유 마우스를 총 9회 투여 동안 1주일에 3회 5mg/kg의 키메라 항체 cR-3, cR-8, cR-33 또는 c19-21로 복강내 처리했다(그룹당 8마리 동물). 동일한 섭생과 함께 리톡시맵의 항-종양 활성을 대조군으로서 사용했다. 도 4a에 도시된 바와 같이, cR-8 및 cR-3은 가장 강력한 항-종양 효과를 나타냈다. 대조적으로, 19-21은 투여 종료 후 신속한 종양 반발과 함께 낮은 항종양 활성을 나타냈다. cR-33의 항-종양 효과는 중간이었지만, 리톡시맵보다 우수한 생체내 활성을 나타냈다. 항체 cR-3 및 cR-8의 생체내 효능을 투여량 반응 연구에서 추가로 평가했다. 도 4b에 도시된 바와 같이, cR-8은 cR-3보다 더 강력한 항-종양 효능을 나타냈고, 따라서 리드 항-CD40 항체로서 동정되었다.

[0266] R-8 클론의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 1 및 2에 제시한다. VH 및 VL의 CDR의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3-5 및 6-8에 제시한다. 작용 활성을 나타낸 다수의 기타 항체 후보자의 중쇄 및 경쇄 서열의 아미노산 서열은 서열번호 11-56에 제시한다. 이러한 항체에 대한 VHCDR 및 VLCDR 아미노산 서열은 서열번호 57-194에 제공한다. 도 16은 밀줄친 CDR과 함께, R-8 클론을 포함하는 이들 서열의 배열을 도시한다.

[0267] R-8은 특허등록된 돌연변이 혈통 가이드라인(MLG) 인간화 기술을 사용하여 인간화했다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제7,462,697호). 인간화된 R-8의 경쇄 및 중쇄 골격(APX005)은 인간 생식세포 서열과 95% 동일하다. 인간화된 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 각각 서열번호 9 및 10에 제시한다. CD40에 대한 APX005의 결합은 이의 모 클론 R-8과 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0268] 실시예 2

[0269] APX005 인간화된 항-CD40 항체의 시험관내 특성화

[0270] 다수의 시험관내 실험을 수행하여 APX005 인간화된 항체를 추가로 특성화했다.

[0271] APX005는 선택적으로 CD40에 결합한다

[0272] APX005의 결합 선택성은 TNFR 계통 단백질의 패널에 대한 직접 ELISA로 평가했다. 총 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 래빗 Fc 및 CD40의 융합 단백질, RANK, TweakR, OX40, DR5 및 4-1BB를 ELISA 플레이트 상에 코팅시켰다. 결합된 APX005를 염소 항-인간 HRP-접합된 IgG를 사용하여 검출시켰다. 도 5에 도시된 바와 같이, APX005는 시험된 기타 TNFR 계통 단백질이 아니라 인간 CD40에 선택적으로 결합한다.

[0273] APX005는 CD40에 대한 CD40L의 결합을 차단한다

[0274] ELISA를 수행하여 CD40에 대한 CD40L 결합에 미치는 APX005의 효과를 평가했다. 특히, CD40L(4 $\mu\text{g/ml}$ 최종 농도)를 사용하여 ELISA 플레이트 상에 고정된 인간 CD40을 결합시켰고, CD40에 대한 CD40L의 결합량의 변화는 APX005로 고정된 CD40을 전-배양한 후 측정했다. 고정된 CD40에 대한 CD40L 결합은 마우스 항-CD40L 모노클로날 항체로 검출했다. 도 6에 도시된 바와 같이, APX005는 CD40에 대한 CD40L의 결합을 차단한다. 대조적으로, SGN-40은 결합을 증가시킨다.

[0275] APX005/CD40 복합체는 내재화되지 않는다

[0276] ADCC 활성에 대한 이의 영향을 평가하기 위한 APX005의 표적 매개된 내재화를 평가하기 위해, 라모스 세포를 내재화용으로 허용되는 온도인 37°C에서 4시간 동안 또는 내재화가 최소화되는 온도인 4°C에서 30분 동안 APX005

로 배양했다. 세포를 염색 완충액으로 세척한 다음, 4℃에서 추가로 30분 동안 알렉사(Alexa) 488 표지된 염소 항-인간 IgG로 배양했다. FACS 분석을 수행하여 세포 표면 상의 APX005의 수준을 시험했다. 도 7에 도시된 바와 같이, 37℃에서 배양 후 세포 표면 상의 APX005 수준의 감소는 없었다(약간 증가). 데이터는, CD40에 대한 결합 시, APX005/CD40 복합체가 종양 세포에 의해 내재화되지 않았고, 따라서 ADCC를 위한 효과기 세포를 보충하기 위한 최적의 조건을 제공하였음을 제시한다.

[0277] APX005는 ADCC를 매개한다

[0278] CD40 발현 종양 세포 상의 APX005의 ADCC 활성을 평가하기 위해, CD40 발현 라모스 및 다우디(Daudi)를 표적 세포로서 사용하였고, 새로운 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 효과기 세포로서 사용했다. ADCC를 칼세인-AM 방출 검정에 의해 측정했다. 표적 세포를 칼세인-AM($15\mu\text{M}/10^6$ 세포)로 표지화하고, 세척하고, 환저 96웰 플레이트에서 5×10^3 /웰로 3회 플레이팅했다. 증가하는 농도(0.0001 – $10\mu\text{g}/\text{mL}$)의 APX005 또는 대조군 항체를 4℃에서 30분 동안 예비-배양하였고, 이후 건강한 인간 공여체로부터의 PBMC 효과기 세포를 최종 효과기:표적 세포 비 40:1로 200 μL /웰의 최종 용적으로 첨가했다. 실험은 적어도 3명의 상이한 공여체로부터의 PBMC를 사용하여 수행했다. 4시간 배양 후, 100 μL 배양 상청액을 블랙 뷰우 플레이트(Black View Plate)-96 플레이트로 옮기고, 임의 형광 단위(AFU)를 빅터(Victor) II 플레이트 판독기(485nm 여기/535nm 방출) 상에서 판독했다. 특이적 용해율 = (AFU 평균 실험 방출 - AFU 평균 자발적 방출)/(AFU 평균 최대 방출 - AFU 평균 자발적 방출). 도 8에 도시된 바와 같이, APX005가 투여량 의존적 방식으로 ADCC를 유도한다. 유사한 효과가 SGN-40에 대해 관찰되었다. ADCC에 대한 라모스 및 다우디 세포의 상이한 민감성은 상이한 CD40 발현 수준에 기인할 수 있다[참조: Cancer Res 2005; 65: 8331-8338].

[0279] APX005는 종양 세포 증식을 억제한다

[0280] 종양 세포 증식을 억제하는 APX005의 능력을 평가하기 위해, 라모스 세포를 가변 농도의 APX005, SGN-40 또는 대조군 인간 IgG를 함유하는 10% FBS로 보충된 200 μL RPMI 1640 중에서 50,000세포/웰로 96-웰 평-저 플레이트에서 접종했다. 가교결합을 위해, APX005, SGN-40 또는 대조군 IgG를 세포에 첨가되기 전에 실온에서 30분 동안 배지 중의 염소 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 항체의 F(ab')₂ 단편으로 예비-배양했다. 세포를 총 72시간 동안 처리했다. 이어서, 10% AlamarBlue®(Serotec, Oxford, UK)를 각 웰에 첨가하고, 추가로 24시간 동안 배양했다. 세포 생존율은 여기 파장 530nm 및 방출 파장 590nm으로 사이토플루오르(CytoFluor) 형광 판독기로 측정했다. 모든 연구를 각 샘플 농도에 대해 2회 3중으로 수행했다. 도 9에 도시된 바와 같이, 단량체 APX005는 라모스 세포의 증식을 억제했다(도 9a). APX005가 2차 항체로 가교결합되었을 때, 이는 증가된 투여량 의존적 증식 억제 효과를 전달한다(도 9b). APX005의 가교결합은 Fc 수용체 발현 세포에 의해 생체내에서 달성될 수 있다.

[0281] APX005는 DC 활성화를 유도한다

[0282] DC 세포의 성숙을 자극하는 APX005의 능력을 평가하기 위해, PBMC를 림프구 분리 용액을 사용하여 밀도 구배 원심분리로 제조했다. 접착성 단핵 세포를 37℃에서 2시간 동안 배양한 후에 수거했다. 단리된 단핵 세포를 24-웰 플레이트에서 10% FCS로 보충된 RPMI1640 배지에서 100ng/ml의 재조합 인간 GM-CSF 및 100ng/ml의 재조합 인간 IL-4로 배양했다. 배지의 반을 3일 후에 바꾸었다. 배양 5일째에, 1.3nM의 항-CD40 항체, CD40L 또는 대조군 항체를 DC 세포에 첨가하고, 24-웰 플레이트에서 48시간 동안 추가로 배양했다. DC 활성화 마커 염색을 위해, PE-접합된 항-CD83, 항-CD86 항체 및 항-CD80 항체를 사용했다. FACS를 사용하여 분석을 수행했다. 데이터는 하나의 대표적인 연구의 것이다. 도 10에 도시된 바와 같이, APX005는 표시된 DC 성숙을 유도하고, 이의 효과는 SGN-40 및 CD40L보다 더 강력한 것으로 나타난다. DC의 증가된 활성화는 보다 강력한 항-종양 T-세포 반응을 유도할 수 있다.

[0283] APX005는 마우스 CD40이 아니라 원숭이 CD40과 교차반응성이다

[0284] 교차반응성은 직접 ELISA로 평가했다. 총 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 인간 CD40, 원숭이 CD40 또는 마우스 CD40을 ELISA 플레이트

위에 코팅한 다음, 1 μ g/ml의 APX005 또는 대조군 IgG1으로 배양했다. CD40에 결합된 항체를 HRP와 접합된 염소 항-인간 IgG를 사용하여 검출했다. APX005는 마우스 CD40이 아니라 원숭이 CD40과 명백하게 가교결합한다(도 11a).

[0285] 마우스 CD40과 APX005의 교차반응성은 마우스 CD40을 발현시키는 마우스 A20 세포주에 대한 FACS 결합에 의해 추가로 측정했다. 0.5x10⁶ A20 세포의 부분표본을 96 웰 플레이트에 첨가하고, PE, APX005 또는 IgG1과 접합된 100 μ l 희석된 래트 항-마우스 CD40 항체로 배양했다. 세척 후, R-PE와 접합된 100 μ l 염소-항 인간 IgG (H+L)(Southern Biotech CAT#2040-09)를 PBS 중에서 1:200 희석으로 샘플에 첨가하고, APX005 및 대조군 인간 IgG1의 검출을 위해 배양했다. PE와 접합된 래트 항-마우스 CD40을 양성 대조군으로서 사용했다. 샘플을 0.5ml PBS로 재현탁시키고, FACS로 분석했다. FACS 데이터는, APX005가 마우스 CD40과 가교결합하지 않는다는 것을 나타냈다(도 11b).

[0286] 요약하면, 이 실시예에서 실험은, APX005가 CD40을 결합하는 인간화된 IgG1 항체라는 것을 나타냈다. APX005는 구체적으로 Kd 9.6 x10⁻¹⁰M으로 CD40과 결합하고, CD40에의 CD40L의 결합을 차단한다. 이는 CD40-CD40L 상호작용을 향상시키는 SGN40 항-CD40 항체와 대조적이다. 이는, 이러한 두 항체가 별개의 에피토프에 결합한다는 것을 제시한다. 시험관내에서, APX005는 CD40 양성 림프종 세포(라모스 및 다우디)에 대한 강력한 ADCC 활성 뿐만 아니라 가교결합시 종양 세포(라모스) 증식을 직접 억제하는 능력을 나타냈다. APX005는 또한 세포상 면역 반응을 향상시키는 수지상 세포의 성숙을 자극했다. 추가로, APX005는 원숭이 CD40과 교차반응하는 것으로 나타났다.

[0287] 실시예 3

[0288] APX005 인간화된 항-CD40 항체의 생체내 특성화

[0289] 다수의 생체내 실험을 수행하여 APX005 인간화된 항체를 추가로 특성화했다.

[0290] 라모스 모델에서 종양 성장의 APX005 억제

[0291] 인간 B 세포 림프종의 이종이식 모델 상의 APX005의 효과를 평가하기 위해, 6-8주령 암컷 BALB/c nu/nu 마우스를 종양 세포 접종에 사용했다. 이종이식편은 등 양태에서 1 x 10⁷ 종양 세포/마우스의 피하 접종으로 확립했다. 종양이 약 100mm³(50-200mm³)의 평균 용적에 도달하면, 동물을 그룹으로 랜덤화하였다. 항체를 13일에 출발하여 3mg/kg 복강내 투여했다(도 12 참조). 투약은 총 9회 용량(그룹당 8마리 동물)으로 1주일당 3회 투여했다. 종양의 수직 치수를 버니어 캘리퍼스를 사용하여 측정했다. 종양 용적은 화학식: 용적 = (길이 x 너비²)/2을 사용하여 계산했다. 도 12a에 도시된 바와 같이, APX005는 강력하고 장기간 지속성 항종양 활성을 입증했다. 혈청은 인간 IgG 농도를 측정하여 생체내 약물 수준을 측정하기 위해 최종 투약 2일 후인 34일에 취했다(도 12b 참조). APX005로 매개된 항종양 효능은 SGN-40의 효능보다 컸고, 투약 기간 후 장기간 지속되었다. 단일 점 PK 분석은, APX005의 우수한 항종양 활성이 PK 차이에 기인하지 않았다는 것을 나타냈다.

[0292] 리툽시맵 예비처리된 내성 종양의 APX005 억제

[0293] 이 실험의 목적은 리툽시맵 예비처리된 내성 B 세포 림프종에 대한 APX005의 효과를 평가하는 것이었다. 확립된 라모스 종양을 포함하는 누드 마우스를 먼저 5회 투약량에 대해 3mg/kg으로 리툽시맵으로 처리했다. 종양 성장은 리툽시맵으로 부분적으로 억제되었다(도 13a). 이러한 종양이 크기 약 700mm³에 도달했을때, 이들을 4개 그룹(그룹당 7마리 동물)으로 랜덤화하였고, 이들을 3주 동안 APX005, 리툽시맵, SGN40 동족체 3mg/kg 또는 식염수 대조군으로 복강내 재처리했다(도 13b). 도 13에 도시된 바와 같이, 리툽시맵 예비처리된 종양은 리툽시맵 재처리에 반응하지 않아 이러한 종양이 리툽시맵 내성이라는 것을 제시한다(도 13b). APX005는 리툽시맵 내성 종양의 성장을 억제하는 능력을 나타냈다.

[0294] 라지 모델에서 종양 성장의 APX005 억제

- [0295] 이 실험의 목적은 생체내에서 APX005의 투약량 및 효능 관계를 측정하는 것이었다. 확립된 CD40 양성 라지 종양을 포함하는 누드 마우스를 15일에 출발하여 APX005로 처리했다. 0.1mg/kg - 10mg/kg 범위의 APX005의 투약량을 2주 동안(그룹당 8마리 동물) 3회/주 복강내 투여했다(도 14 참조). 식염수를 대조군 처리로서 사용했다. 종양 용적을 각 투약일에 측정했다. 각 그룹에서 APX005의 혈청 수준을 또한 최종 투약 3일 후에 측정하여 순환 중인 APX005의 수준과 생체내 효능의 관계를 측정했다. 명백한 투약량 의존적 항종양 활성이 관찰되었다(도 14 참조). 29일 내지 33일에 1mg/kg 이상의 투약량 수준으로 대조군 그룹과 항체 처리 그룹 사이에 종양 용적의 차이는 상당했다($P \leq 0.05$). 최소 유효 농도는 1mg/kg으로 측정되었고, 이는 36일에 종양 혈청 농도 $0.49\mu\text{g/ml}$ 에 상응한다. 3, 5 및 10mg/kg 투약 그룹 사이의 종양 용적의 차이는 통계학상 유의하지 않았다. 따라서, 최대 항종양 활성은 종양 혈청 농도 $1.6\mu\text{g/ml}$ 이상과 함께 3mg/kg 이상의 투약량에서 달성되었다.
- [0296] 인간 MM IM-9 모델에서 APX005에 의한 종양 성장의 억제
- [0297] 인간 다발성 골수종 모델에서 APX005의 항종양 활성을 평가하기 위해, 확립된 CD40 양성 다발성 골수종 IM-9 종양을 포함하는 누드 마우스를 15일에 시작하여 APX005 또는 SGN40으로 복강내 처리했다. APX005를 3주 동안(그룹당 5마리 동물) 3회/주 3mg/kg 제공했다. 종양 용적을 각 투약일에 측정했다.
- [0298] APX005는 IM-9 이종이식 모델에서 인간 다발성 골수종에 대한 강력한 항종양 활성을 입증했다(도 15 참조). APX005에 의해 조정된 항종양 효능은 SGN-40의 효능보다 상당히 컸다($P < 0.05$).
- [0299] 라모스 모델에서 SGN-40 및 리툽시맵과 비교하여 APX005에 의한 종양 성장의 억제
- [0300] 이 실험의 목적은 인간 B 세포 림프종 라모스 이종이식 모델에서 APX005, 리툽시맵 및 SGN-40의 항종양 활성을 비교하는 것이다. 이종이식편은 암컷 SCID C.B -17 마우스의 등 옆구리에서 라모스 세포의 피하 접종에 의해 확립했다. 종양이 평균 용적 약 $200\text{--}300\text{mm}^3$ 에 도달할 때, 동물을 6개 그룹으로 랜덤화했다. 항체를 도 17에 지시된 바와 같은 투약량으로 복강내 투여했다. 투약은 총 9개 투약량(그룹당 10마리 동물)으로 1주일에 3회 투여했다. 종양의 수직 치수는 버니어 캘리퍼스를 사용하여 측정했다. 종양 용적은 화학식: 용적 = (길이 x 너비²)/2를 사용하여 계산했다. 마우스의 생존율을 또한 측정하여 기록했다.
- [0301] APX005는 투약량 의존성 항종양 활성을 입증했다. 고용량의 APX005(10mg/kg)로의 처리는 완전한 종양 퇴화를 유도하는 반면, 동일 투약량(10mg/kg)에서 리툽시맵은 단지 종양 성장을 지연시켜, APX005가 이 모델에서 리툽시맵보다 더 효능이 있음을 제시한다. APX005는 또한 SGN-40보다 더 효능이 있다(도 17A). APX005는 종양 성장을 억제할 뿐만 아니라 종양 함유 동물의 생존을 개선시킨다(도 17B).
- [0302] 리툽시맵 내성 인간 나말와(Namalwa) 림프종 이종이식 모델에서 종양 성장의 억제
- [0303] 이 실험의 목적은 리툽시맵 내성 인간 나말와 림프종 모델에서 APX005, 리툽시맵 및 SGN-40의 항종양 활성을 비교하는 것이다. 이종이식편은 암컷 SCID C.B -17 마우스의 등 옆구리에서 나말와 세포의 피하 접종에 의해 확립했다. 종양이 평균 용적 약 $200\text{--}300\text{mm}^3$ 에 도달할 때, 동물을 6개 그룹으로 랜덤화했다. 항체를 도 18에 지시된 바와 같은 투약량으로 복강내 투여했다. 투약은 총 9개 투약량(그룹당 10마리 동물)으로 1주일에 3회 투여했다. 종양의 수직 치수는 버니어 캘리퍼스를 사용하여 측정했다. 종양 용적은 화학식: 용적 = (길이 x 너비²)/2를 사용하여 계산했다. 마우스의 생존율을 또한 측정하여 기록했다.
- [0304] APX005는 리툽시맵-내성 나말와 림프종 모델에서 강력한 항종양 활성을 입증했다(도 18a). APX005는 또한 리툽시맵-내성 종양을 함유하는 마우스의 생존을 향상시켰다(도 18b).
- [0305] 요약하면, 이 실시예에서의 실험은, APX005의 효능이 다수의 이종이식 종양 모델에서 시험되었음을 보여주었다. APX005는 라모스 모델에서 종양 성장을 현저하게 억제했다. 흥미롭게, 치료학적 효과는 투약 기간을 훨씬 초과하여 지속되었다. APX005 처리는 리툽시맵 예비처리된 내성 종양의 억제를 유도했다. 용량 범위 발견 연구는 라지 모델에서 수행했고, 최소 유효 용량이 1mg/kg으로서 측정되었고, 최대 항종양 활성이 3mg/kg 이상의 용량에서 관찰되었음을 밝혀내었다. B-세포 림프종 이외에, APX005는 또한 인간 다발성 골수종 IM-9 모델에서 상당히

강력한 항종양 활성을 나타냈다.

- [0306] 따라서, 상기 실시예들은, APX005가 NHL, CLL, 다발성 골수종 및 CD40 표적물을 발현시키는 특정 종양을 포함하는 환자의 치료를 향상시키는데 사용될 수 있음을 입증한다. CD40에 결합시, APX005는 ADCC를 통해 종양 세포를 사멸시키기 위해 세포독성 세포를 보충한다. APX005는 또한 종양 세포 증식을 직접 억제하고, 이의 효능제 활성을 통해 APC를 활성화시킬 수 있다. 생체내에서, APX005는 다수의 CD40-발현 인간 종양 이종이식편의 성장을 현저하게 억제하고, 장기간 지속하는 항종양 효과를 나타냈다. APX005는 또한 인간 다발성 골수종 및 림프관 에비처리된 내성 종양을 억제할 수 있다.
- [0307] 실시예 4
- [0308] APX005 S267E Fc 돌연변이체는 Fc γ RIIB 및 CD40 효능제 활성화에 대한 결합을 증가시킨다.
- [0309] Fc γ 수용체에 대한 결합을 증가시키고 APX005 항체의 효능제 활성을 증가시키기 위한 노력에 있어서, APZ005 Fc(IgG1, EU 넘버링)의 잔기 267에서 세린(S)을 글루탐산(E)으로 돌연변이시켜 APX005 S267E 돌연변이체를 생성했다. APX005 중쇄 Fc 영역에 위치하는 위치 267에서 AGC(S)로부터 GAG(E)로의 돌연변이는 서열분석에 의해 확인했다. 변형된 Fc 영역 서열을 포함하는 IgG1 중쇄 불변 영역은 서열번호 195에 제공되어 있다(이러한 서열은 IgG1의 CH1, 힌지, CH2 및 CH3을 포함한다.).
- [0310] CD40에 결합하는 APX005 S267E 돌연변이체의 능력을 평가하기 위해, APX005 S267E 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 형질전환된 박테리아로부터 정제하고, 293-6E 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 4일 후, 항체-함유 배양 상청액을 수집하고, ELISA(CD40-Fc 단백질로 코팅된 ELISA 플레이트)를 사용하여 CD40에 대한 결합을 시험했다. ELISA 데이터는 APX005 S267E 돌연변이체가 CD40에 대한 APX005의 경우와 유사한 결합 활성을 갖는 것을 나타냈다(도 19 참조).
- [0311] 또 다른 실험에서, 음성 CD40 단백질에 결합하는 CD40 항체의 능력은 살아있는 라모스 세포를 사용한 FACS 분석에 의해 측정했다. 라모스 세포를 수거하고, 30분 동안 1.5ml 차단 완충제(0.1% BSA/PBS)로 차단시켰다. 다양한 농도의 항체를 세포에 첨가하고, 1시간 동안 배양했다. 세척한 후, 차단 용액 중의 1:1000 희석으로 50 μ l 염소-항-인간 IgG(H+L) PE 항체를 첨가하고, 30분 동안 배양했다. 이어서, 세포를 PBS로 세척하고, 1ml PBS로 재현탁시키고, FACS로 분석했다. 시험된 항체는 19-21 래빗 항-CD40 효능제 항체, 시애틀 제네틱스에 의해 개발된 SGN-40 및 파이자사의 CP870893이었다. 도 20에 제시된 바와 같이, APX005 및 APX005 S267E 돌연변이체는 SGN40과 유사한 CD40에 대한 결합 친화성을 나타냈지만, CP870893보다 6배 더 높은 친화성을 나타냈다.
- [0312] 실험은 B 세포 활성화 분석에서 APX005, APX005 S267E 돌연변이체 및 기타 항-CD40 항체의 CD40 효능제 활성을 비교하기 위해 수행되었다. 특히, CD40 효능제 활성은 인간 B 세포 상에서 CD86(B 세포 활성화 마커)의 상향-조절을 측정한 다음, 시험관내에서 다양한 항-CD40 항체로 처리함으로써 시험했다. 신선한 인간 B 세포는 음성 선택 방법(모든 세포)를 사용하여 말초혈로부터 B 세포를 분리함으로써 수득했다. B 세포는 상이한 인간 항체로 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.12, 0.04, 0.01 및 0.0045 μ g/ml에서 48시간 동안 처리했다. 이어서, 세포를 수집하고, 유동 세포 계측법에 의해 살아있는 B 세포 상에서 인간 CD86 발현에 대해 분석했다. 19-21, SGN-40 및 CP870893(상기 기재 참조)를 시험했다. 도 21에 제시된 바와 같이, APX005 S267E 돌연변이체는 APX005와 비교하여 현저히 증가된 효력(EC50) 및 효능(EC100)을 입증했다. APX005 S267E는 이 분석에서 시험된 항-CD40 항체 중에서 가장 강력한 CD40 효능제 항체였다.
- [0313] 추가의 실험은 APX005 및 APX005 S267E 돌연변이체의 ADCC 활성을 평가하기 위해 수행했다. 구체적으로, 시험관내에서 ADCC 효과를 매개하는 CD40 항체의 능력은 표적 세포로서 다우디 세포를 사용하고 효과기 세포로서 인간 PBMC를 사용하여 분석했다. 표지된 표적 세포를 환자 96웰 플레이트에서 5×10^3 세포/웰로 삼중으로 플레이팅했다. 증가 농도의 항체(완전 배지 중의 50 μ l/웰)를 표지된 세포에 첨가했다. 최종 항체 농도는 0 내지 10 μ g/ml (완전 배지) 범위였다. 세포를 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 항체로 처리했다. 완전 배지 중의 효과기 세포(PBMC)를 표적 세포에 시딩했다(효과기 세포/표적 세포 비 = 40/1). 효과기 세포의 최종 용적은 100 μ l/웰이었다. 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 4시간 배양 후, 각 웰로부터 100 μ l 배양 상청액을 96웰 블랙 뷰 플레이트로 옮기고, RFU를 485 ex/535 em으로 판독했다. 특이적 용해는 하기 식에 따라 계산했다: 특이적 용해 = [(시험 방출-자연 방출)/(최대 방출-자연 방출)] \times 100. 리투산은 양성 대조군으로 사용했다. 도 22에 제시된 바와 같이, APX005 S267E 돌연변이체는 APX005 야생형과 비교하여 ADCC 활성을 약간 증가시켰음을 나타냈다.

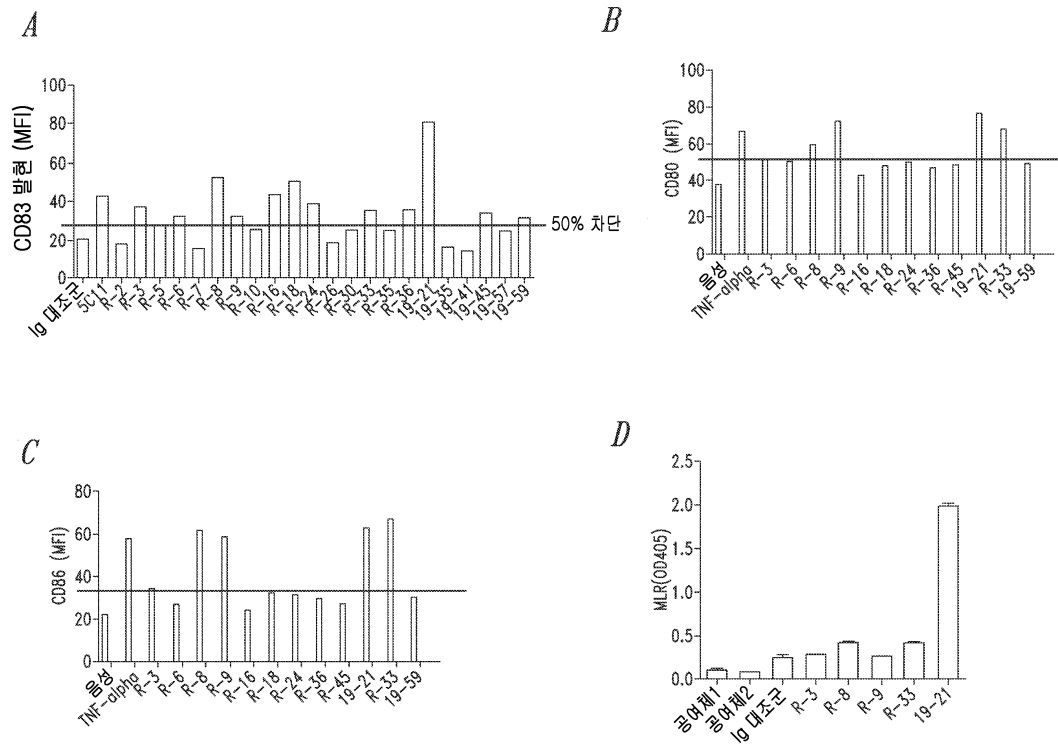
- [0314] 실시예 5
- [0315] APX005의 에피토프의 특성화
- [0316] 이 실험은 APX005, 인간화된 항-CD40 항체의 에피토프의 특성화를 기재한다. 하기 추가로 상세히 기재된 바와 같이, 스캐폴드(CLIPS) 펩티드 상의 전체 5841 선형 및 화학적으로 연결된 펩티드를 합성하고, 결합에 대해 분석했다. 우성 결합 영역은 ₉₂TSEACESCVLHRSCSP₁₀₇(서열번호 196) 및 ₁₂₅PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW₁₄₄(서열번호 197)로서 동정되었다. 동정된 결합 잔기 중에서, T₉₂, E₉₇ 및 ₁₀₀VL₁₀₁은 CD40과 CD40L 삼량체 사이의 접촉 잔기인 것으로 공지되어 있다. 구체적으로, E₉₇은 리간드에 대한 CD40의 결합을 위한 임포트 잔기로서 간주된다.
- [0317] CD40 단백질 서열은 서열번호 198에 기재되어 있고, 단결정 구조: 3QD6으로 직접 이용가능하다. CD40L 삼량체에 결합할 것으로 예상되는 CD40의 잔기는 E74, Y82, D84, N86 및 E117이다[참조: Bajorath *et al.*, 1995 Biochemistry 34:9884-9892]. 3QD6 구조 중의 서열 넘버링은 본원에 언급된 숫자보다 20개 잔기 높은 것에 유의해야 한다. 따라서, 예측된 중요 결합 잔기는 E54, Y62, D64, N66 및 E97이다.
- [0318] 펩티드 합성 및 스크리닝 공정
- [0319] 표적 분자의 불연속 에피토프를 재구성하기 위해, 구성된 펩티드의 라이브러리를 합성했다. 이는 스캐폴드 상의 펩스칸 독자의 화학적으로 결합된 펩티드(CLIPS) 기술을 사용하여 수행했다(Pepscan Presto, Lelystad The Netherlands) [참조: Timmerman *et al.* (2007). *J. Mol. Recognit.* 20:283-99; Sloodstra *et al.* (1996). *Molecular Diversity* 1: 87-96]. CLIPS 기술은 펩티드를 단일 루프, 이중 루프, 삼중 루프, 시트형 폴드, 나선형 폴드 및 이의 조합으로 구성하는 능력을 제공한다. CLIPS 주형은 시스테인 잔기에 커플링된다. 이 실험을 위해, 펩티드 중의 다중 시스테인의 측쇄를 1 또는 2개의 CLIPS 주형에 커플링시켰다. 예를 들면, T2 CLIPS 주형 1,3-비스(브로모메틸) 벤젠의 0.5mM 용액을 중탄산암모늄(20mM, pH 7.9)/아세트오니트릴(1:1(v/v))에 용해시켰다. 이 용액을 펩티드 어레이에 첨가했다. CLIPS 주형은 펩티드-어레이의 고상 결합된 펩티드에 존재하는 2개 시스테인의 측쇄에 결합한다(3 μ l 웰을 갖는 455 웰 플레이트). 펩티드 어레이는 용액에서 완전히 피복하면서 30 내지 60분 동안 용액에서 온화하게 진탕시켰다. 최종적으로, 펩티드 어레이를 과량의 H₂O로 광범위하게 세척하고, PBS(pH 7.2) 중에 1% SDS/0.1% 베타-머캅토에탄올을 함유하는 파괴 완충제에서 70℃로 30분 동안 초음파 처리한 다음, H₂O에서 추가로 45분 동안 초음파 처리했다. T3 CLIPS 함유 펩티드는 유사한 방식으로 제조하지만, 3개의 시스테인을 사용하여 수행했다.
- [0320] 합성된 펩티드 각각에 대한 항체의 결합은 PEPSCAN-기반 ELISA에서 시험했다. 펩티드 어레이는 일차 항체 용액으로 배양했다(4℃에서 밤새). 세척 후, 펩티드 어레이를 25℃에서 1시간 동안 항체 피옥시다제 접합체(SBA, cat.nr.2010-05)의 1/1000 희석으로 배양했다. 세척 후, 피옥시다제 기질 2,2'-아지노-디-3-에틸벤즈티아졸린 설포네이트(ABTS) 및 2 μ l/ml의 3% H2O2를 첨가했다. 1시간 후, 발색을 측정했다. 발색은 전하 결합 소자(CCD)-카메라 및 이미지 처리 시스템으로 정량화했다.
- [0321] 데이터 처리
- [0322] CCD 카메라로부터 취득된 값은 표준 96-웰 플레이트 ELISA-판독기와 유사한 0 내지 3000 mAU 범위이다. 결과는 정량화하고, Peplab 데이터베이스에 저장했다. 결합 값은 분석을 위해 추출했다. 경우에 따라, 웰은 펄스-양성 값을 생성하는 에어-버블을 함유했다. 카드는 수동으로 검사하고, 에어-버블에 의해 유발된 임의의 값은 0으로 기록했다.
- [0323] 에피토프의 측정은 20-머 중첩 펩티드 및 단백질의 12개 특이적 영역의 단일-잔기 돌연변이유발의 조합에 의해 수행했다. 이들 12개 영역은 CD40의 공지된 3D 구조 및 단백질 중의 공개된 시스테인 결합에 기초하여 채취했다. 전체 5841개 화학적으로 합성된 CLIPS 펩티드를 합성했다.
- [0324] 중첩 20-머 펩티드의 평가는 2개의 별개의 결합 영역을 나타냈다: ₉₂TSEACESCVLHRSCSP₁₀₇(서열번호 196) 및 ₁₂₅PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW₁₄₄(서열번호 197). 2개의 알려진 치환이 추가된 중첩 서열의 평가는 유사한 결과를 제공

했다.

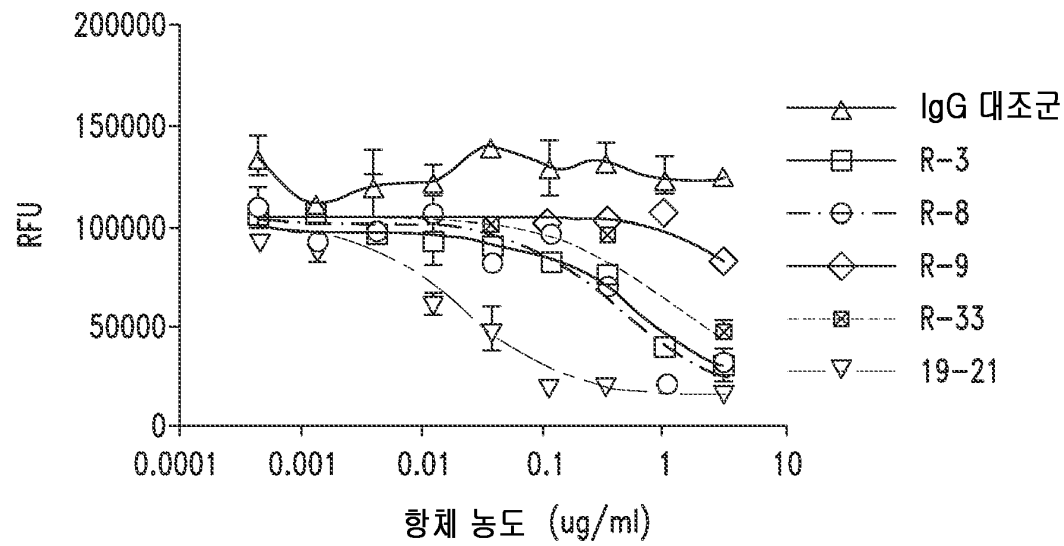
- [0325] 각각 선택된 12개 후보 에피토프 "핫스팟"은 돌연변이가 이루어지지 않은 적어도 10개의 동일한 "조절" 펩티드를 함유한다. 12개 돌연변이유발 데이터 세트 각각에 대한 이들 조절 펩티드의 평가는 2개의 유사한 별개의 결합 영역을 동정했다: $_{84}\text{TCEEGWHCTSEACESCVLH}_{102}$ (서열번호 199) 및 $_{125}\text{PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW}_{144}$ (서열번호 197). 수득된 ELISA 판독치는 통계학적으로 고도로 유의적이다($p < 2e^{-10}$). $_{92}\text{TSEACESCVLHRSCSP}_{107}$ (서열번호 196) 및 $_{84}\text{TCEEGWHCTSEACESCVLH}_{102}$ (서열번호 199)의 중첩을 고려하면, 잔기 92-102(서열번호 202)는 가능하게는 결합을 위한 가장 관련성 잔기이다. 불연속 에피토프를 동정하기 위해 3개의 상이한 서열 영역을 조합한 CLIPS 매트릭스 세트로부터의 데이터는 추가의 통찰을 제공하지 않았다.
- [0326] 2개 돌연변이유발 데이터세트($_{84}\text{TCEEGWHCTSEACESCVLH}_{102}$ (서열번호 199) 및 $_{125}\text{PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW}_{144}$ (서열번호 197)의 철저한 분석은 W144의 가능성을 제외하고는 임의의 중요한 잔기를 나타내지 않았다. 그러나, 잔기 84-102의 돌연변이유발은 또한 CLKPS 없이 선형 펩티드 상에서 수행했다(서열 $_{84}\text{TCEEGWHCTSEACESCVLH}_{102}$ (서열번호 200), 2개의 밀줄친 잔기는 C에서 S로 치환된다). 이러한 선형 펩티드에서, APX005에 의한 결합은 거의 완전히 사라졌고, 이는 이러한 항체의 결합이 이들 2개의 시스테인에 특이적으로 의존하거나, 펩티드가 CLIPS 조합에 의해 강제되는 특이적 입체배좌 상태에 의존하는 것을 나타낸다.
- [0327] CD40의 결정 구조 상으로 영역 $_{92}\text{TSEACESCVLHRSCSP}_{107}$ (서열번호 196) 및 $_{125}\text{PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW}_{144}$ (서열번호 197)의 가시화는 아미노산 92-107이 CD40L-삼량체에 면하는 루프 구조를 형성하는 것을 나타냈다($_{97}\text{ESC}_{100}$ 은 리간드의 4A의 범위내이다)(도 23 참조). 잔기 125-144는 구조 3QD6에서 해결되지 않지만, 시스테인 결합에 대한 이용가능한 데이터에 기초하여, 잔기 92-107에 인접하는 것으로 예상된다. 가시화 목적을 위해, 잔기 122-125(서열번호 201)은 도 23에 제시되어 있다.
- [0328] 따라서, 이 실험은 펩스칸 프레스토 B에 의해 수행되는 선형 및 CLIPS 펩티드를 사용하여 CD40에 대한 인간화된 항체 APO005의 결합의 맵핑을 기재한다. 맵핑은 2개의 특이적 결합 영역의 동정을 제공했다. 이들은 $_{92}\text{TSEACESCVLHRSCSP}_{107}$ (서열번호 196) 및 $_{125}\text{PCPVGFFSNVSSAFEKCHPW}_{144}$ (서열번호 197)이다. 영역 92-107 내에서, 잔기 $_{92}\text{TSEACESCVLH}_{102}$ (서열번호 202)는 가능하게는 결합을 위한 가장 관련성 잔기이다. 동정된 결합 잔기 중에서, T_{92} , E_{97} 및 $_{100}\text{VL}_{101}$ 은 CD40 및 CD40L 삼량체 사이의 접촉 잔기인 것으로 공지되어 있다. 구체적으로, E_{97} 은 리간드에 대한 CD40의 임포트 잔기로서 간주된다.
- [0329] 상기한 각종 실시형태들을 배합하여 추가의 실시형태를 제공할 수 있다. 본원에서 언급되고/되거나 출원 데이터 시트에서 나열된 미국 특허들, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허들, 외국 특허 출원 및 비특허 공보는 모두 전문이 본원에 참조로 인용된다. 당해 실시형태의 양태는, 추가의 실시형태를 제공하기 위해 각종 특허들, 출원 및 공보의 개념을 사용할 필요가 있는 경우, 변형될 수 있다.
- [0330] 상기 상세한 설명에 비추어 이러한 변화 및 기타 변화가 당해 실시형태에서 수행될 수 있다. 일반적으로, 다음 특허청구범위에서, 사용된 용어들은 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 기재된 특정 실시형태로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되고, 이러한 특허청구범위가 자격을 부여하는 전체 범위의 등가물과 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 명세서에 의해 제한되지 않는다.

도면

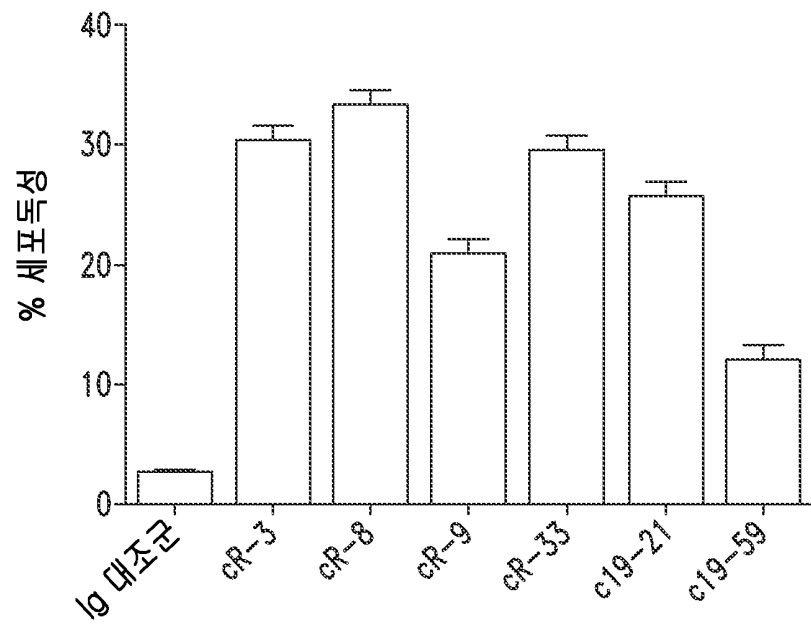
도면1



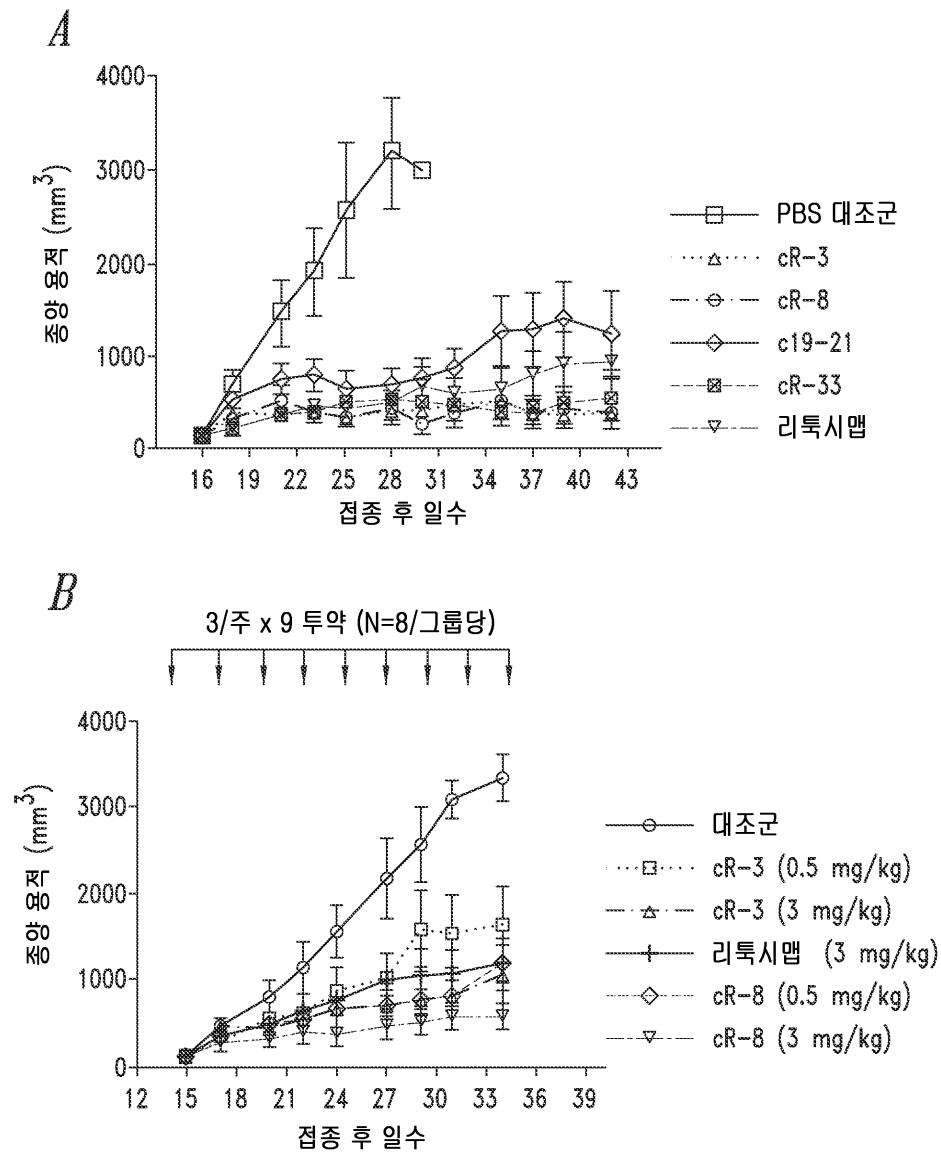
도면2



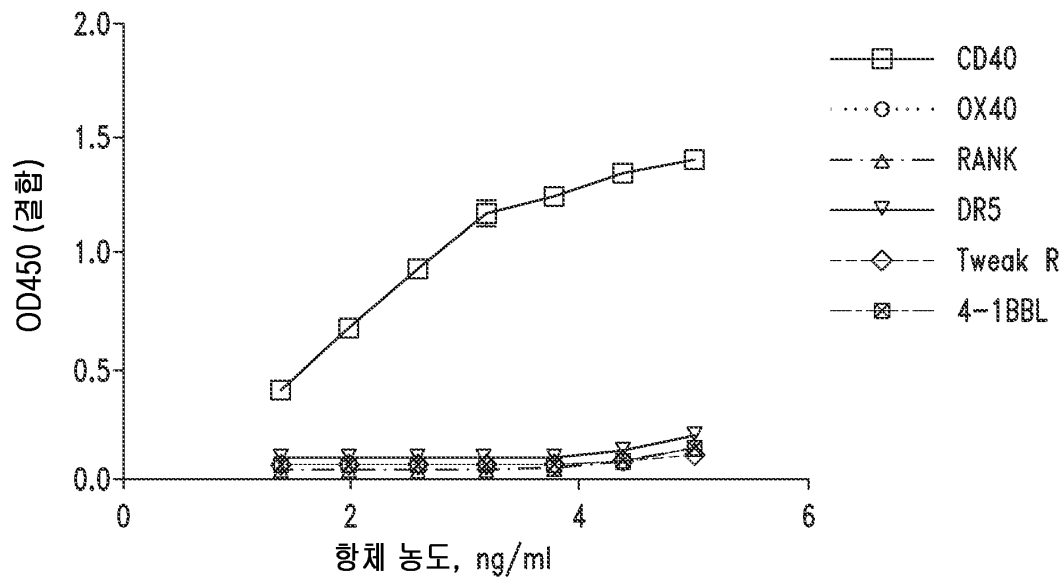
도면3



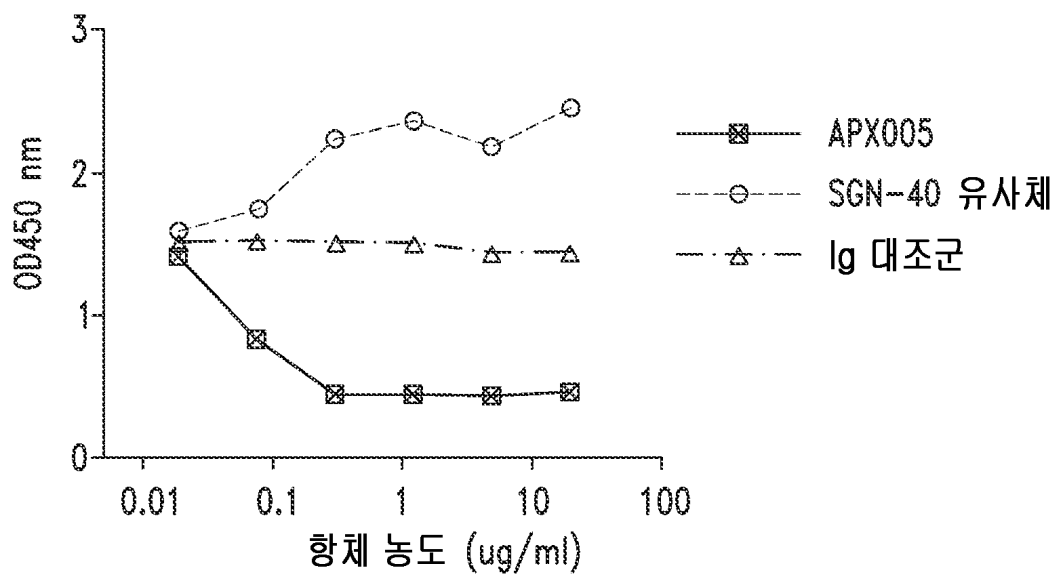
도면4



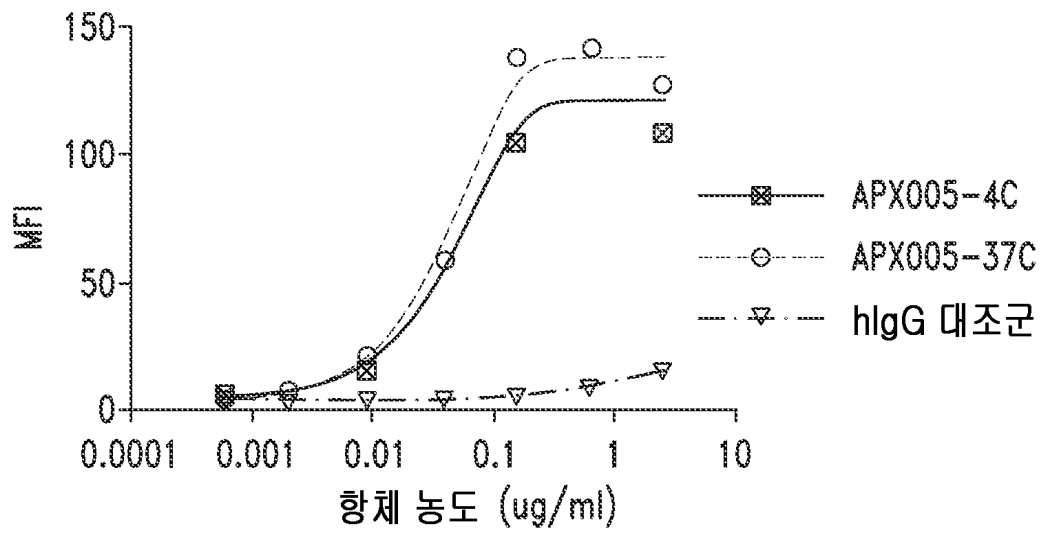
도면5



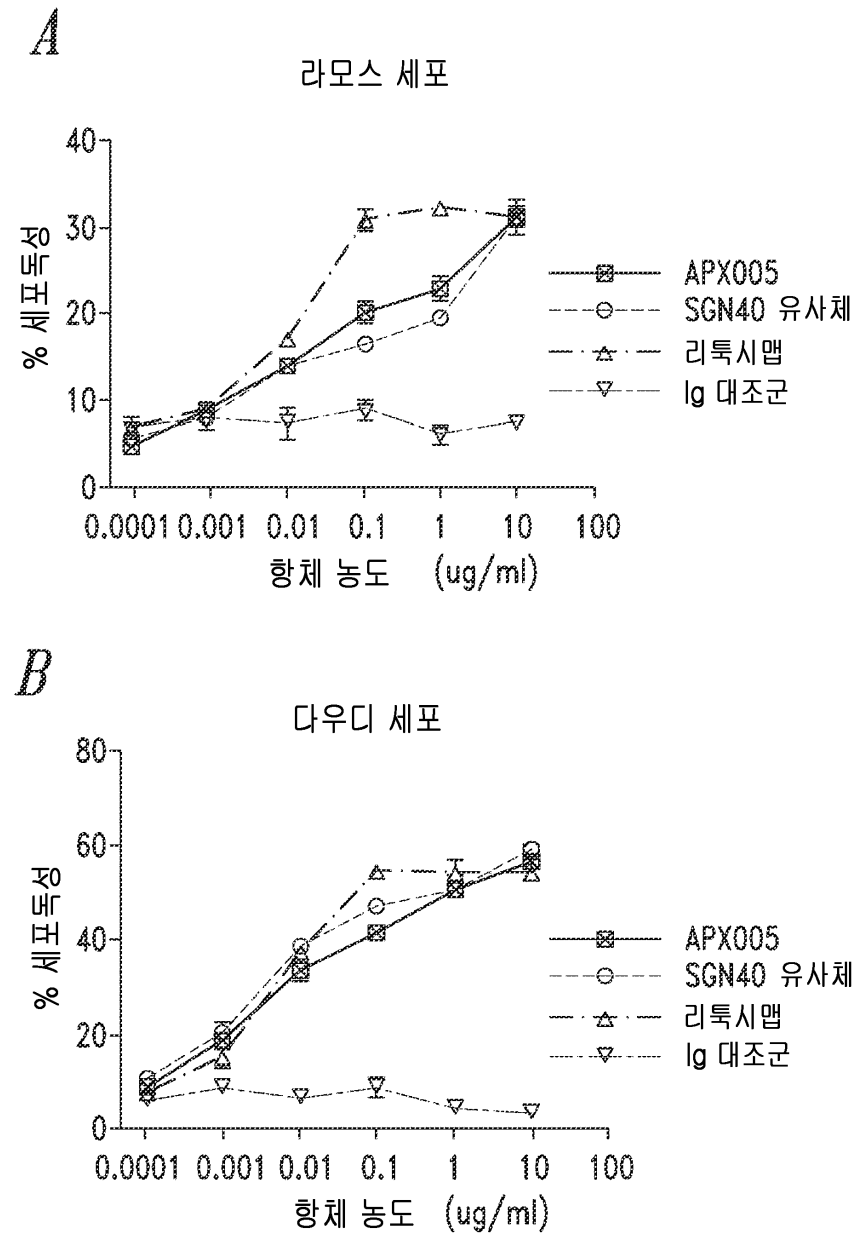
도면6



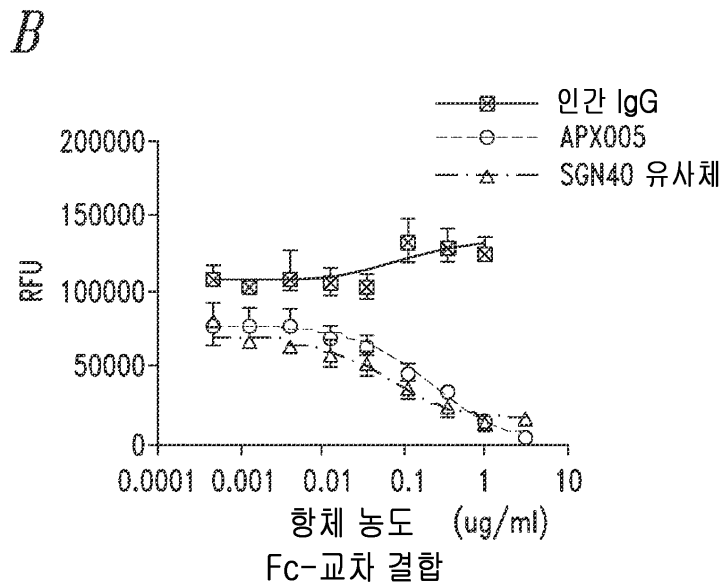
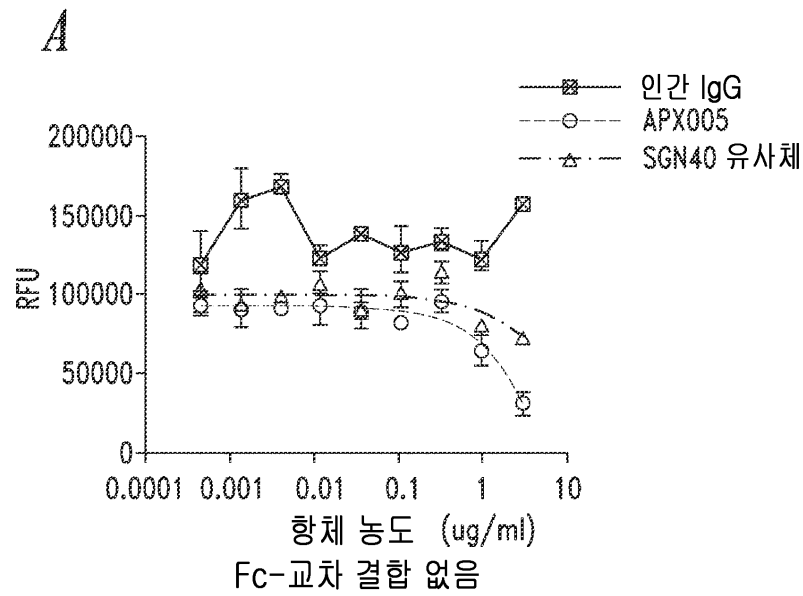
도면7



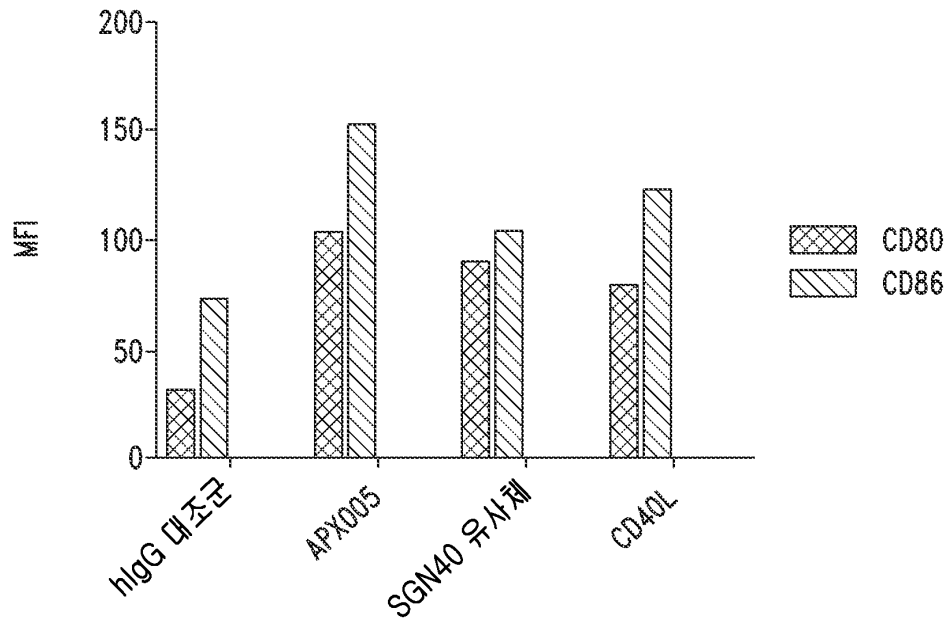
도면8



도면9

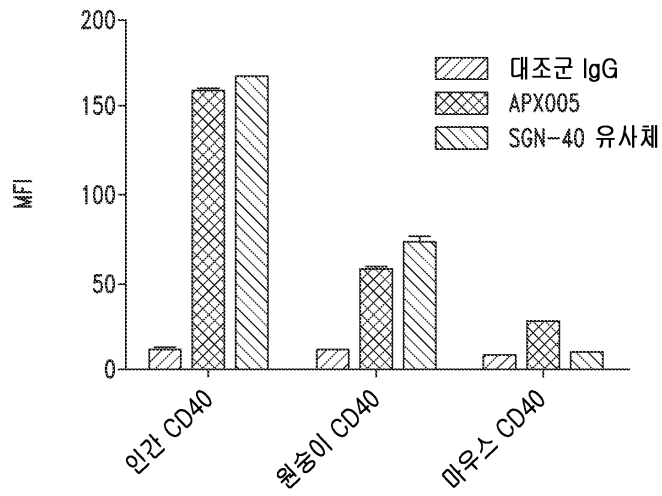


도면10

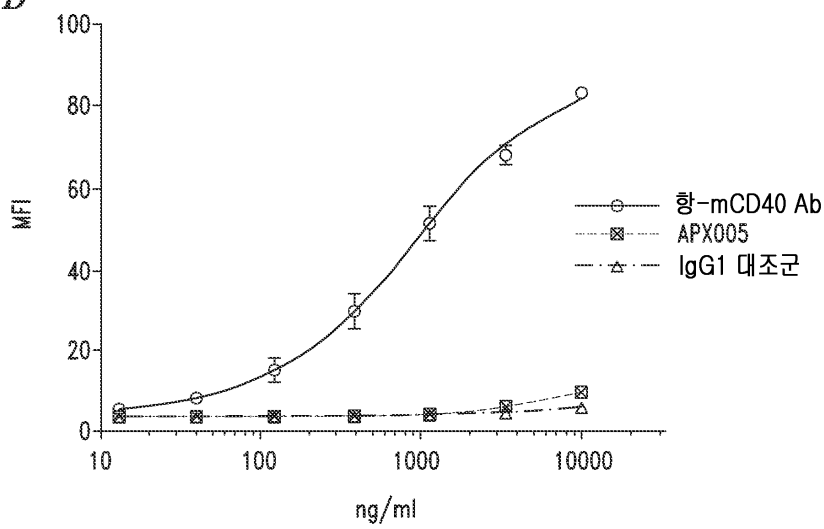


도면11

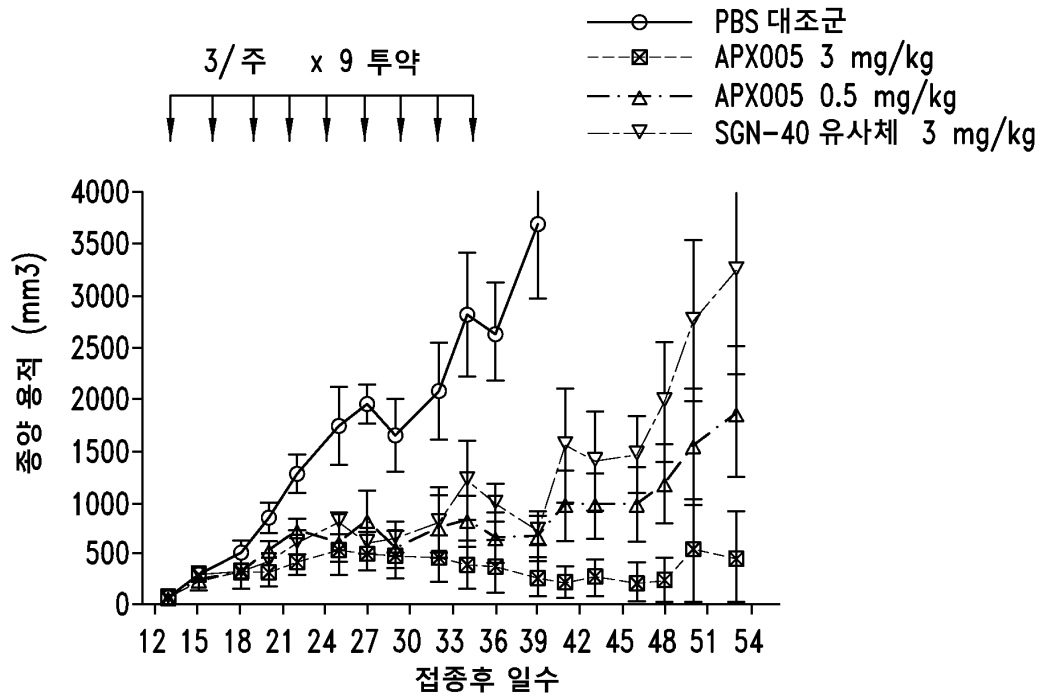
A



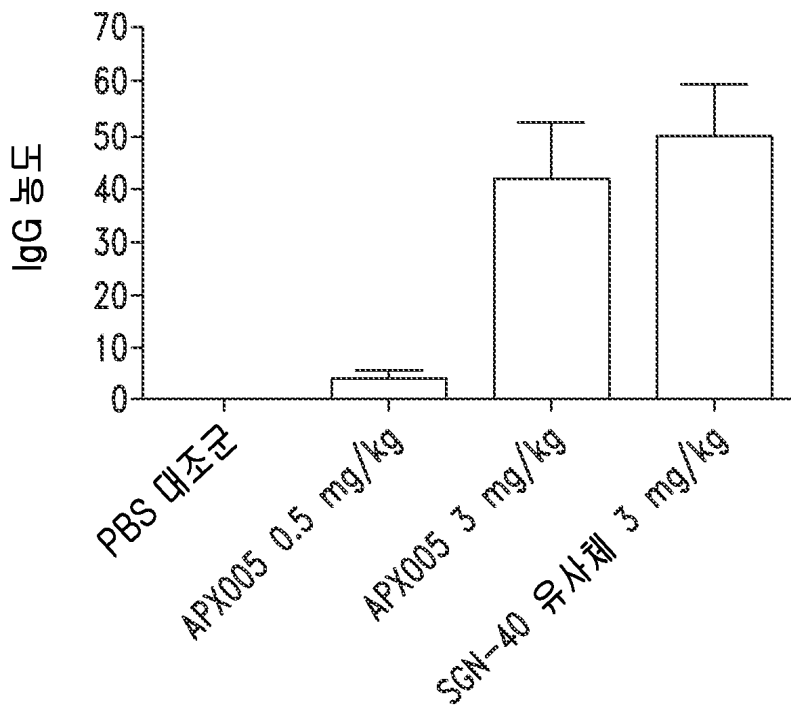
B



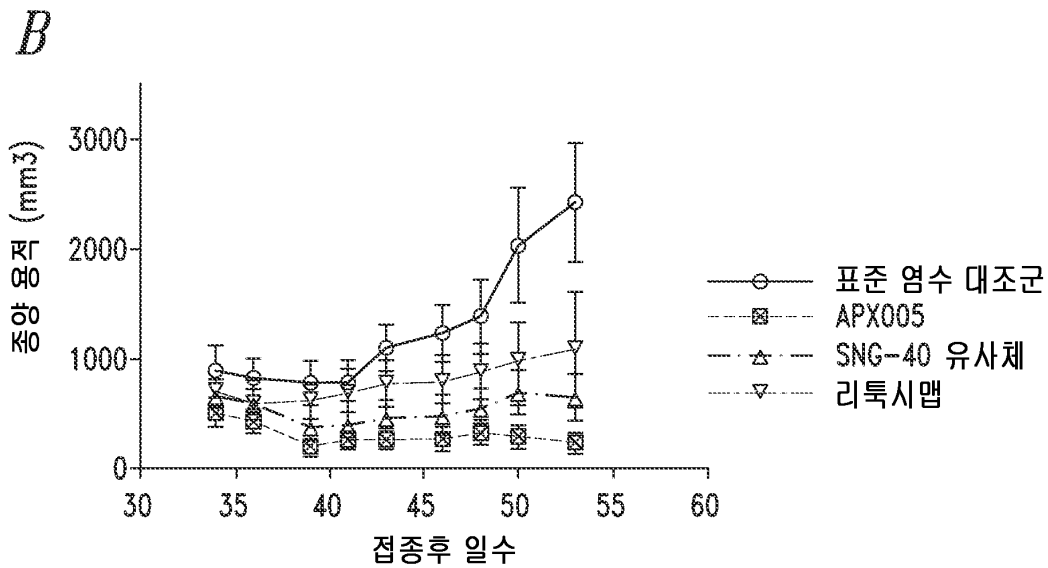
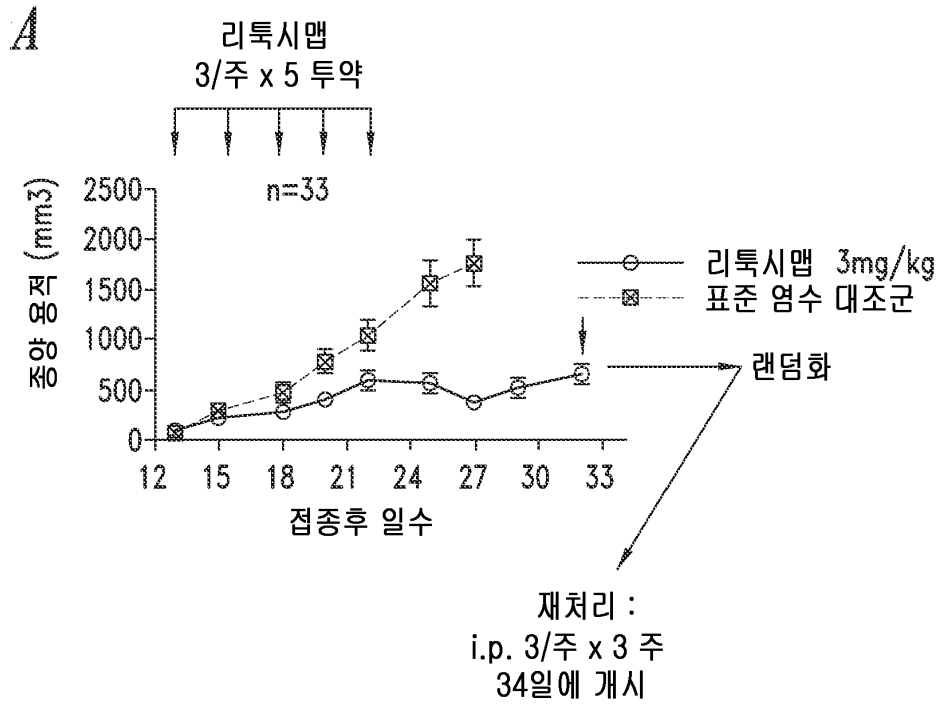
도면12a



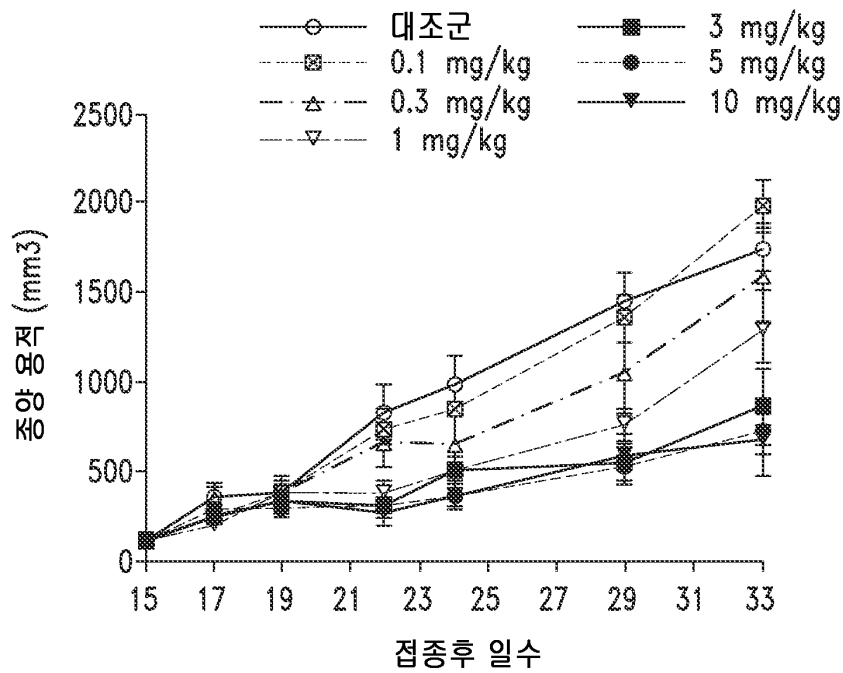
도면12b



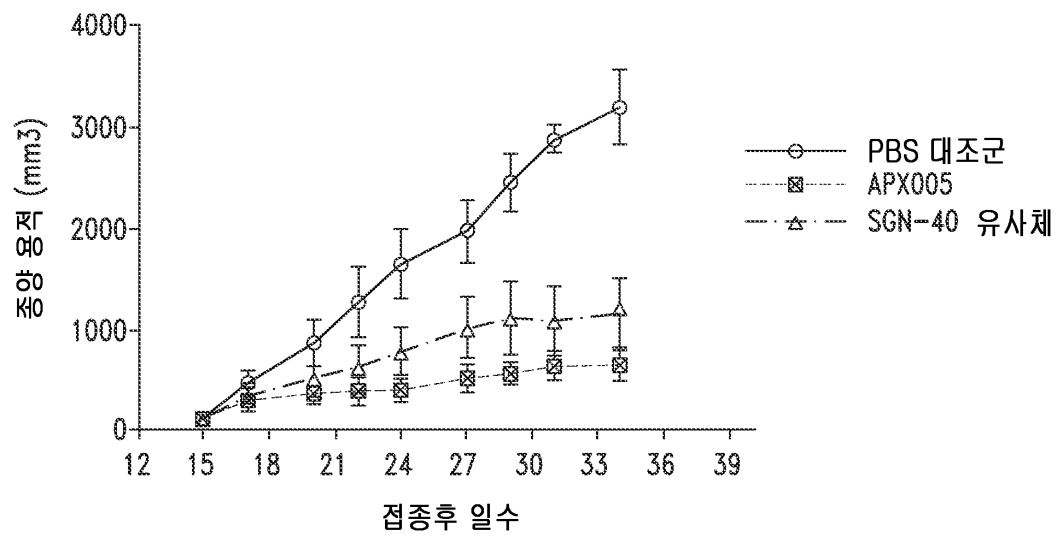
도면13



도면14



도면15



도면16a

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 중쇄

==CDR1==

R-2 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QQLEESGGGLVKPEGSLTLTCKANGFSFSAN-YMC

R-3 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSDS-FWIA

R-5 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLLEESGGDLVKPGASLTLTCKASGFDLSST-YMC

R-6 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGGLVQPGGSLTLTGASGFSFSSS-YMC

R-7 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLLEESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFSFGSG-YMC

R-8 METGLRWLLLVAVLKGVQC---QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSS--TYVC

R-9 METGLRWLLLVAVLKGVQC---QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASRFSFSS--TYMC

R-10 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGGLVVKPGASLAVTCKASGFSFSG-YMC

R-12 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSDS-FWIA

R-16 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGFSLNY--YWPC

R-18 METGLRWLLLVAVLKGVQC---QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGIDFSSY-YMC

R-20 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLLEESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFSFGSG-YMC

R-24 METGLRWLLLVAVLKGVQC---QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSG-YVIC

R-26 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGDLVQPEGSLTLTSTASGFSLSST-YFMC

R-30 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSDS-FWIA

R-33 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSSS-YVIC

도면16b

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 중쇄

=====CDR2=====

R-2 WVRQAPGKGLELIACIYA--SSGSTWYASWAKGRFTISKSTSLNTVTLQMTSLTVAD
R-3 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-5 WVRQAPGKGLEWIGCIY---ATGGTTYASWAKGRFTISKTSPT-TVTLQMPSLTAAD
R-6 WVRQAPGKGLEWIGCIDT--GRGYTYHASGAKGRFTFSKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-7 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYAGWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-8 WVRQAPGKGLEWIACIYT--GDGTNYSASWAKGRFTISKPSST-TVTLQMTSLTPAD
R-9 WVRQAPGKGLEWIACIYTG-SSGGTTYASWAKGRFTISQTSST-TVTLQLTGLTPAD
R-10 WVRQAPGKGLEWIACIGA--GSGNTYYATWTKGRATISKTSWT-TVSLEMTSLTGAD
R-12 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-16 WVRQAPGKGLEWVACLNGG-DSDTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD
R-18 WVRQAPGKGLEWIGCIYA--GSGSTYYASWAKGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-20 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYAGWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-24 WVRQAPGKGLEWIACIGA--GSGGTYFASWAKGRFSISRTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-26 WVRQAPGKGLEWIACISAG-SSGHTYYASWAKGRFTVSKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-30 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-33 WVRQAPGKGLEWIACINTG-SSVTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

도면16c

항-CD40 레빗 모노클로날 항체 중쇄

=====CDR3=====

R-2	TATYFCAR <u>SGGYAAY</u> -----DLWGPGTLVTVSS
R-3	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-5	TATYFCAR <u>DIVGDNIYYF</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-6	TATYFCAR <u>SSYVRYDNRNYGF</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-7	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-8	TATYFCAR <u>PDITYGFAI</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-9	TATYFCAR <u>PDVGFDFAI</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-10	TATYFCAR <u>EDPGNDDYGYAD</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-12	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-16	TATYFCAR <u>YIIPGYHF</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-18	TATYFCAR <u>SGYNDGSIY</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-20	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-24	TATYFCAR <u>EDAGNDDYGYAR</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-26	TATYFCAR <u>ASADVGDY</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-30	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-33	TATYFCAR <u>YIIPGYNF</u> -----NLWGPGTLVTVSS

도면16d

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 중쇄

==CDR1==

R-35 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASSGFSFSGT-YWIC

R-36 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QQQLVESGGGLVKPGASLTLTCKASSGFSFSST-YWIC

19-21 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFDLSS--NAMN

19-35 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLITPGTPLTLTCTVSGFSLSS--YAVN

19-41 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLST--YDMT

19-45 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLNCTVSGFSLSS--YDMN

19-57 METGLRWLLLVAVLKGVQS--QSVEESGGRLITPGTPLTLTCTISGFSLSS--YAVD

19-59 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLS--DYVMR

도면16e

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 중쇄

=====CDR2=====

R-35 WVRQAPGKGLEWIACIYAG-ASGNSYYANWAQGRFIISKRSST-AVTLQMTSLTAAD

R-36 WVRQAPGKGLEWIGCINSD-DSGTVNYANWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

19-21 WVRQAPGKGLEWIGYITIS---GSAGYASWAKGRFTISKSTTT--VDLKISSPTTED

19-35 WVRQAPGKGLEYIGLIATG---GGTFYTNWARGRLTISKSTTT--VDLKMPSPQTED

19-41 WVRQAPGKGLEWLGLINTI---GSAYYASWASGRFTISKSTTS--VTLKMTSPTTED

19-45 WVRQAPGKGLEWIGVIWNN---GEIFYASWAKGRFTISKSTTT--VDLKITSPSTED

19-57 WVRQAPGKGLEYIGIIATG---GGTYYNWAKGRFTISKSTTT--VDLKMTSPQPED

19-59 WVRQAPGKGLEWIGVISSA---GNTYYATWAKDRFTISKSTTT--VDLRIASPTTED

도면16f

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 중쇄

=====CDR3=====

R-35	TATYFCARSYTGYADYNVATGL----NLWGPGLVTVSS
R-36	TATYFCARYPIPGYHF-----NLWGPGLVTVSS
19-21	TATYFCARGYNTMA-----IWGPGLVTVSS
19-35	TATYFCVRGYPGSSDF-----NIWGPGLVTVSS
19-41	TATYFCVRGVPGYSSSF-----NIWGPGLVTVSS
19-45	TATYFCAGDADGGVVSFY-----HWGPGLVTVSS
19-57	TATYFCVRGYPGSSDF-----NIWGPGLVTVSS
19-59	TATYFCARIWRPDDPTNS-----DIWGPGLVTVSS

도면16g

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

R-2 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATF-AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISC
R-3 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTTKC
R-5 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-ALVMTQTPSSVSAAGGTVTINC
R-6 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVEAAVGGTITINC
R-7 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGVTF-AIEMTPPFSVSEPVGGTVTIKC
R-8 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARSADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC
R-9 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC
R-10 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVSAAGGTVTIKC
R-12 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTIKC
R-16 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTPASVSAAGDVTIKC
R-18 MDTRAPPQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVEAAVGGTVTIKC
R-20 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGVTF-AIEMTPPFSVSEPVGGTVTIKC
R-24 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVSAAGGTVTINC
R-26 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVMMTPASVSAPVGGTVTIKC
R-30 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTIKC
R-33 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTPASVEVAVGGTVTINC

도면16h

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

	=====CDR1=====	====CDR2====
R-2	<u>QSSKSVYNN</u> ----- <u>NWLSWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFRGSGSGTEFTLT</u>	
R-3	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFGSGSGTEYTLT</u>	
R-5	<u>QASQTIS</u> ----- <u>NELSWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFGSGSGTQFTLT</u>	
R-6	<u>QASESIS</u> ----- <u>SWLSWYQQKPGQRPKLLIYYTSNLASGVPSRFGSGAGTDFTLT</u>	
R-7	<u>QASEDIF</u> ----- <u>SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLT</u>	
R-8	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFGSGSGTEFTLT</u>	
R-9	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVSSRFGSGSGTQFTLT</u>	
R-10	<u>QASETIY</u> ----- <u>TLLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLESGVPSRFGSGSGTEFTLT</u>	
R-12	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFGSGSGTEYTLT</u>	
R-16	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLYWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFGSGSGTEYTLT</u>	
R-18	<u>QASQSIY</u> ----- <u>TWLAWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSRFGSGSGTDYTLT</u>	
R-20	<u>QASEDIF</u> ----- <u>SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLT</u>	
R-24	<u>QASESAY</u> ----- <u>TLLAWYQQKPGQPPKLLIYGASILESGVPSRFGSGSGTDFTLT</u>	
R-26	<u>QASQSIG</u> ----- <u>TYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFEGRSVTEYTLT</u>	
R-30	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFGSGSGTEYTLT</u>	
R-33	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLYWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPSRFGSGSGTQFTLT</u>	

도면16i

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

=====CDR3=====

R-2 ISDVVCDDAATYYCAGYESVNTDG---HAFGGGTEVVVK
R-3 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-5 ISDLECADAATYYCQGGYTYSSVD---NVFGGGTEVVVK
R-6 ISDLECADAATYYCQSNYGSSSSTY--YGFGGGTEVVVK
R-7 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK
R-8 ISDLECADAATYYCQCTGYGIS-----WPIGGGTEVVVK
R-9 ISDLECADAATYYCQCTGYTIS-----WPFGGGTEVVVK
R-10 ISDLECADAATYYCQSHYFDSSSGYG-NTFGGGTEVVVK
R-12 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-16 ISDLECADVATYYCQGGYSHINVD---NIFGGGFQVVVK
R-18 ISDLECDDAATYYCQRYSWNGSYG---VSFGGGTEVVVR
R-20 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK
R-24 ISDLECADAATYYCQSHYFGSSSGYA-NTFGGGTEVVVK
R-26 ISDLECADAATYYCQSTYYGNG-----HPFGGGTEVVVK
R-30 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-33 ITGVECADAATYYCQGGYSHINVD---NIFGGGTEVVVK

도면16j

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

R-35 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-ALVMTQTPSSSTSAAVGGTVTIKC
R-36 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC
19-21 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGATF-AQVLTQTPSPVSAPVGGTVTINC
19-35 ALAPGARC-AVVLTPASVSAAVGGTVSISC
19-41 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGATF-AIVMTQTPSSKSVAVGDTVINC
19-45 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC
19-57 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AVVLTPASVSAAVGGTVSISC
19-59 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVVMTPSPSSSTSAAVGGTVTIKC

도면16k

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

	====CDR1=====	==CDR2=
R-35	<u>QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASN</u> LASGDPSRFSASRSGTEY	
R-36	<u>QASQNIY-----GYLFWYQQKPGQPPNLLIAEASKLP</u> SGVPSRFGSGSGTEY	
19-21	<u>QSSQNVLIN----NRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASKL</u> ASGVPSRFGSGSGTQF	
19-35	<u>QSSKSVYNK----HHLAWLQQKPGQPPKLLIYYASTL</u> ASGVPSRFRGSGSGTQF	
19-41	<u>QASESVDSN----KRLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTL</u> ASGVPSRFGSGSGTEF	
19-45	<u>QASQTIY-----TYLAWYLQKPGQPPKLLIYEASKL</u> ASGVSSRFEGSGSGTQF	
19-57	<u>QSSKSVYNK----NHLAWLQQKPGQPPKLLIYYTSTP</u> ASGVPSRFRGSGSGTQL	
19-59	<u>QASESIS-----SSLAWYQQKPGQPPKLLIYYASDL</u> ASGVPSRFSGSRSGTEY	

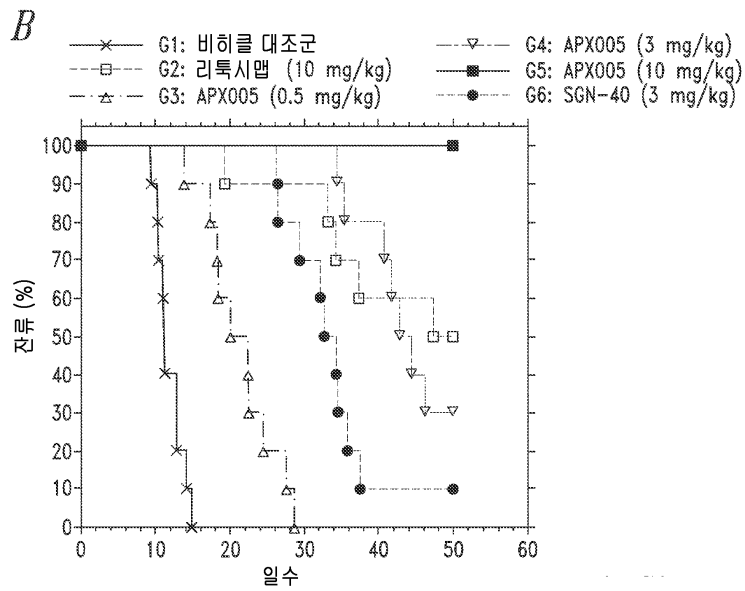
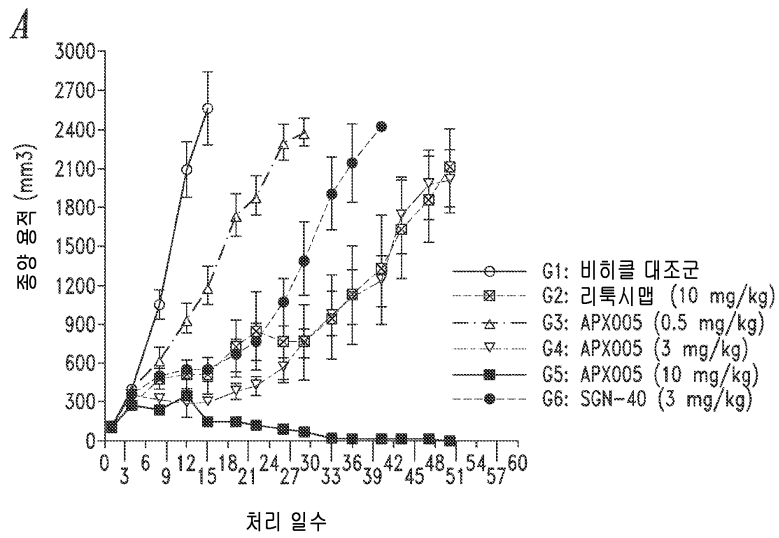
도면161

항-CD40 래빗 모노클로날 항체 경쇄

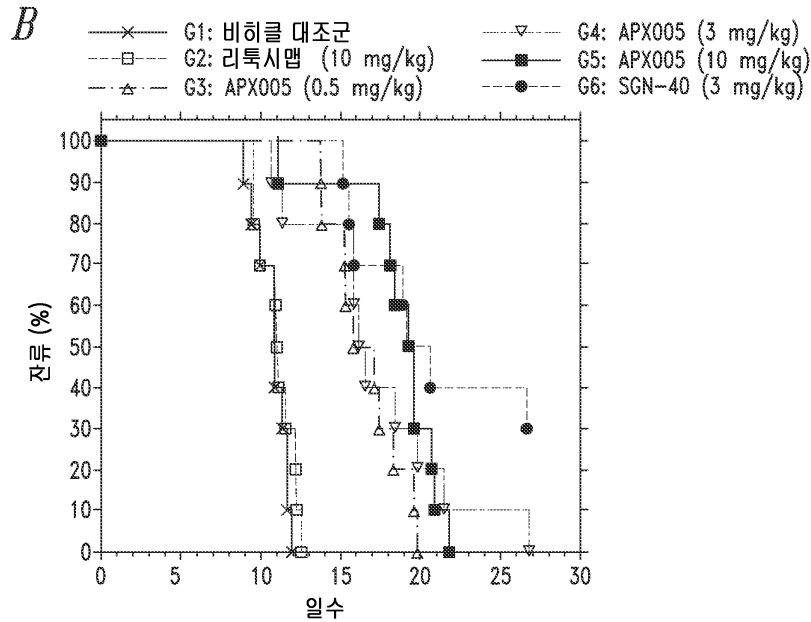
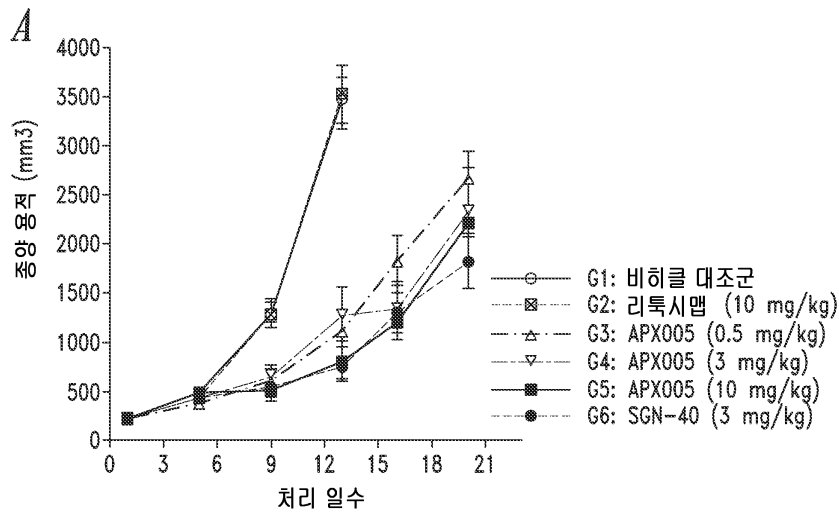
=====CDR3=====

R-35 TLTISGVQREDAATYYCCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-36 SLTISGVECADAATYYCQQSYSHINVD---NIFGGGTEVVVK
19-21 TLTISGVQCDDAATYYCQAGYSSGDG----NAFGGGTEVVVK
19-35 TLTISDVQCDDAATYYCCAGGYPSDSD----NTFGGGTEVVVE
19-41 TLTISDVVCDDAATYYCCAGYKATTTDA---SAFGGGTEVVVK
19-45 TLTISGVQCDDAATYYCQQGYNSRHVD---NVFGGGTEVVVK
19-57 TLTISDVQCDDAATYYCCAGGYNSDSD----NTFGGGTEVVVE
19-59 TLTISGVQREDAATYYCCLGGYATAAYR---TAFGGGTELEILC

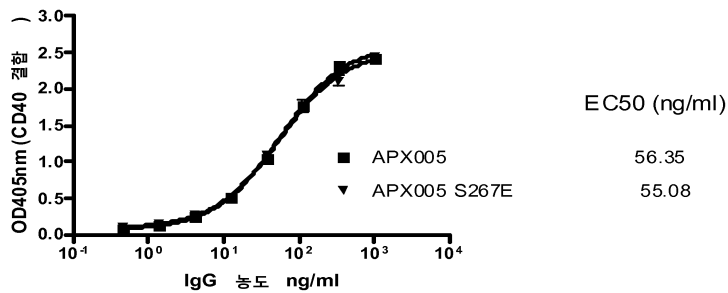
도면17



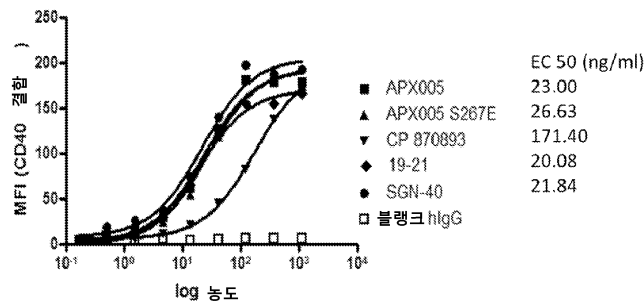
도면18



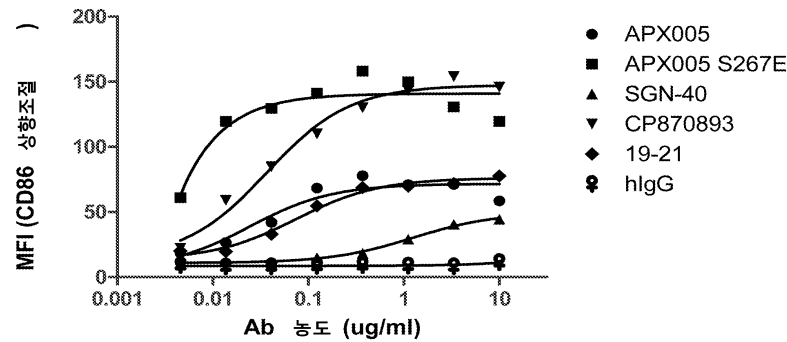
도면19



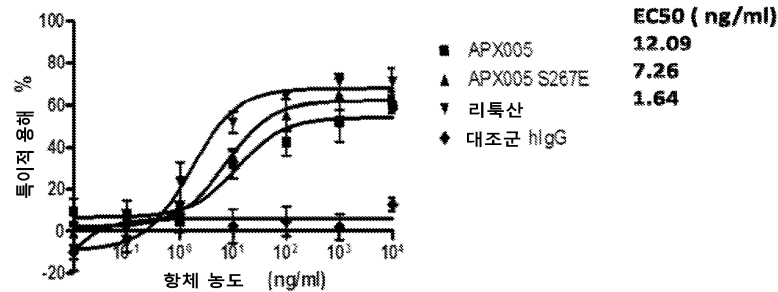
도면20



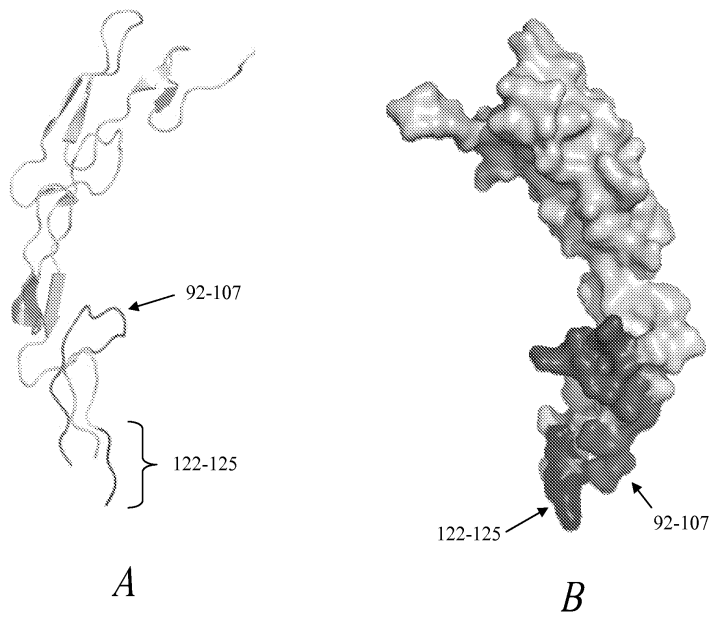
도면21



도면22



도면23



서열 목록

<110> Apexigen, Inc.

<120> ANTI-CD40 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> IPA150391-US

<150> US 61/720,289

<151> 2012-10-30

<160> 202

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 1

Met Glu Thr Gly Leu Arg Gly Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser

35 40 45

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

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
100 105 110
Cys Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly
115 120 125
Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135
<210> 2
<211> 131
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 2
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

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

115 120 125

Val Val Lys

130

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 3

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Val Cys

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 5

Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 6

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 7

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 8

Gln Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH region of APX005, the humanized version of the R-8 rabbit

anti-CD40 antibody

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL region of APX005, the humanized version of the R-8 rabbit
anti-CD40 antibody

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
100 105 110

Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 11

<211> 144

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 11

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser

35 40 45

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr

85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala

115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 12

<211> 143

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 12

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Thr Gly Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe

35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Ser Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60
Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His
65 70 75 80

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

<210> 13

<211> 138

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 13

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

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

115 120 125
 Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 14
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 14
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Gly Gly Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
 35 40 45
 Tyr Tyr Trp Pro Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Val Ala Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala
 65 70 75 80
 Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr
 85 90 95
 Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu Trp Gly
 115 120 125
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 15
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 15
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr

85 90 95

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 16

<211> 141

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 16

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Phe Ala

65 70 75 80

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

130 135 140

<210> 17

<211> 138

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 17

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu Trp
115 120 125
Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 18

<211> 139

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 18

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu

115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 19

<211> 131

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 19

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro

20 25 30

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

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

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

Val Ser Ser

130

<210> 20

<211> 136

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 20

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

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

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

Gly Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 21

<211> 136

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 21

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

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

50 55 60

Trp Ile Gly Val Ile Ser Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
65 70 75 80

Ala Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Arg Ile Ala Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile Trp Gly Pro

115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 22

<211> 130

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 22

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

100 105 110
Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125
Ile Leu
130

<210> 23

<211> 134

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 23

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

65 70 75 80
Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Ser Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly

115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys

130

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 24

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu

85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

100 105 110

Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val

115 120 125

Val Val Lys

130

<210> 25

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 25

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

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

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

<210> 26

<211> 133

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 26

Met Asp Thr Arg Ala Pro Pro Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

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

Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45
Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
85 90 95
Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110
Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125
Glu Val Val Val Arg
130
<210> 27
<211> 135
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 27
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
20 25 30
Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala
35 40 45
Ser Glu Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

100 105 110
Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Asn Thr Phe Gly Gly

115 120 125
Gly Thr Glu Val Val Val Lys

130 135

<210> 28

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 28

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser

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

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

50 55 60
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr

85 90 95
Ile Thr Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110
Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu

115 120 125
Val Val Val Lys

130

<210> 29

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 29

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

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

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

130

<210> 30

<211> 133

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 30

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

Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Val Val Val Lys

130

<210> 31

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 31

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val

65 70 75 80

Ser Ser Arg Phe Glu Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys
130
<210> 32
<211> 132
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 32
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30
Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Glu Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110
Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Leu Glu Ile Leu
130
<210> 33
<211> 138
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 33

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

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

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

<210> 34

<211> 139

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 34

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

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Thr Thr
 85 90 95
 Val Thr Leu Gln Met Pro Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Phe Cys Ala Arg Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe
 115 120 125
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 35
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 35
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45
 Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
 85 90 95
 Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
 115 120 125
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 36

<211> 142

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 36

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Ser Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Gly Ala Asp Thr Ala Thr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala

115 120 125

Asp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 37

<211> 144

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 37

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

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

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

 Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 <210> 38
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 38
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45
 Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr

100 105 110

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

115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 39

<211> 139

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 39

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr

65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser

85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

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

115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 40

<211> 144

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 40

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

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

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

130	135	140
-----	-----	-----

<210> 41

<211> 144

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 41

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

Gly Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr
65 70 75 80
Ala Asn Trp Ala Gln Gly Arg Phe Ile Ile Ser Lys Arg Ser Ser Thr
85 90 95
Ala Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125
Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
<210> 42
<211> 134
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 42
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Ile Thr Pro
20 25 30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Ala Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Tyr Ile Gly Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp
65 70 75 80
Ala Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95
Lys Met Pro Ser Pro Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110
Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr

115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 130
 <210> 43
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 43
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

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

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

<210> 44
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 44
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

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

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

 115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 45

<211> 134

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 45

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

 35 40 45
Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

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

100 105 110
Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys

130

<210> 46

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 46

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser

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

35 40 45

Gln Thr Ile Ser Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr

85 90 95
Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu

115 120 125

Val Val Val Lys

130

<210> 47

<211> 131

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 47

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Asn Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser

100 105 110

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

115 120 125

Val Val Lys

130

<210> 48

<211> 135

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 48

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

115 120 125
Gly Thr Glu Val Val Val Lys

130 135

<210> 49

<211> 130

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 49

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

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

100 105 110
 Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
 115 120 125

Ile Leu

130

<210> 50

<211> 131

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 50

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

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

Ile Asn Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 100 105 110
 Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
 115 120 125

Val Val Lys

130

<210> 51

<211> 130

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 51

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30
Val Ser Ala Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80
Ser Ser Arg Phe Glu Gly Ser Arg Ser Val Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110
Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val
115 120 125
Val Lys
130
<210> 52
<211> 130
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 52
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30
Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60
Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

65						70											80
Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr		
				85					90					95			
Ile	Ser	Gly	Val	Gln	Arg	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gly		
			100					105					110				
Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu		
		115					120					125					
Ile	Leu																
	130																
<210>	53																
<211>	130																
<212>	PRT																
<213>	Oryctolagus cuniculus																
<400>	53																
Met	Asp	Thr	Arg	Ala	Pro	Thr	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp		

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

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

<210> 54

<211> 119

<212>

> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 54

Ala Leu Ala Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala Trp Leu Gln Gln

35 40 45

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu

50 55 60

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln

65 70 75 80

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly

100 105 110

Gly Thr Glu Val Val Val Glu

115

<210> 55

<211> 134

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 55

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50

55

60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

65

70

75

80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

85

90

95

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

100

105

110

Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala Phe Gly Gly Gly

115

120

125

Thr Glu Val Val Val Lys

130

<210> 56

<211> 133

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 56

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Lys Ser Val Tyr Asn Lys Asn His Leu Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro

50

55

60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser

65

70

75

80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr

85

90

95

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

100

105

110

Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr

115 120 125

Glu Val Val Val Glu

130

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 57

Gly Phe Ser Phe Ser Ala Asn Tyr Tyr Met Cys

1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 58

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 59

Gly Phe Asp Leu Ser Ser Thr Tyr Tyr Met Cys

1 5 10

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 60

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Ser Met Cys

1 5 10

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 61

Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 62

Arg Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Met Cys

1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 63

Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Met Cys

1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 64

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 65

Gly Phe Ser Leu Asn Tyr Tyr Trp Pro Cys

1 5 10

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 66
 Gly Ile Asp Phe Ser Ser Tyr Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 67
 Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210>
 > 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 68
 Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Ile Cys
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 69
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Phe Met Cys
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 70
 Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala

1	5	10
<210>	71	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Oryctolagus cuniculus	
<400>	71	
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys		
1	5	10
<210>	72	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Oryctolagus cuniculus	
<400>	72	
Gly Phe Ser Phe Ser Gly Thr Tyr Trp Ile Cys		
1	5	10
<210>	73	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Oryctolagus cuniculus	
<400>	73	
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys		
1	5	10
<210>	74	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Oryctolagus cuniculus	
<400>	74	
Gly Phe Asp Leu Ser Ser Asn Ala Met Asn		
1	5	10
<210>	75	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Oryctolagus cuniculus	

<400> 75

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asn

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 76

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Asp Met Thr

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 77

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Asn

1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 78

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asp

1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 79

Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Val Met Arg

1 5 10

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213>

Oryctolagus cuniculus

<400> 80

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

1 5 10 15

Gly

<210> 81

<211> 18

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 81

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 82

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

1 5 10 15

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 83

Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His Ala Ser Gly Ala Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 84

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 85

Cys Thr Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 86

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

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 87

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 88

Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 89

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

1 5 10 15

Gly

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 90

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 91

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

1 5 10 15

Gly

<210> 92

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 92

Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 93

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Arg Gly

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 94

Cys Ile Asn Thr Gly Ser Ser Val Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 95

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 95

Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Gln Gly

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 96

Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 97

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 97

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

1 5 10 15

<210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 98

Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp Ala Arg Gly

1 5 10 15

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 99

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

1 5 10 15

<210> 100

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 100

Val Ile Trp Asn Asn Gly Glu Ile Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 101

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

1 5 10 15

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 102

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

1 5 10 15

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 103

Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu

1 5

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400>

> 104

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu

1 5 10 15

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 105

Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe

1 5 10

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 106

Ser Ser Tyr Val Arg Tyr Asp Asn Arg Asn Tyr Gly Phe Asn Leu

1 5 10 15

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 107

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu

1 5 10

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 108

Pro Asp Val Gly Phe Asp Phe Ala Ile Asn Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 109

Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Asp Asn Leu

1 5 10

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 110

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu

1 5 10 15

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 111

Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 112

Ser Gly Tyr Asn Asp Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu

1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 113

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu

1 5 10

<210> 114

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 114

Glu Asp Ala Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Arg Asn Leu

1 5 10

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 115

Ala Ser Ala Asp Val Gly Asp Tyr Ser Leu

1 5 10

<210> 116

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 116

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu

1 5 10 15

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 117

Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 118

Ser Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu

1 5 10 15

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 119

Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 120

Gly Tyr Asn Thr Met Ala Ile

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 121

Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile

1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 122

Gly Val Pro Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asn Ile

1 5 10

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 123

Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val

1 5 10

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 124

Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile

1 5 10

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 125

Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile

1 5 10

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 126

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 127

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 128
 Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Glu Leu Ser
 1 5 10
 <210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 129
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
 1 5 10
 <210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 130
 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly
 1 5 10

 <210> 131
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 131
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala
 1 5 10
 <210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 132
 Gln Ala Ser Glu Thr Ile Tyr Thr Leu Leu Ala
 1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 133

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 134

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr

1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 135

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 136

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly

1 5 10

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 137

Gln Ala Ser Glu Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Ala

1 5 10

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 138

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 139

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 140

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr

1 5 10

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 141

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 142

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Gly Tyr Leu Phe

1 5 10

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 143

Gln Ser Ser Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 144

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala

1 5 10

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 145

Gln Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 146

Gln Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 147

<211> 13

<212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 147
 Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys Asn His Leu Ala
 1 5 10

<210> 148
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 148

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 149

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 150

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 151
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 151

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 152

<211> 7
 <212> PRT
 <213>
 > Oryctolagus cuniculus
 <400> 152
 Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 153
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 154
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 154
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 155
 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 156
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus
 <400> 156
 Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5
 <210> 157
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 157
 Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5
 <210> 158
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 158
 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5
 <210> 159
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 159
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5
 <210> 160
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 160
 Gly Ala Ser Ile Leu Glu Ser

1 5
 <210> 161
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 161

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 162

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 163

Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 164

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 165

Glu Ala Ser Lys Leu Pro Ser

1 5

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 166

Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 167

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 168

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 168

Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 169

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 170

Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser

1 5

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 171

Tyr Ala Ser Asp Leu Ala Ser

1 5

<210> 172

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 172

Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala

1 5 10

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 173

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 174

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 174

Gln Gln Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val

1 5 10

<210> 175

<211> 13

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 175

Gln Ser Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly

1 5 10

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 176

Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 177

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 177

Gln Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro

1 5 10

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 178

Gln Ser His Tyr Phe Asp Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Asn Thr

1 5 10

<210> 179

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 179

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 180

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 180

Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile

1 5 10

<210> 181

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 181

Gln Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser

1 5 10

<210> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 182

Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 183

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 183

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

1 5 10

<210> 184

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 184

Gln Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro

1 5 10

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 185

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 186

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 186

Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile

1 5 10

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 187

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 188

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 188

Gln Gln Ser Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile

1 5 10

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 189

Gln Ala Gly Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Asn Ala

1 5 10

<210> 190

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 190

Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr

1 5 10

<210> 191

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 191

Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala

1 5 10

<210> 192

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 192

Gln Gln Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val

1 5 10

<210> 193

<211> 11

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 193

Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr

1 5 10

<210> 194

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 194

Leu Gly Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala

1 5 10

<210> 195

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 195

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
 Gln Lys

<210> 196

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
 1 5 10 15

<210> 197

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 1 5 10 15

Cys His Pro Trp

20

<210> 198

<211> 173

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln

1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu

35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp

50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp

65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys

85 90 95

Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys

100 105 110

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

115 120 125

Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp

130 135 140

Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn

145 150 155 160

Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg

165 170

<210> 199

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu His

<210> 200

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Ser Thr Ser Glu Ala Ser Glu Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu His

<210> 201

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Ile Cys Glu Pro

1

<210> 202

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His

1 5 10

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

제1항에 있어서, 상기 인간 IgG 불변 도메인이 인간 IgG1 CH1 도메인을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

【변경후】

제1항에 있어서, 상기 인간 IgG1 Fc 영역이 인간 IgG1 CH1 도메인을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.