



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월22일
(11) 등록번호 10-2423942
(24) 등록일자 2022년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7035804
(22) 출원일자(국제) 2017년06월09일
심사청구일자 2020년06월04일
(85) 번역문제출일자 2018년12월10일
(65) 공개번호 10-2019-0015716
(43) 공개일자 2019년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036817
(87) 국제공개번호 WO 2017/214547
국제공개일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
62/348,009 2016년06월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02016081455 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
펠리칸 테라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이12 801 캐
피톨라 드라이브
- (72) 발명자
슈라이버 테일러 에이치.
미국 노스캐롤라이나주 27707 더럼 3611 럭비 로
드
허친스 제프 티.
미국 오클라호마주 74017 클레어모어 15823 사우스
4210 로드
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 항-TNFRSF25 항체

(57) 요약

아미노산 48-71의 영역에서의 에피토프에 결합하는 것을 포함하는 항-TNFRSF25 항체 및 이의 변이체가 개시된다. 조사, 진단학적 및 치료적 분야에서 항체의 용도가 또한 고려된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/567 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-TNFRSF25 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 항체 단편은

(i) 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하고, 서열번호 5와 적어도 95% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, 상기 중쇄 CDR1 서열은 GFTFSNHDLN(서열 번호 12)이고, 상기 중쇄 CDR2 서열은 YISSASGLISYADAVRG(서열 번호 14)이고, 상기 중쇄 CDR3 서열은 DPAYTGLYALDF(서열 번호 26) 또는 DPPYSGLYALDF(서열 번호 16)인, 상기 중쇄 가변 영역; 및

(ii) 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하고, 서열번호 6과 적어도 95% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, 상기 경쇄 CDR1 서열은 TLSSELSWYTIV(서열 번호 25)이고, 상기 경쇄 CDR2 서열은 LKSDGSHSKGD(서열 번호 21)이고, 상기 경쇄 CDR3 서열은 CGAGYTLAQYQWV(서열 번호 23)인, 상기 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 식 (FW1)-(CDR1)-(FW2)-(CDR2)-(FW3)-(CDR3)-(FW4)에 따라 CDR 사이에 병치된 가변 영역 프레임워크(FW) 서열을 추가로 포함하되, 상기 중쇄 가변 영역에서의 상기 가변 영역 FW 서열은 중쇄 가변 영역 FW 서열이고, 상기 경쇄 가변 영역에서의 상기 가변 영역 FW 서열은 경쇄 가변 영역 FW 서열인, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 가변 영역 FW 서열은 인간인, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 불변 영역은 IgG1인, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 불변 영역은 IgG4인, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 대상체에서의 종양 세포 아포토시스는 0.1mg/kg 내지 50mg/kg의 용량으로 상기 대상체에 대한 항체 또는 항원 결합 단편의 투여 후 증가한, 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 9

약제학적으로 허용 가능한 담체 및 제1항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는, 종양을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항의 약제학적 조성물 및 암을 치료하기 위한 적어도 1종의 추가 물질을 포함하는 제조 물품.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 적어도 1종의 추가 물질은 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim-3, TNFRSF4, TNFRSF9, TNFRSF18, CD27, CD39, CD47, CD73 또는 CD278을 표적화하는 물질이거나, A2A 수용체 길항제 또는 TGF-베타 길항제인, 제조 물품.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 적어도 1종의 추가 물질은 B7 패밀리 동시자극 분자, TNF 수용체 슈퍼패밀리 동시자극 분자, 백신 조성물 또는 화학치료제인, 제조 물품.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 적어도 1종의 추가 물질은 시험관내 또는 대상체에서의 입양 T 세포 치료에서 사용하기 위한 키메라 항원 수용체-형질주입된 T 세포 또는 증식된 종양 침윤 림프구를 포함하는, 제조 물품.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 적어도 1종의 추가 물질은 자가유래 T 세포 치료의 시험관내 제조 공정 동안 사용되는, 제조 물품.

청구항 15

대상체에서 종양을 치료하는데 사용하기 위한 의약으로서, 상기 종양에서의 TNFRSF25 발현 종양 세포의 아폽토시스를 유도하기에 효과적인 양으로 상기 대상체에게 투여하기에 적합한 제9항의 조성물을 포함하는, 의약.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조성물은 대상체에서 CD8+ T 세포의 증식을 자극하기 위한 것이고, 치료적 유효량으로 상기 대상체에게 투여하기에 적합한 제9항의 조성물을 포함하는, 의약.

청구항 17

제16항에 있어서, CD8+ T 세포의 증식은, 항원 특이적 CD8+ T 세포의 유세포분석기 분석에 의한 결정시, 상기 투여 전의 증식의 기준 수준과 비교해서 적어도 20% 증가되는, 의약.

청구항 18

대상체에서 면역 반응을 유발함으로써 종양을 치료하는데 사용하기 위한 의약으로서, 치료적 유효량으로 상기 대상체에게 투여하기에 적합한 제9항의 조성물을 포함하는, 의약.

청구항 19

대상체에서 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포의 증식을 자극함으로써 종양을 치료하는데 사용하기 위한 의약으로서, 치료적 유효량으로 상기 대상체에게 투여하기에 적합한 제9항의 조성물을 포함하는, 의약.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 5와 적어도 98% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 의약.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 6과 적어도 98% 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 의약.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2016년 6월 9일에 출원된 미국 가출원 제62/348,009호로부터의 우선권의 이익을 주장한다.

[0003]

기술분야

[0004] 본 문헌은 항-TNFRSF25 항체, 및 연구, 치료적 및 진단학적 목적에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 25(TNFRSF25)는 활성화된 및 항원 경험된 T 림프구에 의해 우선적으로 발현된 TNF-수용체 슈퍼패밀리 구성원이다. TNFRSF25는 톨 유사 수용체 또는 Fc 수용체 활성화 후 항원 제시 세포 및 몇몇 내피 세포에서 신속히 상향조절되는 TL1A(TNFSF15라고도 불림)인 이의 리간드에 의해 활성화된다. TNFRSF25는 NF-카파 B 활성을 자극할 수 있고, 또한 카스파제 활성화를 자극하여 세포 아포토시스를 조절할 수 있다(Bodmer et al., *Immunity* 6(1):79-88, 1997; 및 Kitson et al., *Nature* 384(6607):372-375, 1996). 393 개의 아미노산 길이의 인간 TNFRSF25 단백질의 구조적 체계화는 TNF 수용체 1(TNFR1)에 가장 상동성이다. TNFRSF25의 세포외 도메인은 4개의 시스테인 농후 도메인을 포함하고, 세포질 영역은 신호 아포토시스에 공지된 사멸 도메인을 함유한다. 대안적인 스플라이싱은 TNFRSF25의 다수의 구별되는 아이소폼을 생성하고, 이들 중 대부분은 잠재적으로 분비된 분자이다. B 및 T 세포에서의 TNFRSF25 유전자의 대안적인 스플라이싱은 대개 전장의 막 결합된 아이소폼을 생성하는 T 세포 활성화 시 프로그램 변경에 마주치고, T 세포 활성화에 의해 유도된 림프구 증식을 제어하는 데 있어서 관여된다고 생각된다.

[0006] TNFRSF25의 활성화는 T 세포 수용체의 이전의 관여에 의존적이다. TL1A에 대한 TNFRSF25의 결합 후, TNFRSF25 신호전달은 내인성 IL-2에 대한 T 세포의 감수성을 증가시키고, T 세포 증식을 증대시킨다. TNFRSF25의 활성화가 T 세포 수용체 의존적이므로, 생체내 TNFRSF25의 활성화는 동족 항원을 마주치는 T 세포에 특이적이다. 휴식 시 및 기초하는 자가면역이 없을 때, 동족 항원을 규칙적으로 마주치는 대부분의 T 세포는 FoxP3+ 조절 T 세포이다. 임의의 다른 외인성 신호의 부재 하에 TNFRSF25의 자극은 5일 내에 모든 CD4+ T 세포의 8% 내지 10%의 기준으로부터 모든 CD4+ T 세포의 35% 내지 40%로의 FoxP3+ 조절 T 세포의 매우 특이적인 증식을 자극한다(Schreiber et al., *J Clin Invest* 120(10):3629-3640, 2010). TNFRSF25의 치료적 작용제는 Treg 증식을 자극하도록 사용될 수 있고, 이는 천식, 동종이계 고형 장기 이식 및 눈 각막염의 실험 모델에서 염증을 감소시킬 수 있다(상기 Schreiber 등의 문헌; Reddy et al., *J Virol* 86(19):10606-10620, 2012; 및 Wolf et al., *Transplantation* 94(6):569-574, 2012). 유사하게, TNFRSF25 활성화가 항원 의존적이므로, 자가항원 또는 백신 항원과 함께 TNFRSF25의 동시자극은 각각 면역병리학의 악화 또는 증대된 백신 자극된 면역력을 발생시킬 수 있다(Schreiber et al., *J Immunol* 189(7):3311-3318, 2010).

발명의 내용

[0007] 본 문헌은, 적어도 부분적으로, TNFSF25 내의 특정한 에피토프에 표적화된 항체의 개발에 기초한다. 몇몇 실시 형태에서, 항체는 종 사이에 교차반응할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 본 문헌은 다른 것의 100배 내(예를 들어, 10배 내)인 K_d 값으로 설치류 및 인간 TNFRSF25 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 항체를 제공한다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 항체는 TNFRSF25에 결합하는 TL1A(예를 들어, 설치류 또는 인간 TL1A)의 신호전달 활성화와 일치하는 신호전달 사건을 유발할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 인간 TNFRSF25의 아미노산 C48-L71의 영역에서 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체는 아미노산 P64-T69의 영역에서 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0008] 본 문헌은 또한, 적어도 부분적으로, TNFRSF25에 표적화된 친화도 성숙된 항체의 개발에 기초한다. 친화도 성숙된 항체는 모 항-TNFRSF25 항체와 비교하여 TNFRSF25에 대한 증가한 친화도를 가질 수 있거나, 친화도 성숙된 항체는 모 항-TNFRSF25 항체와 비교하여 증가한 활성을 가질 수 있거나, 친화도 성숙된 항체는 모 항-TNFRSF25 항체와 비교하여 증가한 TNFRSF25 친화도 및 증가한 활성 둘 다를 가질 수 있다.

[0009] 따라서, 제1 양태에서, 본 문헌은 항-TNFRSF25 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 특징으로 한다. 항체 또는 항체 단편은 (i) 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 중쇄 가변 영역(여기서, 중쇄 CDR1 서열은 GFTFSNHDLN(서열 번호 12)이고, 중쇄 CDR2 서열은 YISSASGLISYADAVRG(서열 번호 14)이고, 중쇄 CDR3 서열은 DPAYTGLYALDF(서열 번호 26)임); 및 (ii) 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역(여기서, 경쇄 CDR1 서열은 TLSSELSWYTIV(서열 번호 25)이고, 경쇄 CDR2 서열은 LKSDGSHSKGD(서열 번호 21)이고, 경쇄 CDR3 서열은 CGAGYTLAQYGVV(서열 번호 23)임)을 포함할 수 있다.

[0010] 항체 또는 항체 단편은 (i) 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 중쇄 가변 영역(여기서, 중쇄 CDR1 서열은 GFTFSNHDLN(서열 번호 12)이고, 중쇄 CDR2 서열은 YISSASGLISYADAVRG(서열 번호 14)이고, 중쇄 CDR3 서열은 DPPYSGLYALDF(서열 번호 16)임); 및 (ii) 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역(여기서,

경쇄 CDR1 서열은 TLSSELSWYTIV(서열 번호 25)이고, 경쇄 CDR2 서열은 LKSDGSHSKGD(서열 번호 21)이고, 경쇄 CDR3 서열은 CGAGYTLAQYGVV(서열 번호 23)임을 포함할 수 있다.

- [0011] 항체 또는 항체 단편은 (i) 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 중쇄 가변 영역(여기서, 중쇄 CDR1 서열은 GFTFSNHDLN(서열 번호 12)이고, 중쇄 CDR2 서열은 YISSASGLISYADAVRG(서열 번호 14)이고, 중쇄 CDR3 서열은 DPAYTGLYALDF(서열 번호 26)임), 및 (ii) 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역(여기서, 경쇄 CDR1 서열은 TLSSELSGFTIV(서열 번호 27)이고, 경쇄 CDR2 서열은 LKSDGSHSKGD(서열 번호 21)이고, 경쇄 CDR3 서열은 CGAGYTLANQYGVV(서열 번호 28)임)를 포함할 수 있다.
- [0012] 항체 또는 항원 결합 단편은 식 (FW1)-(CDR1)-(FW2)-(CDR2)-(FW3)-(CDR3)-(FW4)에 따라 CDR 사이에 병치된 가변 영역 프레임워크(FW) 서열을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 중쇄 가변 영역에서의 가변 영역 FW 서열은 중쇄 가변 영역 FW 서열이고, 경쇄 가변 영역에서의 가변 영역 FW 서열은 경쇄 가변 영역 FW 서열이다. 가변 영역 FW 서열은 인간일 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 추가로 함유할 수 있다. 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 불변 영역은 IgG1 또는 IgG4이다. 대상체에서의 종양 세포 아포토시스는 약 0.1mg/kg 내지 약 50mg/kg의 용량에서 대상체에 대한 항체 또는 항원 결합 단편의 투여 후 증가할 수 있다.
- [0013] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0014] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 상기 약제학적 조성물, 및 암을 치료하기 위한 적어도 1종의 추가 물질을 함유하는 제조 물품을 특징으로 한다. 적어도 1종의 추가 물질은 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim-3, TNFRSF4, TNFRSF9, TNFRSF18, CD27, CD39, CD47, CD73 또는 CD278을 표적화하는 물질일 수 있거나, A2A 수용체 길항제 또는 TGF-베타 길항제일 수 있다. 적어도 1종의 추가 물질은 B7 패밀리의 동시자극 분자, TNF 수용체 슈퍼패밀리 동시자극 분자, 백신 조성물 또는 화학치료제 중 하나 이상일 수 있다. 적어도 1종의 추가 물질은 시험관내 또는 대상체에서 입양 T 세포 치료에서 사용하기 위한 키메라 항원 수용체-형질주입된 T 세포 또는 증식된 종양 침윤 림프구를 포함할 수 있다. 적어도 1종의 추가 물질은 자가유래 T 세포 치료의 시험관내 제조 공정 동안 사용될 수 있다.
- [0015] 훨씬 또 다른 양태에서, 본 문헌은 대상체에서 종양을 치료하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 종양에서 TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스를 유도하기에 효과적인 양의 본 명세서에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 문헌은 또한 대상체에서 CD8+ T 세포의 증식을 자극하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. CD8+ T 세포의 증식은, 항원 특이적 CD8+ T 세포의 유세포분석기 분석에 의해 결정된 바대로, 투여 전에 증식의 기준 수준과 비교하여 적어도 약 20% 증가할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 문헌은 대상체에서 면역 반응을 유발하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0018] 본 문헌은 또한 대상체에서 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포의 증식을 자극하는 방법을 특징으로 하고, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료적 유효량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체 또는 이의 Fab 단편은, TNFRSF25에 결합 시, TNFRSF25에 결합하는 TL1A에 의해 유발된 신호전달 사건과 일치하는 신호전달 사건을 유발하고, 항체는 인간 TNFRSF25의 아미노산 C48-L71의 영역에서 에피토프에 결합한다. 항체 또는 단편은 TNFRSF25의 하기 잔기 중 적어도 하나를 함유하는 에피토프에 결합할 수 있다: 서열 번호 1의 C48, R49, G50, C51, P52, A53, G54, H55, Y56, L57, K58, A59, P60, C61, T62, E63, P64, C65, G66, N67, S68, T69, C70 또는 L71. TNFRSF25에 대한 항체 또는 단편의 결합은 TNFRSF25에 대한 TL1A의 결합을 차단할 수 있다. 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항체는 임의의 하위유형의 IgG 항체일 수 있다. 항체 또는 단편은 다른 것의 100배 내인 K_d 값으로 마우스 TNFRSF25, 비인간 영장류 TNFRSF25 및 인간 TNFRSF25에 결합할 수 있다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체 또는 이의 Fab 단편은, TNFRSF25에 대한 결합 시, TNFRSF25에 결합하는 TL1A에 의해 유

발된 신호전달 사건에 특징적인 신호전달 사건을 유발하고, 항체는 인간 TNFRSF25의 아미노산 P64-T69의 영역에서 에피토프에 결합한다. 항체 또는 단편은 TNFRSF25의 하기 잔기 중 적어도 하나를 함유하는 에피토프에 결합할 수 있다: 서열 번호 1의 P64, C65, G66, N67, S68 또는 T69. TNFRSF25에 대한 항체 또는 단편의 결합은 TNFRSF25에 대한 TL1A의 결합을 차단할 수 있다. 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항체는 임의의 하위유형의 IgG 항체일 수 있다. 항체 또는 단편은 다른 것의 100배 내인 K_d 값으로 마우스 TNFRSF25, 비인간 영장류 TNFRSF25 및 인간 TNFRSF25에 결합할 수 있다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체는 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 갖는 에피토프에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열과 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 에피토프, 또는 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열과 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0022] 훨씬 또 다른 양태에서, 본 문헌은 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체는 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열과 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 에피토프, 또는 서열 번호 1의 P64-T69에 기재된 서열과 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 갖는 에피토프에 결합한다.

[0023] 본 문헌 또한 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체는 4개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열을 갖는 에피토프에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 3개 이하의 아미노산 치환, 2개 이하의 아미노산 치환 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열을 갖는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 특징으로 하고, 항체는 1개의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 1의 P64-T69에 기재된 서열을 갖는 에피토프에 결합한다.

[0025] 훨씬 또 다른 양태에서, 본 문헌은 포유류에서 종양 성장을 저해하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 인간 TNFRSF25에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체, 또는 이의 Fab 단편을 함유하는 조성물을 포유류에게 투여하는 단계를 포함할 수 있고, 항체 또는 이의 Fab 단편은 TNFRSF25에 결합하는 TL1A에 의해 자극된 신호전달 사건을 모방할 수 있고, 항체는 인간 TNFRSF25의 아미노산 C48-L71의 영역에서 에피토프에 결합한다. 항체 또는 단편은 TNFRSF25의 하기 잔기 중 적어도 하나를 함유하는 에피토프에 결합할 수 있다: 서열 번호 1의 C48, R49, G50, C51, P52, A53, G54, H55, Y56, L57, K58, A59, P60, C61, T62, E63, P64, C65, G66, N67, S68, T69, C70 또는 L71. 항체 또는 단편은 TNFRSF25의 하기 잔기 중 적어도 하나를 함유하는 에피토프에 결합할 수 있다: 서열 번호 1의 P64, C65, G66, N67, S68 또는 T69. TNFRSF25에 대한 항체 또는 단편의 결합은 TNFRSF25에 대한 TL1A의 결합을 차단할 수 있다. 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항체는 임의의 하위유형의 IgG 항체일 수 있다. 항체 또는 단편은 다른 것의 100배 내인 K_d 값으로 마우스 TNFRSF25, 비인간 영장류 TNFRSF25 및 인간 TNFRSF25에 결합할 수 있다.

[0026] 또 다른 양태에서, 본 문헌은 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 단리된 단일클론 항체 또는 Fab 단편을 함유하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 또한, 본 문헌은 환자에서 암, 감염성 질환 또는 조직 이식편을 치료하기 위한 약제학적 조성물의 용도를 특징으로 한다.

[0027] 달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에 사용된 모든 과학 용어 및 기술 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명을 실행하도록 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기 기재되어 있다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참고로 포함된다. 상충의 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서가 우세할 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 오직 예시적이고, 제한인 것으로 의도되지 않는다.

[0028] 본 발명의 하나 이상의 실시형태의 상세내용은 수반된 도면 및 하기 설명에 기재되어 있다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면 및 청구항으로부터 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a는 TNFRSF25가 약간의 상동성을 공유하는 인간 TNFR1(서열 번호 3) 및 인간 Fas(서열 번호 4)를 갖는 인간 TNFRSF25(서열 번호 2)의 아미노산 서열 정렬이다. 서열 넘버링은 예상된 성숙 단백질의 N 말단에서 시작한다.

시스템인 농후 영역 I-IV, 막관통 도메인(TM) 및 사멸 도메인(DD)의 위치가 표시된다. 서열의 적어도 2개 사이에 동일한 잔기는 볼드체이고 밑줄이다.

도 1b는 인간으로부터의 2개의 대표적인 TNFRSF25 아미노산 서열(서열 번호 1 및 7), 및 마우스(서열 번호 8), 레서스 마카크(Rhesus Macaque)(서열 번호 9) 및 사이노몰거스 마카크(Cynomolgus Macaque)(서열 번호 10)로부터의 대표적인 TNFRSF25 아미노산 서열을 보여준다.

도 2는 다양한 재조합 TNFRSF25 폴리펩타이드의 발현을 평가하기 위한 방법에서의 단계를 도시하는 다이어그램이다.

도 3은 6개의 재조합 TNFRSF25 폴리펩타이드에 대한 발현 수준을 작도한 그래프이다.

도 4는 재조합 TNFRSF25 폴리펩타이드에 대한 키메라 항-TNFRSF25 항체의 결합을 평가하기 위한 방법에서의 단계를 도시하는 다이어그램이다.

도 5는 키메라 항-TNFRSF25 항체에 대한 재조합 TNFRSF25 폴리펩타이드의 증가하는 양의 결합을 작도한 그래프이다.

도 6은 항-TNFRSF25 항체에 대한 다양한 TNFRSF25 알라닌 돌연변이체의 결합의 배수 변화를 작도한 그래프이다.

도 7은 항체 결합에서 관여되는 것으로 확인되거나 가능하게는 관여된 잔기의 위치를 나타내는 TNFRSF25의 구조의 다이어그램이다.

도 8은, 항체 결합에 관여한 것으로 확인된 아미노산의 위치를 나타내는, 2개의 측으로부터 본 TNFRSF25 구조의 공간 충전 다이어그램이다. "핫 스팟" 잔기는 48번 아미노산 내지 71번 아미노산의 도메인에 있는 것으로 확인되었다.

도 9는 TL1A-Ig 융합 단백질의 존재 또는 부재 하에 TNFRSF25에 대한 항-TNFRSF25 항체의 결합 또는 항-TNFRSF25 항체의 존재 또는 부재 하에 TNFRSF25에 대한 TL1A-Ig 결합의 저해를 작도한 그래프이다. 왼쪽 열: 재조합 인간 TNFRSF25에 대한 항-TNFRSF25 항체("햄스터 모")의 결합은 TL1A-Ig의 존재 하에 완전히 저해되었다. 중앙 열: 재조합 인간 TNFRSF25에 대한 TL1A-Ig 융합의 결합은 모 항-TNFRSF25 항체의 존재 하에 완전히 저해되었다. 오른쪽 열: 재조합 인간 TNFRSF25에 대한 인간화된 항-TNFRSF25 항체의 결합은 TL1A-Ig의 존재 하에 완전히 저해되었다.

도 10은 TNFRSF25-Fc 융합 단백질에 대한 모 인간화된 항-TNFRSF25 항체 및 친화도 성숙된 클론의 결합을 작도한 그래프이다.

도 11a 및 도 11b는 모 항-TNFRSF25 항체, TL1A 및 표시된 친화도 성숙된 클론의 카스파제 활성을 작도한 그래프이다. 친화도 성숙된 클론은 IgG1 포맷에 있다.

도 12는 모 항-TNFRSF25 항체, TL1A 및 표시된 친화도 성숙된 클론의 카스파제 활성을 작도한 그래프이다. 친화도 성숙된 클론은 표시된 바대로 IgG1 또는 IgG4 포맷에 있다.

도 13a는 ALEXAFLUOR(등록상표) 647 표지된 TL1A 및 다양한 항체 경쟁자(4C12 모 및 M3, M4 및 M5 친화도 성숙된 클론)를 TNFRSF25를 발현하는 p815 세포(DR3)와 항온처리하는 경쟁 검정에서 형광 수준을 작도한 그래프이다. 도 13b는 ALEXAFLUOR(등록상표) 647 표지된 4C12 및 다양한 항체 경쟁자(4C12 모, hIgG1, 및 M3, M4 및 M5 친화도 성숙된 클론)를 TNFRSF25를 발현하는 p815 세포(DR3)와 항온처리하는 경쟁 검정에서 형광 수준을 작도한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030]

본 문헌은, 적어도 부분적으로, TNFSF25 내의 특정한 에피토프에 표적화된 항체의 개발에 기초한다. 예를 들어, 본 문헌은 인간 TNFRSF25의 아미노산 C48-L71의 영역에서 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 다른 것의 100배(예를 들어, 10배 내) 내인 K_d 값으로 설치류 및 인간 TNFRSF25 폴리펩타이드에 결합할 수 있고, TNFRSF25에 결합하는 설치류 또는 인간 TL1A의 신호전달 활성을 모방할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항체는 태반 포유류에서 폴리펩타이드의 보존된 영역인 아미노산 P64-T69의 영역에서의 에피토프에 결합할 수 있다. T 세포(예를 들어, 인간 T 세포, 쥐 T 세포 또는 마카크 T 세포)의 증식을 자극하기 위해 본 명세서에 제공된 항체 또는 하나 이상의 항체를 함유하는 조성물 중 하나 이상을 사용하는 방법, 및 (예를 들어, CD8+ T 세포의 증식을 자극하기에 효과적인 항-TNFRSF25 항체의 양을 투여함으로써) 인간 암 환자를 치료

하기 위해 하나 이상의 항체 또는 조성물을 사용하는 방법이 본 명세서에 또한 제공된다.

[0031] 본 문헌은 또한 친화도 성숙된 인간화된 TNFRSF25 특이적 단일클론 항체, 및 친화도 성숙된 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 특히 T 세포(예를 들어, 인간 T 세포, 예를 들어 자연 발생 종양 반응성 CD8+ T 세포 또는 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포, 및 췌장 T 세포 또는 마카크 T 세포)의 증식을 자극하기 위해 친화도 성숙된 항체를 사용하는 방법, 및 T 세포의 증식이 유리한 효과를 가질 수 있는 암 및 다른 질환 상태(예를 들어, 감염성 질환, 이식편 대 숙주 질환 및 자가면역 질환)의 치료에서 친화도 성숙된 항체를 사용하는 방법이 본 명세서에 또한 제공된다. 상기 방법은 예를 들어 CD8+ T 세포 또는 조절 T 세포의 적절한 집단의 증식을 자극하기에 효과적인 친화도 성숙된 항체의 양을 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0032] 인간 TNFR1 및 FA에 대한 아미노산 서열과 정렬된 인간 TNFRSF25에 대한 부분 아미노산 서열은 도 1에 도시되어 있다. 인간 TNFRSF25의 대표적인 전장 아미노산 서열은 MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARA QGGTRSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASVADTRCGCKPGWFEVCEQ VSQCVSSSPFYCQPCLDGALHRHRLLCSSRDTCGTCLPGFYEHDGCVSPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVPLLLGATLTYYTRHCW PHKPLVTADAGMEALTPPPATHLSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNWSWTPGYPETQEALCPQVTSWDQLPSRALGPAAAPTLSPEPAGSPAMMLQ PGPQLYDVMADVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQYEMLRWRQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLRSRLQRGP (서열 번호 1)이다.

[0033] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 면역글로불린 또는 항체(예를 들어, 인간, 햄스터, 고양이, 마우스, 연골 어류 또는 낙타 항체), 및 임의의 이의 유도체 또는 접합체를 의미한다. 매우 다양한 항체가 당해 분야의 숙련자에 의해 공지되어 있다. 항체의 비제한적인 예는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 인간화된 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 단쇄 항체(예를 들어, 단일 도메인 항체, 낙타 항체 및 연골 어류 항체), 키메라 항체, 고양이 항체 및 고양이화 항체를 포함한다. 단일 클론 항체는 항원의 특정한 에피토프에 대한 항체의 균일한 집단이다. 다중클론 항체는 면역화된 동물의 혈청에 함유된 항체 분자의 불균일한 집단이다. 용어 "항체"는 또한 항체 유도체 및 접합체(예를 들어, 안정화 단백질, 검출 가능한 모이어티 또는 치료제에 접합된 항체)를 포함한다.

[0034] 폴리펩타이드(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)과 관련하여 "단리된" 또는 "정제한다"란, 폴리펩타이드가 자연에서 보통 발견되는 세포 성분(예를 들어, 다른 폴리펩타이드, 지질, 탄수화물 및 핵산)으로부터 어느 정도로 분리된다는 것을 의미한다. 몇몇 실시형태에서, "단리된" 폴리펩타이드는 폴리펩타이드가 자연에서 발견되고 생성되는 환경 이외의 환경에서 발견되고 생성되는 것이다. 예를 들어, 식물 폴리펩타이드는 박테리아 또는 진균에서 발견되고 생성될 때 단리된다. 유사하게, 식물 폴리펩타이드는 이의 유전자 코딩 서열이 키메라 조절 유전 요소에 작동 가능하게 연결되고 폴리펩타이드가 자연에서 발견되지 않는 조직에서 발견될 때 단리된다.

[0035] 단리된 폴리펩타이드는 비환원 폴리아크릴아미드 겔에서 단일 주요 밴드를 생성시킬 수 있다. 단리된 폴리펩타이드는 적어도 약 75% 순수(예를 들어, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 순수)할 수 있다. 단리된 폴리펩타이드는 예를 들어 자연 공급원으로부터의 추출에 의해, 화학 합성에 의해, 또는 숙주 세포 또는 형질전환 식물에서 재조합 제조에 의해 얻어질 수 있고, 예를 들어 친화도 크로마토그래피, 면역침전, 크기 배제 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 정제의 정도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 제한 없이, 칼럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 측정될 수 있다.

[0036] "항원 결합 단편"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 가변 도메인(예를 들어, 포유류(예를 들어, 고양이, 인간, 햄스터, 또는 마우스) 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린의 가변 도메인, 낙타 가변 항원 결합 도메인(VHH) 또는 연골 어류 면역글로불린 새로운 항원 수용체(Ig-NAR) 도메인)를 함유하는 전장 항체의 임의의 부분이다. 항체 단편의 비제한적인 예는 항체 단편으로부터 형성된 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 다이아바디, 선형 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다. 적어도 하나의 낙타 VHH 도메인 또는 적어도 하나의 연골 어류 Ig-NAR 도메인을 함유하는 추가 항체 단편은 미니-바디, 마이크로-항체, 서브나노-항체 및 나노-항체, 및 예를 들어 미국 공보 제2010/0092470호에 기재된 임의의 항체의 다른 형태를 포함한다.

[0037] "Fv 단편"은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단한 비공유 회합으로 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이합체로 이루어진다. 각각의 가변 도메인의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)이 VH-VL 이합체의 표면에서의 항원 결합 부위를 한정하도록 상호작용하는 것은 이 입체 배좌에서이다. 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 항원 결합 부위의 부분을 형성하는 면역글로불린(중쇄 또는 경쇄 면역글로불린) 내의 영역을 의미한다. 당해 분야에 공지된 바대로,

중쇄 및 경쇄 면역글로불린은 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3이라 불리는 3개의 CDR을 함유한다. 임의의 항체 또는 항원 결합 단편에서, 중쇄 면역글로불린으로부터의 3개의 CDR 및 경쇄 면역글로불린으로부터의 3개의 CDR은 함께 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 항원 결합 부위를 형성한다. Kabat 데이터베이스는 경쇄 면역글로불린 또는 중쇄 면역글로불린에 존재하는 숫자 CDR 서열에 대해 분야에서 사용되는 일 시스템이다.

[0038] 중합하면, 6개의 CDR은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 오직 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 반)은 보통 전체 결합 부위보다 낮은 친화도이더라도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다. "Fab 단편"은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(C_H1)을 함유한다. "Fab 단편"은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스템을 함유하는 중쇄 C_H1 도메인의 카복시 말단에서 적은 잔기의 첨가에 의해 "Fab' 단편"과 다르다. "F(ab')₂ 단편"은 원래 이들 사이에 힌지 시스템을 갖는 "Fab' 단편의 쌍으로서 생성된다. 파파인 또는 펩신 분해와 같은 이러한 항체 단편을 제조하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 항체 분자의 펩신 분해에 의해 생성될 수 있고, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 이황화 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있다. 몇몇 경우에, Fab 발현 라이브러리가 작제될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Huse et al., *Science*, 246:1275, 1989]을 참조한다. 생성되면, 항체 또는 이의 단편은 표준 면역검정 방법, 예컨대 ELISA 기법, 방사선면역검정 및 웨스턴 블로팅을 이용하여 TNFRSF25 폴리펩타이드의 인식에 대해 시험될 수 있다. 문헌[*Short Protocols in Molecular Biology*, Chapter 11, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, Ed. Ausubel et al., 1992]을 참조한다.

[0039] 항체는 IgA-, IgD-, IgE, IgG- 또는 IgM-유형, 예를 들어 IgG- 또는 IgM-유형, 예컨대 제한 없이, IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-, IgM1- 및 IgM2-유형일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에, 항체는 IgG1-, IgG2- 또는 IgG4-유형이다.

[0040] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체는 완전 인간 또는 인간화된 항체일 수 있다. "인간 항체"란 인간의 게놈에 존재하는 핵산(예를 들어, 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 유전자좌위)에 의해 코딩된 항체를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 인간 항체는 인간 세포 배양(예를 들어, 고양이 하이브리도마 세포)에서 생성될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 인간 항체는 비인간 세포(예를 들어, 마우스 또는 햄스터 세포주)에서 생성될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 인간 항체는 박테리아 또는 효모 세포에서 생성될 수 있다.

[0041] 인간 항체는 이중발생성 항체, 예컨대 쥐와 또는 래트(rat) 가변 및/또는 불변 영역을 보유하는 항체와 연관된 소정의 문제점을 회피할 수 있다. 예를 들어, 효과기 부분이 인간이므로, 이것은 예를 들어 보체 의존적 세포독성 또는 항체 의존적 세포 세포독성에 의해 더 효율적으로 표적 세포를 파괴하기 위해 인간 면역계의 다른 부분과 더 양호하게 상호작용할 수 있다. 또한, 인간 면역계는 외래로서 항체를 인식하지 않아야 한다. 추가로, 인간 순환에서의 반감기는 천연 발생 인간 항체와 유사하여서, 더 적고 덜 빈번한 용량이 주어지게 한다. 인간 항체를 제조하는 방법이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0042] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "인간화된 항체"는 비인간(예를 들어, 마우스, 햄스터, 래트, 토끼 또는 염소) 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 인간 항체를 의미한다. 인간화된 항체는 일반적으로 인간 불변 및/또는 가변 영역 도메인을 보유하는 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 다른 종으로부터의 키메라 또는 돌연변이체 단일클론 항체 또는 특정한 변형이다. 비제한적인 예에서, 인간화된 항체는 수혜자 항체의 초가변 영역(HVR) 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 역량을 갖는 비인간 종(도너) 항체, 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 염소 항체로부터의 HVR 잔기에 의해 대체된 인간 항체(수혜자 항체)이다. 몇몇 실시형태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비인간 잔기에 의해 대체될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 인간화된 항체는 수혜자 항체 또는 도너 항체에서 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체 성능을 개선하도록 이루어질 수 있다.

[0043] 몇몇 실시형태에서, 인간화된 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프(CDR)가 비인간 면역글로불린의 것에 상응하는 적어도 1개, 통상적으로 2개의 가변 도메인의 실질적인 모두를 함유할 수 있는 한편, 프레임워크 영역의 모두 또는 실질적인 모두는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변(Fc) 영역의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린의 것을 함유할 수 있다.

[0044] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 (예를 들어, 상응하는 비인간화된 항체와 비교하여) 감소한 또는 최소 효과기 기능을 가질 수 있어서, 상응하는 비인간화된 항체가 그런 것과 동일한 정도로 효과기 세포 작용을 자극하지 않는다.

[0045] 인간화된 항체를 생성하는 기법은 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 새로운 인

공 단백질 분자 또는 "키메라" 항체를 형성하기 위해 단백질 이황화 결합을 통해 결합된 항체 도메인의 제어된 재배열을 이용할 수 있다(Konieczny et al., *Haematologia (Budap.)* 14:95, 1981). 재조합 DNA 기술은 마우스 항체 가변 경쇄 및 중쇄 도메인 및 인간 항체 경쇄 및 중쇄 불변 도메인을 코딩하는 DNA 서열 사이의 유전자 융합을 작제하도록 이용될 수 있다(Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851, 1984). 예를 들어, 젓과 단일클론 항체의 항원 결합 부분 또는 CDR을 코딩하는 DNA 서열은 인간 항체 중쇄 및 경쇄의 프레임워크를 코딩하는 DNA 서열로 분자 수단에 의해 그래프팅될 수 있다(Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; 및 Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988). 발현된 재조합 생성물은 "재성형된" 또는 인간화된 항체라 불리고, 젓과 단일클론 항체의 인간 항체 경쇄 또는 중쇄 및 항원 인식 부분, CDR의 프레임워크를 함유한다.

[0046] 중쇄 및 경쇄를 설계하고, 인간화된 항체를 제조하기 위한 다른 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,530,101호; 제5,565,332호; 제5,585,089호; 제5,639,641호, 제5,693,761호; 제5,693,762호; 및 제5,733,743호에 기재되어 있고, 항체를 인간화하기 위한 훨씬 추가의 방법은 예를 들어 미국 특허 제4,816,567호; 제4,935,496호; 제5,502,167호; 제5,558,864호; 제5,693,493호, 제5,698,417호; 제5,705,154호; 제5,750,078호; 및 제5,770,403호에 기재되어 있다.

[0047] 용어 "단쇄 항체"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 가변 결합 도메인(예를 들어, 포유류 중쇄 또는 경쇄 변역글로불린의 가변 도메인, 낙타 VHH, 또는 연골 어류(예를 들어, 상어) Ig-NAR 도메인)을 함유하는 단일 폴리펩타이드를 의미한다. 단쇄 항체의 비제한적인 예는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0048] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "단일 도메인 항체"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 1개의 낙타 VHH 또는 적어도 1개의 연골 어류 Ig-NAR 도메인을 함유하는 폴리펩타이드를 의미한다. 단일 도메인 항체의 비제한적인 예는 예를 들어 미국 공보 제2010/0092470호에 기재되어 있다.

[0049] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 샘플 내의 특정한 항원에 결합할 때 이 항원, 예를 들어 TNFRSF25에 "특이적으로 결합하고", 샘플 내의 다른 분자를 인식하고 결합시키거나, 더 적은 정도로 인식하고 결합시키지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인산염 완충 식염수 중에 예를 들어 약 1×10^{-6} M 이하(예를 들어, 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하 또는 약 1×10^{-12} M 이하)의 친화도(K_d)로 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있다. 단백질 에피토프를 특이적으로 결합시키는 항체 또는 항원 결합 단편의 능력은 임의의 당해 분야에 공지된 방법 또는 본 명세서에 기재된 이 방법을 이용하여(예를 들어, 비아코어(Biacore)/표면 플라즈몬 공명에 의해) 결정될 수 있다. 이것은 예를 들어 살아 있는 형질전환된 세포에서 카스파제 활성화를 자극하기 위한 방법으로서 살아 있는 세포에서 TNFRSF25에 대한 결합, ELISA 방법을 이용하여 검출된 바와 같은 인간 TNFRSF25 융합 단백질을 포함하는 부동화된 표적 기질에 대한 결합, 유세포분석법에 의해 검출된 바와 같은 살아 있는 세포에서 TNFRSF25에 대한 결합, 또는 표면 플라즈몬 공명(ProteOn 포함)에 의한 부동화된 기질에 대한 결합을 포함할 수 있다.

[0050] TNFRSF25에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는 항체는 표준 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, 서열 번호 1, 서열 번호 2에 기재된 서열, 또는 적어도 6개 내지 10개의 아미노산 길이인 서열 번호 1 또는 서열 번호 2의 단편을 갖는) TNFRSF25 폴리펩타이드는 재조합으로 제조되거나, 생물학적 샘플(예를 들어, 비상동성 발현 시스템)로부터 정제되거나, 화학적으로 합성되고, 토끼, 닭, 마우스, 기니아 피그 또는 래트를 포함하는 숙주 동물을 면역화하기 위해 사용될 수 있다. 면역학적 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있는 다양한 애뉴버트는 숙주 종에 따라 달라지고, 프로인트 애뉴버트(완전 및 불완전), 최소 겔, 예컨대 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예컨대 라이소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다중음이온, 펩타이드, 오일 에멀션, 키텔 림펫 헤모사이아닌 및 다이아이트로페놀을 포함한다. 단일클론 항체는 TNFRSF25 폴리펩타이드 및 표준 하이브리도마 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 특히, 단일클론 항체는 예컨대 Kohler 등이 기재한 배양물 중의 연속 세포주에 의한 항체 분자의 제조를 제공하는 임의의 기법(*Nature* 256:495, 1975), Kosbor 등의 인간 B 세포 하이브리도마 기법(*Immunology Today*, 4:72, 1983) 또는 Cote 등(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026, 1983) 및 Cole 등이 기재한 EBV-하이브리도마 기법(*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1983)에 의해 얻어질 수 있다. 이러한 항체는 임의의 변역글로불린 종류, 예컨대 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, 및 임의의 이의 하위종류일 수 있다. 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마는 시험관내 및 생체내 배양될 수 있다.

[0051] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 단일클론 항-TNFRSF25 항체는 1개 내지 24개의 변형(예를 들어, 치환, 부가 또는 결실)을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 중쇄 가변

영역을 가져서, 아미노산 서열은 서열 번호 5와 80% 내지 99.5% 동일하다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 단일클론 항-TNFRSF25 항체는 1개 내지 23개의 변형(예를 들어, 치환, 부가 또는 결실)을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역을 가져서, 아미노산 서열은 서열 번호 6과 80% 내지 99.9% 동일하다. 서열 번호 5 및 서열 번호 6의 서열은 하기와 같다:

[0052] EVQLVESGGGLSPGNSLQLSCEASGFTFSNHDNLNVRQAPGKGLEWVAYISSASGLISYADAVRGRFTISRDNKNSLFLQMNKLKSEDTAMYYCARDPPYSGLYALDFWGQGTQVTVSS(서열 번호 5)

[0053] QPVLTSQSPSASASLSGSVKLTCTLSSELSSYTIWVYQQRDPKAPKYVMYLSKDSGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAHRYSISNVQSEDDATYFCGAGYTLAQYGWVFGSGTKVTVL(서열 번호 6)

[0054] 따라서, 본 문헌은 1개 내지 24개의 서열 변형을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 5, 또는 이의 항원 결합 단편에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드, 및 서열 번호 5, 또는 이의 항원 결합 단편과 적어도 약 80%(예를 들어, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%)의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드는 서열 번호 5, 또는 이의 항원 결합 단편과 비교하여 24개 이하(예를 들어, 24개, 23개, 22개, 21개, 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개, 13개, 12개, 11개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 아미노산 치환을 함유할 수 있다.

[0055] 본 문헌은 또한 1개 내지 23개의 서열 변형을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 6, 또는 이의 항원 결합 단편에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드, 및 서열 번호 6, 또는 이의 항원 결합 단편에 적어도 약 80%(예를 들어, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%)의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드는 서열 번호 6, 또는 이 항원 결합 단편과 비교하여 23개 이하(예를 들어, 23개, 22개, 21개, 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개, 13개, 12개, 11개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개)의 아미노산 치환을 함유할 수 있다.

[0056] 본 문헌은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드 및 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드 둘 다를 함유하는 항체 및 항원 결합 단편을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 예를 들어 항체 또는 항원 결합 단편은 1개 내지 24개의 아미노산 치환(예를 들어, 1개 내지 5개, 5개 내지 10개, 10개 내지 15개, 15개 내지 20개, 또는 20개 내지 24개의 전체 아미노산 치환)을 갖는 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열 및 1개 내지 23개의 아미노산 치환(예를 들어, 1개 내지 5개, 5개 내지 10개, 10개 내지 15개, 15개 내지 20개, 또는 20개 내지 23개의 전체 아미노산 치환)을 갖는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열 둘 다를 함유할 수 있다. 아미노산 치환은 펩타이드 서열에서의 또 다른 것에 의한 1개의 아미노산 잔기의 대체를 의미한다.

[0057] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항-TNFRSF25 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열과 적어도 80%의 동일성(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TNFRSF25의 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 4개 이하(예를 들어, 3개 이하, 또는 2개 이하)의 아미노산 치환, 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 1의 C48-L71에 기재된 서열을 갖는 TNFRSF25의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0058] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 항-TNFRSF25 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 1의 P64-T69에 기재된 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TNFRSF25의 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나의 아미노산 치환을 갖는 것을 제외하고 서열 번호 1의 P64-T69에 기재된 서열을 갖는 TNFRSF25의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0059] 본 명세서에 기재된 바대로, 그 외 기재된 바대로(WO 제2016/081455호 참조) 생성된 TNFRSF25에 대한 인간화된 단일클론 항체는 증가한 친화도 및/또는 활성과 연관된 것으로 보이는 몇몇 중쇄 및 경쇄 가변 영역 CDR 변형의 확인을 발생시키는 친화도 성숙 연구에서 사용된다. 그러나, 흥미롭게도 본 명세서에서 실시예 3에 기재된 바대로, TNFRSF25에 대한 가장 큰 결합 친화도를 입증하는 클론이 항상 모 항체에 비해 가장 큰 활성을 갖는 클론은 아니다. 예를 들어, "M5"로서 본 명세서에서 확인된 클론은 카스파제-3 방출 검정에 의해 결정된 바와 같은 개선된 작용제 활성을 보여주었지만, 놀랍게도, TNFRSF25-Fc 융합 단백질에 대한 이의 결합은 조합 라이브러리 스크리닝에 의해 확인된 대부분의 다른 클론보다 유의미하게 더 약하다. 이 발견에 대한 제외는 "M4"로서 확인된

클론이고, 이것은 모 항체와 비교하여 TNFRSF25-Fc에 대한 개선된 결합 및 개선된 작용제 활성 둘 다를 나타낸다.

[0060] 따라서, 몇몇 경우에, 본 명세서에 제공된 항체는 모 인간화된 4C12 항체와 비교하여 TNFRSF25에 대한 증가한 결합 친화도, (예를 들어, 카스파제-3 검정에 의해 결정된 바와 같은) 증가한 작용제 활성, 또는 증가한 친화도 및 활성 둘 다를 가질 수 있다. "증가한" 친화도 또는 활성이란 인간화된 4C12의 친화도 또는 작용제 활성과 비교하여 적어도 5%(예를 들어, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 100% 초과)의 증가를 의미한다. 4C12 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 서열은 본 명세서에서 각각 서열 번호 5 및 6에 기재되어 있다. 항체의 작용제 활성은 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 카스파제-3 검정, 또는 그 외 기재된 바와 같은 TNFRSF25 수용체 신호전달 검정(예를 들어, 문헌[Bu et al., *Bone* 33 (5): 760-770, 2003] 참조)을 이용하여 평가될 수 있다.

[0061] 몇몇 실시형태에서, 따라서, 본 문헌은 서열 번호 12에 기재된 CDR1 서열, 서열 번호 14에 기재된 CDR2 서열 및 임의의 서열 번호 16, 26 및 32에 기재된 CDR3 서열을 함유하는 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드를 제공한다. 폴리펩타이드는 또한 예를 들어 식 (FW1)-(CDR1)-(FW2)-(CDR2)-(FW3)-(CDR3)-(FW4)에 따라 CDR 사이에 병치된 가변 영역 중쇄 프레임워크(FW) 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, FW 서열은 인간 서열일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드는 서열 번호 11에 기재된 FW1 서열, 서열 번호 13에 기재된 FW2 서열, 서열 번호 15에 기재된 FW3 서열 및 서열 번호 17에 기재된 FW4 서열을 포함할 수 있다.

[0062] 본 문헌은 또한 임의의 서열 번호 25, 27 및 29에 기재된 바와 같은 CDR1 서열, 서열 번호 21에 기재된 바와 같은 CDR2 서열 및 임의의 서열 번호 23, 28 및 30에 기재된 바와 같은 CDR3 서열을 함유하는 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드를 제공한다. 폴리펩타이드는 또한 식 (FW1)-(CDR1)-(FW2)-(CDR2)-(FW3)-(CDR3)-(FW4)에 따라 CDR 사이에 병치된 가변 영역 경쇄 FW를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, FW 서열은 인간 서열일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드는 서열 번호 18에 기재된 FW1 서열, 서열 번호 20에 기재된 FW2 서열, 서열 번호 22에 기재된 FW3 서열 및 서열 번호 24에 기재된 FW4 서열을 포함할 수 있다.

[0063] 본 문헌은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 폴리펩타이드 및 경쇄 가변 영역 폴리펩타이드 둘 다를 함유하는 항체 및 항원 결합 단편을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 예를 들어 항체 또는 항원 결합 단편은 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 서열 및 본 명세서에 개시된 바와 같은 경쇄 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 서열 둘 다를 함유할 수 있다. 몇몇 경우에, 항체는 4C12 항체가 아니어서, 이것은 서열 번호 12, 14 및 16에 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역 CDR을 함유하지 않고, 서열 번호 19, 21 및 23에 기재된 바와 같은 경쇄 가변 영역 CDR을 함유하지 않는다.

[0064] 몇몇 실시형태에서, 아미노산 치환은 (a) 치환의 영역에서의 펩타이드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수화도, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대한 이의 효과가 유의미하게 다르지 않은 보존적 치환을 선택함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들어, 천연 발생 잔기는 측쇄 특성에 기초하여 군으로 분할될 수 있다: (1) 소수성 아미노산(노르류신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신 및 아이소류신); (2) 중성 친수성 아미노산(시스테인, 세린 및 트레오닌); (3) 산성 아미노산(아스파르트산 및 글루탐산); (4) 염기성 아미노산(아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 라이신 및 아르기닌); (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 아미노산(글라이신 및 프롤린); 및 (6) 방향족 아미노산(트립토판, 타이로신 및 페닐알라닌). 이 군 내에 이루어진 치환은 보존적 치환으로 생각될 수 있다. 보존적 치환의 비제한적인 예는, 제한 없이, 알라닌에 대한 발린의 치환, 아르기닌에 대한 라이신의 치환, 아스파라긴에 대한 글루타민의 치환, 아스파르트산에 대한 글루탐산의 치환, 시스테인에 대한 세린의 치환, 글루타민에 대한 아스파라긴의 치환, 글루탐산에 대한 아스파르트산의 치환, 글라이신에 대한 프롤린의 치환, 히스티딘에 대한 아르기닌의 치환, 아이소류신에 대한 류신의 치환, 류신에 대한 아이소류신의 치환, 라이신에 대한 아르기닌의 치환, 메티오닌에 대한 류신의 치환, 페닐알라닌에 대한 류신의 치환, 프롤린에 대한 글라이신의 치환, 세린에 대한 트레오닌의 치환, 트레오닌에 대한 세린의 치환, 트립토판에 대한 타이로신의 치환, 타이로신에 대한 페닐알라닌의 치환, 및/또는 발린에 대한 류신의 치환을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 아미노산 치환은 비보존적일 수 있어서, 상기 기재된 아미노산 종류 중 하나의 구성원은 또 다른 종류의 구성원에 대해 교환된다.

[0065] 특정한 핵산 또는 아미노산 서열과 특정한 서열 확인 번호에 의해 참조된 서열 사이의 퍼센트 서열 동일성은 하기와 같이 결정된다. 처음에, 핵산 또는 아미노산 서열은 BLASTN 버전 2.0.14 및 BLASTP 버전 2.0.14를 함유하는 BLASTZ의 독립형 버전으로부터 BLAST 2 서열(BI2seq) 프로그램을 이용하여 특정한 서열 확인 번호에 기재된 서열과 비교된다. BLASTZ의 이 독립형 버전은 fr.com/blast 또는 ncbi.nlm.nih.gov에서 온라인으로 얻어질 수

있다. B12seq 프로그램을 어떻게 사용하는지를 설명하는 지시는 BLASTZ를 동반한 리드미(readme) 파일에서 발견될 수 있다. B12seq는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 이용하여 2개의 서열 사이의 비교를 수행한다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하도록 이용되는 한편, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하도록 이용된다. 2개의 핵산 서열을 비교하기 위해, 하기와 같은 옵션이 설정된다: -i는 비교하고자 하는 제1 핵산 서열을 함유하는 파일(예를 들어, C:\#seq1.txt)로 설정되고; -j는 비교하고자 하는 제2 핵산 서열을 함유하는 파일(예를 들어, C:\#seq2.txt)로 설정되고; -p는 blastn으로 설정되고; -o는 임의의 원하는 파일명(예를 들어, C:\#output.txt)으로 설정되고; -q는 -1로 설정되고; -r은 2로 설정되고; 모든 다른 옵션은 이의 디폴트 설정에서 남아 있다. 예를 들어, 하기 코멘트는 2개의 서열 사이의 비교를 함유하는 출력 파일을 생성하도록 이용될 수 있다: C:\#B12seq -i c:\#seq1.txt -j c:\#seq2.txt -p blastn -o c:\#output.txt -q -1 -r 2. 2개의 아미노산 서열을 비교하기 위해, B12seq의 옵션은 하기와 같다: -i는 비교하고자 하는 제1 아미노산 서열을 함유하는 파일(예를 들어, C:\#seq1.txt)로 설정되고; -j는 비교하고자 하는 제2 아미노산 서열을 함유하는 파일(예를 들어, C:\#seq2.txt)로 설정되고; -p는 blastp으로 설정되고; -o는 임의의 원하는 파일명(예를 들어, C:\#output.txt)으로 설정되고; 모든 다른 옵션은 이의 디폴트 설정에서 남아 있다. 예를 들어, 하기 명령어는 2개의 아미노산 서열 사이의 비교를 함유하는 출력 파일을 생성하도록 이용될 수 있다: C:\#B12seq -i c:\#seq1.txt -j c:\#seq2.txt -p blastp -o c:\#output.txt. 2개의 비교된 서열이 상동성을 공유하는 경우, 지정된 출력 파일은 정렬된 서열로서 상동성의 이 영역을 제시할 것이다. 2개의 비교된 서열이 상동성을 공유하지 않는 경우, 지정된 출력 파일은 정렬된 서열을 제시하지 않을 것이다.

[0066] 정렬되면, 매치의 수는 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 서열 둘 다에 제시되는 위치의 수를 계수함으로써 결정된다. 퍼센트 서열 동일성은 확인된 서열(예를 들어, 서열 번호 1)에 의해 기재된 서열의 길이에 의해, 또는 연결된 길이(예를 들어, 확인된 서열에 기재된 서열로부터의 100개의 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기)에 의해 매치의 수를 나누고, 이후 생성된 값을 100 곱하여 결정된다. 예를 들어, 서열 번호 1에 기재된 서열과 정렬될 때 110의 매치를 갖는 아미노산 서열은 서열 번호 1에 기재된 서열과 90.9% 동일하다(즉, $110 \div 121 \times 100 = 90.9$). 퍼센트 서열 동일성 값이 가장 가까운 1/10으로 반올림내림된다는 것에 주목한다. 예를 들어, 75.11, 75.12, 75.13 및 75.14는 75.1로 반내림되는 한편, 75.15, 75.16, 75.17, 75.18 및 75.19는 75.2로 반올림된다. 길이 값이 항상 정수라는 것에 또한 주목한다.

[0067] 또한, 본 문헌은 약제학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 약제학적 조성물을 또한 제공한다. "약제학적으로 허용 가능한 담체"(또한 "부형제" 또는 "담체"라 칭함)는, 사용되는 투약량 및 농도에서 여기에 노출되는 세포 또는 대상체에 비독성인, 대상체(예를 들어, 포유류, 예컨대 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이, 양, 돼지, 말, 소, 마우스, 래트 또는 토끼)에게 하나 이상의 치료적 화합물을 전달하기 위한 약제학적으로 허용 가능한 용매, 현탁제, 안정화제, 또는 임의의 다른 약물학적 불활성 비히클이다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 액체 또는 고체일 수 있고, 소정의 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분 중 하나 이상과 조합될 때, 원하는 벌크, 점조도, 및 다른 적절한 수송 및 화학 특성을 제공하도록 마음 속에 계획된 투여 방식에 의해 선택될 수 있다. 아미노산과 해롭게 반응하지 않는 통상적인 약제학적으로 허용 가능한 담체는, 예로서, 제한 없이 물, 식염수 용액, 결합제(예를 들어, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스), 필러(예를 들어, 락토스 및 다른 당, 젤라틴 또는 황산칼슘), 활택제(예를 들어, 전분, 폴리에틸렌 글라이콜 또는 나트륨 아세테이트), 붕괴제(예를 들어, 전분 또는 나트륨 전분 글라이콜레이트) 및 습윤제(예를 들어, 나트륨 라우릴 설페이트)를 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 또한 수성 pH 완충 용액 또는 리포솜(포유류에 대한 약물의 전달에 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 이루어진 작은 베시클)을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체의 추가의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산, 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 저분자량(약 10개의 잔기 미만) 폴리펩타이드, 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린, 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 아미노산, 예컨대 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신, 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린, 킬레이트화제, 예컨대 EDTA, 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨, 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨, 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN(상표명), 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 및 PLURONICS(상표명)를 포함한다.

[0068] 약제학적 조성물은 하나 이상의 활성제를 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 및/또는 애쥬번트, 및 선택적으로 개선된 수송, 전달, 관용성 등을 제공하도록 제제로 보통 혼입되는 다른 물질과 혼합함으로써 제제화될 수 있다. 약제학적 조성물은 예를 들어 동결건조 제제, 수성 용액, 분산액 또는 고체 제제, 예컨대 정제, 드라제 또는 캡슐 중에 제제화될 수 있다. 다수의 적절한 제제는 모든 약제학적 화학자에게 공지된 처방서에서 발견될 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed, Mack Publishing Company, Easton,

PA (1990)), 특히 이것 내의 Chapter 87 by Block, Lawrence. 이 제제는 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온성 또는 음이온성) 함유 베시클(예컨대, LIPOFECTIN(상표명)), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀션, 에멀션 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글라이콜), 카보왁스를 함유하는 반고체 겔 및 반고체 혼합물을 포함한다. 임의의 상기 혼합물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 및 치료법에서 적절할 수 있지만, 단 제제 내의 활성제는 제제에 의해 불활성화되지 않고, 제제는 생리학적으로 상용성이고 투여 경로에 관용성이다. 또한, 약제학적 화학자에게 널리 공지된 제제, 부형제 및 담체와 관련한 추가 정보를 위해 문헌[Baldrick, *Regul Toxicol Pharmacol* 32:210-218, 2000; Wang, *Int J Pharm* 203:1-60, 2000; Charman *J Pharm Sci* 89:967-978, 2000; 및 Powell et al. *PDA J Pharm Sci Technol* 52:238-311, 1998], 및 여기서의 인용을 참조한다.

[0069] 약제학적 조성물은, 제한 없이, 용액, 에멀션, 수성 현탁액 및 리포솜 함유 제제를 포함한다. 이 조성물은 예를 들어 미리 형성된 액체, 자가 유화 고체 및 자가 유화 반고체를 포함하는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다. 에멀션은 대개 서로 친밀히 혼합되고 분산되는 2개의 비혼화성 액체 상으로 이루어진 이상성 시스템이고, 일반적으로, 에멀션은 유중수(w/o) 또는 수중유(o/w) 종류이다. 에멀션 제제는 이의 제조 용이성 및 가용화, 흡수 및 생체이용률의 효능으로 인해 치료제의 경구 전달에 널리 사용된다.

[0070] 조성물 및 제제는 완충제, 희석제 및 다른 적합한 첨가제(예를 들어, 침투 증대제, 담체 화합물 및 다른 약제학적으로 허용 가능한 담체)를 또한 함유할 수 있는 무균 수성 용액을 함유할 수 있다. 조성물은 약제학적 조성물에서 종래에 발견되는 다른 부가 성분을 추가로 함유할 수 있다. 따라서, 조성물은 또한 상용성의 약제학적 활성 재료, 예를 들어 진양제, 수렴제, 국소 마취제 또는 소염제, 또는 본 명세서에 제공된 조성물의 다양한 제형, 예컨대 염료, 향료, 보존제, 항산화제, 불투명화제, 증점제 및 안정화제를 물리적으로 제제화하는 데 유용한 추가 재료 등을 포함할 수 있다. 더구나, 조성물은 보조제, 예를 들어 활택제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치지 않는 염, 완충제, 착색제, 향료 및 방향족 물질과 혼합될 수 있다. 그러나, 첨가될 때, 이러한 재료는 본 명세서에 제공된 조성물 내의 폴리펩타이드 성분의 생물학적 활성을 부당하게 방해하지 않아야 한다. 제제는 원하는 경우 무균화될 수 있다.

[0071] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 주사용 현탁액을 만들기 위해 희석제와 함께 또는 이것 없이 용액 또는 분말의 형태일 수 있다. 조성물은 추가 성분, 예를 들어, 제한 없이, 약제학적으로 허용 가능한 비히클, 예컨대 식염수, 물, 락트산, 만니톨, 또는 이들의 조합 등을 함유할 수 있다.

[0072] 임의의 적절한 방법은 포유류에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하기 위해 이용될 수 있다. 투여는 예를 들어 비경구(예를 들어, 피하, 척추강내, 심실내, 근육내 또는 복강내 주사에 의한, 또는 정맥내 드립에 의한)일 수 있다. 투여는 신속할 수 있거나(예를 들어, 주사에 의한), 일정한 시간에 걸쳐 발생할 수 있다(예를 들어, 서방 제제의 지속 점적주사 또는 투여에 의한). 몇몇 실시형태에서, 투여는 국소(예를 들어, 경피, 설하, 눈내 또는 비강내), 폐(예를 들어, 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기법에 의한), 또는 경구일 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 종양의 수술적 절제 전에, 후에 또는 대신에 투여될 수 있다.

[0073] 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 원하는 결과를 달성하기에 효과적인 임의의 적절한 기간 동안 임의의 적절한 빈도로 임의의 적절한 양으로 포유류에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 시험관내 또는 생체내 T 세포(예를 들어, 인간, 쥐과, 햄스터 또는 마카크 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포 및/또는 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포)의 증식을 자극하기 위한, TNFRSF25를 발현하는 종양 세포의 아포토시스를 자극하기 위한, 종양 크기를 감소시키기 위한, 또는 암 환자의 무진행 생존율을 증가시키기 위한 효과적인 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg(예를 들어, 약 0.1mg/kg 내지 약 1mg/kg, 약 1mg/kg 내지 약 5mg/kg, 또는 약 5mg/kg 내지 약 10mg/kg)의 투약량으로 투여될 수 있고, 1주 내지 3주마다 1회(예를 들어, 주마다, 10일마다, 2주마다 또는 3주마다) 투여될 수 있다.

[0074] 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편의 대상체에 대한 투여는 포유류 내에 존재하는 암 세포에 대한 항암 효과를 발휘할 수 있는 T 세포(예를 들어, 자연 발생 종양-반응성 CD8+ T 세포 또는 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포)의 수를 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 문헌은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체, 항원 결합 단편 또는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 T 세포의 증식을 자극하는 방법을 제공한다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 조성물의

투여 전의 대상체에서의 T 세포 증식의 "기준" 수준과 비교하여, 또는 조성물이 투여되지 않은 대조군 대상체 또는 대상체의 집단에서의 T 세포 증식의 수준과 비교하여 T 세포의 증식을 (예를 들어, 적어도 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 또는 100% 초과) 증가시키기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. T 세포는 예를 들어 CD8+ T 세포 또는 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포일 수 있다. 임의의 적합한 방법은 T 세포 증식의 수준이 대상체에서 증가하는지 또는 아닌지를 결정하도록 이용될 수 있다. 이러한 방법은, 제한 없이, 항원 특이적 T 세포의 유세포분석기 분석(예를 들어, 전체 CD8+ T 세포 풀의 분석으로서 항원 특이적 CD8+ T 세포의 비율의 유세포분석기 분석), CD8+ T 세포에서의 세포 증식 마커(예를 들어, Ki67의 발현)의 분석, CD8+ T 세포의 계수의 증가 또는 CD8+ T 세포의 특정한 클론의 개별 TCR 서열의 비율의 증가의 분석을 포함할 수 있다.

[0075] 본 문헌은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체, 항원 결합 단편 또는 조성물에 의해 대상체를 치료함으로써 대상체에서 TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스를 촉진하는 방법을 제공한다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 조성물의 투여 전의 대상체에서의 종양 세포 아포토시스의 "기준" 수준과 비교하여, 또는 조성물이 투여되지 않은 대조군 대상체 또는 대상체의 집단에서의 종양 세포 아포토시스의 수준과 비교하여 TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스를 (예를 들어, 적어도 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 또는 100% 초과) 증가시키기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 임의의 적합한 방법은 종양 세포 아포토시스의 수준이 대상체에서 증가하는지 또는 아닌지를 결정하도록 이용될 수 있다. 이것은 예를 들어 방사선학적 기법, 예컨대 괴사성 또는 아포토시스성 종양의 존재를 나타내는 조영제와 함께 또는 이것 없이 CT 또는 MRI, 종양 세포사의 증가를 나타내는 종양 샘플의 생검, 종양 세포 내의 카스파제 유도, 방사선학에 의한 검출 가능한 종양 병변의 제거, 또는 수술 또는 신체 검사를 포함할 수 있다.

[0076] 고형 종양 및 백혈병/림프종을 포함하는 암을 갖는 대상체(예를 들어, 인간 환자)를 치료하는 방법은 또한 본 명세서에 제공된다. 몇몇 경우에, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 조성물의 투여 전의 대상체에서의 암 진행의 속도와 비교하여, 또는 조성물이 투여되지 않은 대조군 대상체 또는 대상체의 집단에서의 암 진행의 속도와 비교하여 암의 진행 속도를 (예를 들어, 적어도 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 또는 90% 초과) 감소시키기에 효과적인 양으로 암을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 임의의 적합한 방법은 암의 진행 속도가 감소하는지 또는 아닌지를 결정하도록 이용될 수 있다. 피부암(예를 들어, 흑색종)의 경우, 예를 들어 진행 속도는 상이한 시점에서 조직을 영상화하고 존재하는 암 세포의 양을 결정함으로써 평가될 수 있다. 상이한 시간에 조직 내에 결정된 암 세포의 양은 진행 속도를 결정하기 위해 비교될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 후, 진행 속도는 또 다른 시간 간격에 대해 다시 결정될 수 있다. 몇몇 경우에, 치료 후 암의 병기는 결정되고 진행 속도가 감소하는지 또는 아닌지를 결정하기 위해 치료 전의 병기와 비교될 수 있다.

[0077] 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 또한 비치료된 암을 갖는 상응하는 대상체의 중앙치 무진행 생존율 또는 암을 갖고 다른 치료제(예를 들어, 단독의 화학치료제)에 의해 치료된 상응하는 대상체의 중앙치 무진행 생존율과 비교하여 무진행 생존율이 (예를 들어, 적어도 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 100%, 또는 100% 초과) 증가하는 조건 하에 암을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 임의의 적합한 방법은 암의 진행 속도가 감소하는지 또는 아닌지를 결정하도록 이용될 수 있다. 무진행 생존율은 임의의 시간 길이(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 이것 초과)에 걸쳐 측정될 수 있다.

[0078] 본 명세서에 제공된 바와 같은 분자를 함유하는 유효량의 조성물은 원하는 결합을 갖는 임의의 양일 수 있다(예를 들어, CD8+ T 세포의 증식의 자극, TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스의 자극, 대상체에서의 면역 반응의 자극 또는 유발, 종양 크기의 감소, 암의 진행 속도의 감소, 암 환자의 무진행 생존율의 증가, 또는 유의미한 독성을 생성하지 않으면서 진행까지의 중앙치 시간의 증가). 최적 투약량은 개별 폴리펩타이드(예를 들어, 항체 및 항원 결합 단편)의 상대 효력에 따라 변할 수 있고, 일반적으로 시험관내 및 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 발견된 EC₅₀에 기초하여 예상될 수 있다. 통상적으로, 투약량은 체중 1kg당 0.01μg 내지 100g이다. 예를 들어, 유효량의 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.1mg/kg 내지 약 50mg/kg(예를 들어, 약 0.4mg/kg, 약 2mg/kg, 약 5mg/kg, 약 10mg/kg, 약 20mg/kg, 약 30mg/kg, 약 40mg/kg 또는 약 50mg/kg), 또는 이들 사이의 임의의 범위, 예컨대 약 0.1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.4mg/kg 내지 약 20mg/kg, 약 2mg/kg 내지 약 30mg/kg 또는 약 5mg/kg 내지 약 40mg/kg일 수 있다. 특정한 대상체가 특정한 양에 반응하지 않으면, 항체 또는 항원 결합 단편의 양은 예를 들어 2배 증가할 수 있다. 이 더 높은 농도를 받은 후, 대상체는 치료에 대한 반응

성 및 독성 증상 둘 다에 대해 모니터링될 수 있고, 조정은 이렇게 이루어진다. 유효량은 일정하게 머무를 수 있거나, 치료에 대한 대상체의 반응에 따라 슬라이딩 스케일 또는 가변 용량으로 조정될 수 있다. 다양한 인자는 특정한 분야에 사용되는 실제 유효량에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 투여 빈도, 치료 기간, 다수의 치료제의 사용, 투여 경로 및 암의 중증도는 투여되는 실제 유효량의 증가 또는 감소를 요할 수 있다.

[0079] 투여 빈도는 예를 들어 CD8+ T 세포의 증식을 자극하거나, TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스를 자극하거나, 종양 크기를 감소시키거나, 암의 진행 속도를 감소시키거나, 암 환자의 무진행 생존율을 증가시키거나, 유의미한 독성을 생성하지 않으면서 진행까지의 중앙치 시간을 증가시키는 임의의 빈도일 수 있다. 예를 들어, 투여 빈도는 1일 1회 초과, 2주마다, 주마다, 개월마다 또는 훨씬 적을 수 있다. 투여 빈도는 치료 기간 동안 일정하게 머무를 수 있거나, 가변적일 수 있다. 치료의 과정은 나머지 기간을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 조성물은 2주 기간, 이어서 2주 마지막 기간에 걸쳐 투여될 수 있고, 이러한 섭생은 수회 반복될 수 있다. 유효량에서처럼, 다양한 인자는 특정한 분야에 사용되는 실제 투여 빈도에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 유효량, 치료 기간, 다수의 치료제의 사용, 투여 경로 및 암의 중증도는 투여 빈도의 증가 또는 감소를 요할 수 있다.

[0080] 본 명세서에 제공된 조성물을 투여하기 위한 효과적인 기간은 CD8+ T 세포의 증식을 자극하거나, TNFRSF25 발현 종양 세포의 아포토시스를 자극하거나, 종양 크기를 감소시키거나, 암의 진행 속도를 감소시키거나, 암 환자의 무진행 생존율을 증가시키거나, 유의미한 독성을 생성하지 않으면서 진행까지의 중앙치 시간을 증가시키는 임의의 기간일 수 있다. 따라서, 효과적인 기간은 수일 내지 수주, 수개월 또는 수년으로 변할 수 있다. 일반적으로, 암의 치료를 위한 효과적인 기간은 수주 내지 수개월의 기간의 범위일 수 있다. 몇몇 경우에, 효과적인 기간은 개별 대상체가 살아 있는 동안일 수 있다. 다수의 인자는 특정한 치료에 사용되는 실제 효과적인 기간에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 효과적인 기간은 투여 빈도, 유효량, 다수의 치료제의 사용, 투여 경로 및 암의 중증도에 따라 변할 수 있다.

[0081] 본 명세서에 제공된 바와 같은 조성물을 암 환자에게 투여한 후, 환자는 암이 치료되는지 또는 아닌지를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 암의 진행 속도가 감소(예를 들어, 중단)되는지 또는 아닌지를 결정하기 위해 치료 후 평가될 수 있다. 당해 분야에서 표준인 것을 포함하는 임의의 방법은 진행 및 생존율을 평가하도록 이용될 수 있다.

[0082] 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 사용하는 방법은 예를 들어 조합된 또는 추가 치료 단계로서, 또는 치료적 제제의 추가 성분으로서 암의 치료의 공지된 방법에 의해 조합될 수 있다. 예를 들어, 숙주의 면역 기능을 증대시키는 것은 종양과 싸우는 데 유용할 수 있다. 상기 방법은, 제한 없이, 예컨대 외래 MHC 항원(종양 항원, 돌연변이 유래 항원 또는 다른 항원 포함)을 코딩하는 DNA의 종양으로의 주사, 또는 종양의 면역 항원 인식의 가능성을 증가시키는 유전자에 의해 생성된 종양 세포를 형질주입하는 것(예를 들어, 면역 자극 사이토카인, GM-CSF, 또는 동시자극 분자 B7.1, B7.2)에 의한 APC 증대를 포함할 수 있다. 다른 방법은 예를 들어 데포 또는 서방 제제로의 특이적 종양 항원의 가용화, 애쥬번트 단백질 또는 항원 담체 단백질에 의한 동종이계 종양 세포의 형질주입, 면역 자극 단백질, 예컨대 알파 갈락토실세라미드에 의한 동종이계 종양 세포의 형질주입, 바이러스 유래 백신 섭생으로의 특이적 종양 항원의 도입, 리스테리아(Listeria) 유래 백신 섭생으로 특이적 종양 항원의 도입, 입양 세포 면역치료(키메라 항원 수용체 형질주입된 T 세포 포함) 또는 종양 특이적 T 세포(세포의 증식된 종양 침윤 림프구 포함)에 의한 치료를 포함할 수 있다. 입양 세포 면역치료는 종양 침윤 숙주 T 림프구를 단리하는 것 및 (예를 들어, IL-2에 의한 자극에 의해) 시험관내 집단을 증식시키는 것을 포함할 수 있다. 이후, T 세포는 숙주에게 재투여될 수 있다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편과 조합되어 사용될 수 있는 다른 치료는 예를 들어 방사선 치료, 화학치료, 호르몬 치료 및 혈관생성 저해제의 사용을 포함한다. 유용할 수 있는 추가의 조합 파트너는 관문 저해제(예를 들어, 항-PD1/L1, 항-CTLA-4, 항-LAG3, 항-B7-H3, 항-B7-H4, 항-TIM3, 항-TIGIT, 항-CD47, 항-TMIGD2, 항-BTLA, 항-CEACAM 또는 항-GARP), 다른 동시자극 항체(예를 들어, 항-OX40, 항-ICOS, 항-CD137, 항-GITR 또는 항-CD40), 암 백신(예를 들어, 바이러스 기반 백신, 펩타이드 백신, 전체 세포 백신 또는 RNA 기반 백신) 및 표적화제[예를 들어, HERCEPTIN(등록상표)(트라스투주맵), TARCEVA(등록상표)(에리오티닙), AVASTIN(등록상표)(베바시주맵) 또는 IMBRUVICA(등록상표)(이브루티닙)]를 포함한다.

[0083] 따라서, 몇몇 실시형태에서, 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 예를 들어 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 저해하거나, CD80 또는 CD86에 대한 CTLA-4의 결합을 저해하거나, TNFRSF4, TNFRSF9 또는 TNFRSF18 경로를 통한 신호전달을 활성화하기 위해 하나 이상의 추가 단일클론 항체와 조합되어 사용될 수 있다. 이것은 또한 종양 세포에서의 특이적 표적에 결합하는 또 다른 항체, 융합 단백질 또는 소분자에 의한 투여를 포함할 수 있다(예

를 들어, 표적, 예컨대 CD20, Her2, EGFRvIII, DR4, DR5, VEGF, CD39 및 CD73을 결합시키는 단일클론 항체와의 조합). 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 암 환자에서 종양 항원 특이적 T 세포의 활성화를 증대시키도록 암 백신 접근법과 조합되어 사용될 수 있다. 또한, 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 특이적 종양 항원을 인식하는 키메라 T 세포 수용체를 발현하도록 조작된 자가유래 또는 동종이계 T 또는 K 세포의 투여 후 사용될 수 있다. 추가로, 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 종양 특이적 T 세포를 증식시키고 암 환자에서 단일치료로서의 어느 한 접근법의 활성을 증대시키기 위한 방법으로서 특정한 화학치료 또는 방사선 치료 전략과 조합되어 사용될 수 있다.

[0084] 하나 이상의 종래의 치료가 암을 치료하기 위해 본 명세서에 제공된 바와 같은 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편을 사용하여 치료와 조합되는 경우, 예를 들어 종래의 치료(들)는 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편의 투여 전에, 이에 후속하여, 또는 이것과 동시에 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1 차단 항체는 TNFRSF25 작용제 항체의 투여 전에 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 섭생은 주, 개월 또는 년의 기간에 걸쳐 순환될 수 있다. 예를 들어, 대안적으로, PD-1 차단 항체는 TNFRSF25 작용제 항체의 투여와 동시에 또는 이것 후에 투여될 수 있다. 이러한 섭생은 또한 주, 개월 또는 년의 기간에 걸쳐 순환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 시간 기간에 걸쳐 반복하여 투여되는 조합 치료는 상기 투여 전략 중 2개 이상을 포함할 수 있다.

[0085] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항-TNFRSF25 항체 또는 항원 결합 단편은 암 환자로부터 단리된 종양 침윤 림프구의 증식을 자극하기 위한 방법으로서, 또는 시험관내 증식되고 암 환자의 치료를 위해 후속하는 융합에 의도되는 키메라 항원 수용체 발현 T 세포의 증식을 자극하기 위해 시험관내 검정 또는 제조 공정 동안 사용될 수 있다.

[0086] 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편, 또는 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 약제학적 조성물을 함유하는 제조 물질이 본 명세서에 또한 제공된다. 항체 또는 약제학적 조성물은 용기(예를 들어, 병, 바이알 또는 주사기) 내에 있을 수 있다. 제조 물질은 또한 항체, 항원 결합 단편 또는 조성물을 재구성하고/하거나 사용하기 위한 지시를 갖는 라벨을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제조 물질은 하나 이상의 추가 항목(예를 들어, 하나 이상의 완충제, 희석제, 필터, 침, 주사기 및/또는 추가의 사용 설명서를 갖는 패키지 인서트)을 포함할 수 있다. 제조 물질은 또한 암을 치료하기 위한 적어도 1종의 추가 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 바와 같은 제조 물질은 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, Tim-3, TNFRSF4, TNFRSF9, TNFRSF18, CD27, CD39, CD47, CD73 또는 CD278을 표적화하는 물질을 함유할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제조 물질은 A2A 수용체 길항제 또는 TGF-베타 길항제를 함유할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제조 물질은 B7 패밀리를 동시자극 분자(예를 들어, CD28 또는 CD278) 또는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 동시자극 분자(예를 들어, TNFRSF4, TNFRSF9 또는 TNFRSF18), 화학치료제 또는 항-종양 백신 조성물을 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명은 하기 실시예에 추가로 기재될 것이고, 이것은 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0088] **실시예**

[0089] 실시예 1 - 에피토프 맵핑

[0090] 몇몇 TNFRSF25 발현 작제물을 제조하였다. 이것은 25번 위치에서의 Gln(Q25)으로부터 201번 위치에서의 Phe(F201)로 연장하는 전체 세포의 도메인(ECD), 또는 181번 위치에서의 Q25로부터 Thr(T181)로 연장하는 가용성 스플라이스 변이체를 포함하였다. 작제물은 또한 다양한 태그, 예를 들어 6His, hFc-6His 및 mFc-His를 포함하였다. 6개의 작제물(표 1)을 293F 세포로 형질주입시키고, 이의 발현 수준은 도 2에 도시된 바와 같이 측정되었다.

표 1

샘플	단백질
Whis	W381-hPro1.ECD-W.His
WmFchis	W381-hPro1.ECD-W.mFcHis
WhFchis	W381-hPro1.ECD-W.hFcHis
Mhis	W381-hPro1.ECD-M.His
MmFchis	W381-hPro1.ECD-M.mFcHis
MhFchis	W381-hPro1.ECD-M.hFcHis
NC	음성 대조군

W = 세포외 도메인(QGGT GWRQMF)
M = 가용성 스플라이스 변이체(QGGT SCPT)

[0091]

[0092] 시험된 작제물 중에서, W381-hPro1.ECD-M.mFcHis는 가장 높은 발현을 나타냈다(도 3). TNFRSF25의 이 버전은 따라서 알라닌 스캐닝 기반 에피토프 매핑에 대한 골격으로서 선택되었다.

[0093] 73개의 알라닌 돌연변이체를 생성하고, 이의 발현을 상기 기재된 바대로 측정하였다. 돌연변이체를 이의 발현 수준에 기초하여 5개의 군으로 나누고(표 2a 및 표 2b), 결합 활성 분석에 사용하였다.

[0094] [표 2a]

발현 수준	돌연변이체의 번호
>1500	27
1000-1500	14
600-1000	17
300-600	14
<300	1
전체	73

[0095]

[0096] 항체에 의해 인식되는 TNFRSF25의 에피토프를 확인하기 위해, 이후 TNFRSF25 뮤테인에 대한 항체의 결합을 도 4에 도시된 단계를 이용하여 평가하였다. 구체적으로, 1500ng/ml 초과에서 발현되는 WBP330-hPro1.ECD.hFcHis의 알라닌 돌연변이체에 대한 W330-cAb1.hIgG1(35783)인 키메라 항체(인간 IgFc에 의해 제조된 키메라인 모 햄스터 항-TNFRSF25 항체)의 결합을 평가하도록 연구를 수행하였다. 각각의 뮤테인에 대한 결합 친화도를 비돌연변이된 WBP330-hPro1.ECD.hFcHis의 것과 비교하였다(도 5). 25% 초과 신호 변화(0.75 미만의 배수 변화; 표 3 및 도 6)를 나타낸 뮤테인을 구조 모델링에 사용하였다(도 7 및 도 8).

[0097] 또한, 항체가 TNFRSF25에 대한 TL1A의 결합, 및 그 반대를 저해할 수 있는지를 결정하기 위해 연구를 수행하였다. 도 9에 도시된 바대로, 제조한 인간 TNFRSF25에 대한 항-TNFRSF25 항체("햄스터 모")의 결합은 TL1A-Ig에 의해 차단되었다(막대의 왼쪽). 반대로, 제조한 인간 TNFRSF25에 대한 TL1A-Ig 용합의 결합은 모 항-TNFRSF25 항체(막대의 중심 쌍)에 의해 차단되었다. 또한, 제조한 인간 TNFRSF25에 대한 인간화된 항-TNFRSF25 항체("햄스터 모" 항체로부터 유래)의 결합은 TL1A-Ig(막대의 오른쪽 쌍)에 의해 차단되었다.

[0098] [표 2b]

AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml	AA#	ng/ml
99	2770.3	74	1483	63	937.7	33	566.9	154	189
41	2759.8	58	1407.6	51	878.1	121	561.8	NC	189.4
64	2617.6	78	1369.9	55	861.2	91	520		
60	2576.9	67	1360	73	845.5	140	482.6		
47	2515.3	34	1315.4	136	825.2	123	478.8		
84	2513.1	112	1255.8	133	824.7	32	477.5		
54	2431.3	61	1176.1	108	765.3	95	474.6		
97	2401.9	92	1166.2	104	735	117	473.7		
65	2289.6	70	1138.2	138	709.9	116	470.7		
89	2230.1	49	1133.5	35	693.9	130	463.1		
36	2215.5	76	1062.6	107	688.1	148	456.9		
59	2195.3	56	1033.5	50	686.3	106	373.7		
69	2158.1	52	1028.1	120	671	141	370.4		
77	2143.1	71	1024.9	93	668.9	135	326.8		
44	2082.3			115	649.9				
101	2080.7			125	629.3				
102	2017			83	608.1				
109	1811.1								
46	1809.2								
96	1796.5								
79	1788.2								
113	1739.1								
105	1672.4								
66	1661.7								
68	1643.4								
48	1622.4								
134	1562.6								

[0099] NC = 음성 대조군(오직 293F 세포)

3

확인된 에피토프	배수 변화
G66	0.33
T69	0.37
C65	0.37
P64	0.40
가능한 에피토프	배수 변화
P60	0.54
G44	0.54
A109	0.59
F46	0.62
H84	0.63
K41	0.63
A36	0.65
D96	0.66

[0100]

[0101]

실시예 2 - 친화도 성숙 및 규명 방법

[0102]

W3153-P8R32-H6 항체의 친화도 최적화: 모 클론의 3개의 CDR의 각각의 아미노산을 혼성화 돌연변이유발 방법을 이용하여 모든 20개의 아미노산으로 개별적으로 돌연변이시켰다(Kunkel, *Proc Natl Acad Sci USA* 82(2):488-492, 1985). 20개의 아미노산을 코딩하는 NNS 코돈을 함유하는 DNA 프라이머를 사용하여 각각의 표적화된 CDR 위치에서 돌연변이를 도입하였다. 개별적인 축퇴성 프라이머를 혼성화 돌연변이유발 반응에서 사용하였다. 간단히 말하면, 각각의 축퇴성 프라이머를 인산화하고, 이후 유리디닐화 ssDNA와 10:1 비율로 사용하였다. 혼합물을 5분 동안 85℃로 가열하고, 이후 1시간에 걸쳐 55℃로 냉각시켰다. 이후, T4 리가제 및 T4 DNA 중합효소를 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. VH 및 VL CDR에 대한 합성 생성물을 각각 풀링하였다. 통상적으로, 200ng의 풀링된 라이브러리 DNA를 BL21 박테리아 층(bacterial lawn)에서 플락 형성을 위해 또는 scFv 단편의 생성을 위해 BL21로 전기천공하였다.

[0103]

모 중쇄 및 경쇄, 및 이의 CDR 및 FW 영역의 서열은 하기와 같다:

[0104]

중쇄 가변 영역: EVQLVESGGGLSQPGNSLQLSCEASGFTFSNH
DLNWRQAPGKGLEWVAYISSASGLISYADAVRGRFTISRDNAKNSLFLOMNNLKSEDTAMYYCARDPPYSGLYALDFWGQGTVTVSS(서열 번호 5)

[0105]

FW1: EVOLVESGGGLSOPGNSLOLSCEAS(서열 번호 11)

[0106]

CDR1: GFTFSNHDLN(서열 번호 12)

[0107]

FW2: WVRQAPGKGLEWVA(서열 번호 13)

[0108]

CDR2: YISSASGLISYADAVRG(서열 번호 14)

[0109]

FW3: RFTISRDNAKNSLFLOMNLKSEDTAMYYCAR(서열 번호 15)

[0110]

CDR3: DPPYSGLYALDF(서열 번호 16)

[0111]

FW4: WGQGTQVTVSS(서열 번호 17)

[01 12]

경쇠 가변 영역: QPVL TQSPSASASLSGSVKLTCTLSSELSSYT
IVWYQRPDKAPKYVMYLKSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAHRYLSISNVQSEDDATYFCGAGYTLAQOYGWVFGSGTKVTVL (서열 번호 6)

[0113]

FW1: QPVL TQSP SASAS LSGSVK LTC (서열 번호 18)

[0114]

CDR1: TLSSELSSYTIV(서열 번호 19)

[0115]

FW2: WYQQRPKAPKYVMY(서열 번호 20)

[0116]

CDR2: LKSDGSHSKGD(서열 번호 21)

- [0117] FW3: GIPDRFSGSSSGAHRYSISNVQSEDDATYF(서열 번호 22)
- [0118] CDR3: CGAGYTLAQYGVV(서열 번호 23)
- [0119] FW4: FSGGTKVTVL(서열 번호 24)
- [0120] *scFv 라이브러리의 1차 스크리닝*: 1차 스크린은 단일 점 ELISA(SPE) 검정으로 이루어지고, 이것은 96웰(딥 웰) 플레이트에서 성장한 박테리아의 주변세포질 추출물(PE)을 사용하여 수행하였다. 간단히 말하면, 이 포획 ELISA는 4℃에서 밤새 pH 9.2에서 코팅 완충제(200mM Na₂CO₃/NaHCO₃) 중의 항-c-myc 항체를 갖는 96웰 Maxisorp 면역 플레이트의 개별 웰을 코팅하는 것을 수반하였다. 다음날, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 카제인에 의해 차단하였다. 이후, scFv PE를 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세척 후, 바이오티닐화 항원 단백질을 웰에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이것은 실온에서 1시간 동안 스트렙타비딘-겨자무과산화효소(HRP) 접합체와 항온처리가 후행하였다. HRP 활성을 테트라-메틸-벤지딘(TMB) 기질에 의해 검출하고, 반응물을 2M HCl에 의해 급랭시켰다. 플레이트를 450nm에서 판독하였다. 모 클론의 OD 신호보다 큰 450nm에서 광학 밀도(OD) 신호를 나타낸 클론을 선별하고 (상기 기재된 바대로) ELISA에 의해 2회 재평가하여서, 양성 결과를 확인하였다. 모 항체의 것보다 높은 신호를 반복하여 나타낸 클론을 서열분석하였다. 이후, CDR 변화를 갖는 각각의 클론의 scFv 단백질 농도를 정량적 scFv ELISA에 의해 결정하고, 여기서 공지된 농도를 갖는 scFv를 기준으로서 사용하였다. ELISA 신호를 기준 scFv에 의해 생성된 신호와 비교함으로써 scFv 단백질 농도를 결정하였다. 결합 검정을 돌연변이체 scFv 및 모 항체의 상대 결합 친화도를 결정하기 위해 정규화된 scFv 농도 하에 모든 양성 변이체에 대해 1회 더 반복하였다. 개선된 결합을 나타내는 선택된 scFv 히트를 IgG1로 대체화하고, 하기 기재된 바대로 카스파제-3 검정에서 시험하였다.
- [0121] *scFv 라이브러리의 조합 스크리닝*: 항원에 대한 결합에 유리한 것으로 결정된 VH 및 VL 사슬에서의 점 돌연변이를 조합하여 추가 결합 시너지가 획득되는지를 결정하였다. 조합 돌연변이체는 scFv로서 발현되고, 포획 ELISA를 이용하여 스크리닝되었다. 모 클론의 OD 신호보다 큰 450nm에서의 OD 신호를 나타내는 클론을 서열분석하고, 상기 기재된 바대로 결합 ELISA에 의해 추가로 순위 매겼다. 11개의 상위 매김된 클론을 IgG4 리포팅 및 상기 기재된 바와 같은 추가의 규명에 대해 선택하였다.
- [0122] *개선된 친화도를 갖는 4C12 돌연변이체의 리포팅, 일시적인 발현 및 정제*: 1차 및 조합 스크리닝으로부터 확인된 상위-rScFv 클론의 V-유전자를 PCR에 의해 증폭시키고, WuXi Biologics의 독점적 발현 벡터로 클로닝하고, 293F 세포로부터 발현시켰다. 항체를 함유하는 배양 상청액을 수확하고, 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.
- [0123] *카스파제 방출 검정*: TNFRSF25를 발현하는 P815 세포를 96웰 플레이트에서 37℃에서 5시간 동안 항체의 다양한 농도(1g/ml 내지 1ng/ml)와 항온처리하였다. 균일한 카스파제 검정 키트(로슈: 005372001)를 사용하여 카스파제 활성을 결정하였다. Molecular Devices SPECTRAMAX(등록상표) M5e 플레이트 판독기를 사용하여 형광을 판독하였다.
- [0124] *경쟁 검정*: 모 p815 세포 및 인간 TNFRSF25를 발현하는 p815 세포(p815-hDR3이라고도 칭함)를 IMDM + 10% FBS 중의 현탁액 중에 배양하였다. 세포를 수확 시에 계수하고, 펠릿화하고, 혈청 비함유 배지 중에 300,000개 세포/100μl의 농도로 재현탁시켰다. 세포 현탁액의 100μl의 분취량을 Eppendorf 관에 배치하였다.
- [0125] ALEXA FLUOR(등록상표) 647(AF647) 접합된 4C12 및 hTL1A-Ig(AKTA 정제, 1회)를 제조사의 지시에 따라 Molecular Probes ALEXA FLUOR(등록상표) 라벨링 키트(RL# 170512)를 사용하여 생성하였다. 4C12-AF647에 대한 라벨링의 정도는 5.98mol의 염료 대 항체이고, hTL1A-Ig-AF647에 대해 라벨링의 정도는 4.55mol의 염료 대 단백질이었다(둘 다 허용 가능한 범위 내인 것으로 생각됨).
- [0126] hTL1A-Ig-AF647 또는 4C12-AF647을 0.5μg/의 농도로 Eppendorf 관에 첨가하였다. 비표지된 4C12, 친화도 성숙된 4C12(hIgG1 하위유형) 또는 아이소타입 대조군 hIgG1을 2μg/ml 내지 0.0078μg/ml의 범위의 농도로 직후 첨가하였다. 혼합물을 5% 1시간 동안 CO₂에 의해 습윤 항온처리기에서 37℃에서 항온처리하였다. 세포를 마이크로원심분리기에서 펠릿화하고, FACS 완충제에 의해 1회 세척하였다. 펠릿을 300μl의 FACS 완충제 중에 재현탁시키고, Sony SH800 유세포분석기에서 분석하였다. 살아 있는 단일 세포를 게이트하고, 각각의 샘플에 대해 AF647에 대한 MFI를 결정하였다.
- [0127] 실시에 3 - 친화도 성숙 및 규명 결과

[0128]

1차 스크리닝은 야생형의 것보다 적어도 2배 더 높은 포획 ELISA 신호를 나타낸 7의 CDR 위치에서 11개의 돌연변이체를 생성하였다(표 4). 경쇄 CDR1에서의 42번 위치에서의 다수의 돌연변이는 지속적으로 TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 개선된 결합을 보여주었다. 이 위치에서의 Trp에 대한 Ser의 치환은 ELISA 신호에서 10배 초과를 증가시켰다. 중쇄 CDR3에서의 27번 위치에서의 Thr에 대한 Ala 및 경쇄 CDR1에서의 43번 위치에서의 Phe에 대한 Tyr의 2개의 다른 돌연변이는 유의미한 결합 개선을 또한 보여주었다. 이 돌연변이체는 IgG1로 전환되고, 카스파제-3 검정을 이용하여 활성에 대해 시험되었다(표 5). 오직 42번 위치에서의 돌연변이체는 카스파제-3 방출 검정의 개선된 효력을 보여주었다. 경쇄 CDR1에서의 Trp로의 Ser의 돌연변이를 함유하는 W3072-z4C12-R1-42G2-uIgG1L인 하나의 특정한 IgG 클론은 카스파제-3 작용제 활성의 가장 높은 증가를 보여주었다.

표 4

1차 스크리닝 히트

CDR	샘플 번호	OD ₄₅₀	돌연변이	WT* OD ₄₅₀	BMK [†] OD ₄₅₀	NC [‡] OD ₄₅₀	PC [‡] OD ₄₅₀
VHCDR2	10C3	0.70	A→D	0.28	0.13	0.12	0.35
VHCDR2	12F7	0.85	G→Q	0.26	0.10	0.10	0.41
VHCDR3	27A3	1.61	S→T	0.29	0.12	0.08	0.53
VLCDR1	42F2	0.83	S→G	0.27	0.13	0.09	0.34
	42G2	3.19	S→W	0.27	0.13	0.09	0.34
	42H4	1.21	S→N	0.27	0.13	0.09	0.34
	42H8	1.67	S→Y	0.27	0.13	0.09	0.34
	42F9	2.33	S→F	0.27	0.13	0.09	0.34
	43F11	1.60	Y→F	0.22	0.10	0.09	0.45
VHCDR3	60E8	0.44	A→M	0.11	0.07	0.05	0.16
VHCDR3	66B8	0.40	G→N	0.15	0.07	0.06	0.20

* W3072-z4C12-scFv

[†] W381-1H11-scFv

[‡] 비특이적 대조군

[‡] W3072-z4C12 모 클론

[0129]

표 5

카스파제 방출 결과

Ab	EC ₅₀
W3072-z4C12-R1-60H10-uIgG1L	0.085
W3072-z4C12-R1-66B8-uIgG1L	0.071
W330-cAb1.hIgG1 (35783)	0.065
W330-hproIL1 (TL1A)	~0.334
W330-hAb. 35816	0.115
W3343-P6R31-1B2-uIgG1L	1.771
W3072-z4C12-R1-27A4-uIgG1L	0.142
W3072-z4C12-R1-42F2-uIgG1L	0.057
W3072-z4C12-R1-42G2-uIgG1L	0.018
W3072-z4C12-R1-42H8-uIgG1L	0.032
W3072-z4C12-R1-42F9-uIgG1L	0.043
W3072-z4C12-R1-43F11-uIgG1L	~0.1

[0130]

[0131]

1차 스크리닝에서 확인된 모든 개별적인 친화도 개선 돌연변이를 사용하여 조합 돌연변이체 라이브러리를 설계하고 작제하였다. 이 라이브러리는 결합 개선에 대한 상승 효과를 갖는 돌연변이의 조합을 확인하도록 스크리닝되었다. 단일 돌연변이체 클론 42G2를 벤치마크로서 사용하였다. TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 유의미하게 개선된 결합을 갖는 다수의 조합 돌연변이체 클론을 확인하였지만(도 10), 9G2인 오직 하나의 조합 돌연변이체는 경쇄 CDR1에서 Trp로의 Ser의 돌연변이를 포함하였다. 이 클론, 및 TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 가장 강한 결합을 나타낸 3개의 추가 클론(9A5, 1F10 및 5A6)은 IgG 전환 및 추가의 시험에 선택되었다(표 6).

표 6

클론 부위	VHCDR3(서열 번호)	VLCDR1(서열 번호)	VLCDR3(서열 번호)	Bmax	Kd
z4C12	DPFYSGLYALDF (16)	TLSSSELSSYTIV (19)	CGAGYTLAQYGVW (23)	0.1002	0.00008994
42G2 (16)W.... (25) (23)	0.4468	0.03675
9A5	..A.T..... (26)GF... (27)N..... (28)	1.811	0.07688
1F10	..A.T..... (26)NF... (29)S..... (30)	1.731	0.1177
10B8	..A..... (31)NF... (29) (23)	1.486	0.1621
5A6T..... (32)NF... (29)N..... (28)	1.887	0.1602
4B6	..A.T..... (26)N.... (33)N..... (28)	1.263	0.1488
3G4	..A.T..... (26)GF... (27)R..... (34)	1.527	0.1464
2A5	..A.T..... (26)NF... (29)	..M.....N..... (35)	1.282	0.09108
5E1	..A.T..... (26)N.... (33)	..M.....N..... (35)	1.322	0.1303
6G11 (16)NF... (29) (23)	1.325	0.1172
9G2	..A.T..... (26)W.... (25) (23)	1.038	0.05068

[0132]

[0133] IgG 전환 후, TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 개선된 결합을 갖는 클론은 하기와 같이 지정되었다:

[0134] 1F10 → W3072-z4C12-m1(M1이라고도 칭함)

[0135] 5A6 → W3072-z4C12-m2(M2라고도 칭함)

[0136] 9A5 → W3072-z4C12-m3(M3이라고도 칭함)

[0137] 9G2 → W3072-z4C12-m4(M4라고도 칭함)

[0138] 42G2 → W3072-z4C12-m5(M5라고도 칭함)

[0139] 카스파제-3 방출 검정은 오직 M5 및 M4(둘 다 경쇄 CDR1에서 Ser → Trp를 함유)가 모 인간화된 클론(W330-hAb35816, CDR 그래프팅에 의해 생성됨) 및 천연 리간드 TL1A와 비교하여 개선된 작용제 활성을 보여준다는 것을 나타낸 한편, 3개의 다른 돌연변이체는 모 항체보다 더 열악한 작용제 활성(도 11a 및 도 11b, 표 6), 그러나 TNFRSF25에 대한 더 높은 친화도 결합(도 10)을 보여주었다. 흥미롭게도, M4인 더 높은 친화도 클론은 M5 클론보다 더 높은 반응의 진폭을 가졌다(도 11b). M3인 가장 높은 친화도 클론은 모 인간화된 항체 및 키메라 클론의 것보다 열악한 작용제 활성을 가졌다(도 11a). 인간화된 모체가 키메라 모 항체와 비교하여 현저히 더 우수한 반응의 진폭을 가진다는 것은 또한 놀랍다(도 11a).

[0140] M5 및 M4를 IgG4로 재포매팅하고, IgG1 및 IgG4 포맷을 둘 다 카스파제-3 방출 검정에서 시험하였다. 이 연구는 IgG1 포매팅된 항체가 인간화된 4C12 IgG1(W330-hAb35816; 표 7)과 비교하여 개선된 작용제 활성을 보여준다는 것을 일관되게 밝혀냈다.

표 7

Ab	EC50
W330-cAb1.hIgG1 (35783)	0.088
W330-hproL1 (TL1A)	0.706
W330-hAb.35816	0.095
W3343-P6R31-1B2-uIgG1L	NA
M1-uIgG1L	1.839
M2-uIgG1L	0.656
M3-uIgG1L	0.17
M4-uIgG1L	0.07
M5-uIgG1L	0.08
M4-uIgG4L	0.1
M5-uIgG4L	0.1

[0141]

[0142] 친화도 성숙된 항체가 TNFRSF25에 대한 결합에 대해 4C12 또는 TL1A와 경쟁하는지를 결정하기 위해 경쟁 연구를 수행하였다. 제1 실험에서, 모든 샘플은 0.5 μ g/ml의 hTL1A-Ig-AF647을 받았고, 이것은 비표지된 4C12-M3, 4C12-M4, 4C12-M5 및 4C12와 경쟁하였다. 도 13a에 표시된 바대로, M4 및 M5 항체는 4C12 모 항체보다 TL1A에

대한 더 강한 경쟁을 입증하였다. 따라서, M4 및 M5가 M3보다 TNFRSF25-Fc에 더 약한 결합(9A5; 도 10), 그러나 모 항체보다 더 강한 결합(WT; 도 10)을 보여주었지만, 이것은 세포 표면 발현된 TNFRSF25에 대한 TL1A 결합의 더 강한 경쟁자인 것으로 나타났다. hTL1A-Ig-AF647을 받지 않은 샘플은 약 1000의 MFI를 갖고, hIgG1 아이소타입을 갖는 샘플은 약 3320의 MFI를 가졌다.

[0143] 모든 샘플이 0.5 μ g/ml의 4C12-AF647을 받은 추가의 경쟁 검정을 수행하고, 이것은 결합 곡선은 완료하도록 8 μ g/ml 이하의 연장된 비표지된 항체 농도에서 비표지된 4C12-M3, 4C12-M4 및 4C12-M5와 경쟁하였다. 도 13b에 표시된 바대로, 비표지된 4C12 모체는 표지된 4C12와 경쟁하는 한편, 아이소타입 hIgG1은 경쟁 효과를 갖지 않았다. 4C12-AF647을 받지 않은 샘플은 약 1400의 MFI를 가졌다. 4C12, M4 및 M5 친화도 성숙된 항체는 표지된 4C12에 대한 유사한 경쟁을 나타내는 한편, M3은 가장 약한 경쟁적 저해제였다.

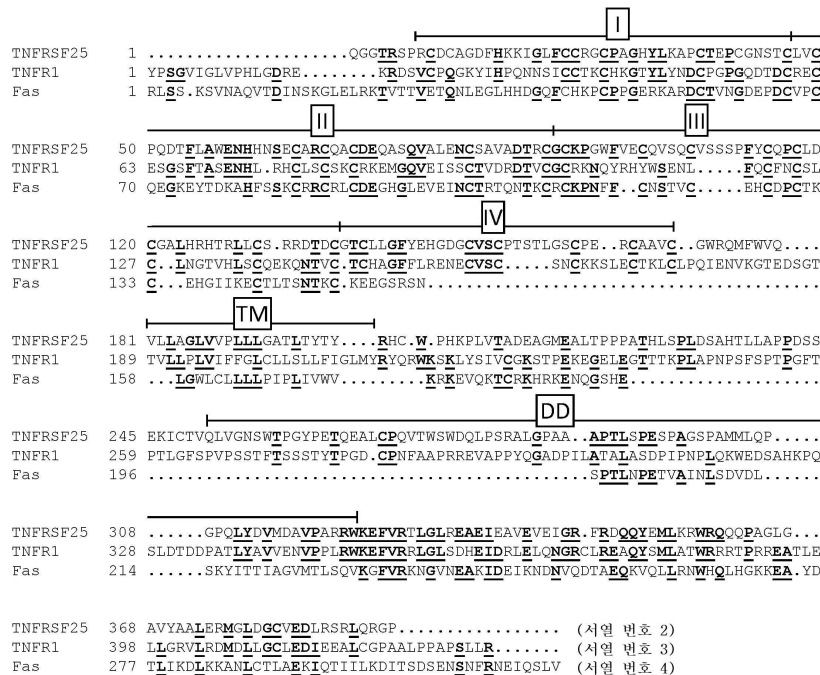
[0144] 따라서, 인간화된 4C12 항체가 친화도 성숙될 때, (항체 CDR의 포화된 돌연변이유발에 의한) 1차 스크리닝은 TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 개선된 결합으로 다수의 돌연변이체를 확인하였다. 특히, 경쇄 CDR1에서의 Ser→Trp 돌연변이를 함유하는 클론 M5은 카스파제-3 방출 검정에 의해 결정된 바와 같은 개선된 작용제 활성을 보여주었다. 조합 라이브러리 스크리닝은 TNFRSF25-Fc 단백질에 대한 M5보다 유의미하게 더 강한 결합으로 다수의 돌연변이체를 생성하였지만, 놀랍게도, 이들의 대부분은 모 항체와 비교하여 더 열악한 작용제 활성을 나타냈다. 이것의 예외는 M5와 경쇄 CDR1에서의 동일한 Ser→Trp 돌연변이를 함유하는 M4이다. 오직 M5 및 M4는 카스파제-3 방출 검정에서 개선된 작용제 활성 및 TNFRSF25-Fc 융합 단백질에 대한 개선된 결합 둘 다를 보여주었다. 또한, 이 클론은 또한, TNFRSF25에 대한 4C12 결합에 대한 필적하는 경쟁을 보유하면서(도 13b), 4C12 모체와 비교하여 세포로 발현된 TNFRSF25에 TL1A에 대한 더 강한 경쟁 결합을 나타냈다(도 13a).

[0145] **다른 실시형태**

[0146] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기재되어 있지만, 상기 설명은 첨부된 청구항의 범위에 의해 정의된 본 발명의 범위를 예시하고 제한하지 않도록 의도되는 것으로 이해되어야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 하기 청구항의 범위 내에 있다.

도면

도면1a



도면1b

인간 **TNFRSF25** 서열

Bodmer et al, Immunity 1997

MEQRPFGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTTRSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRCGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTEFLAW
ENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECVSQCVSSSPFYCQPCLDCCALHHRTRLCSRRDTC
GTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVPLLGGATLTYTYRHCWPHKPLVTADAEAGMEA
LTPPPATHLSPDLSAHTLLAPDSSSEKICTVQLVGNSTWPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLPSPSPAGS
PAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAUYAALERMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (서열 번호 1)

인간 **TNFRSF25** 서열 2

>gi|23200021|ref|NP_683866.1| 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 25 아이소폼 1 전구체
[호모 사피엔스]

MEQRPFGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTTRSPRCDCAGDFHKKIGLFCCRCGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTEFLAW
ENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECVSQCVSSSPFYCQPCLDCCALHHRTRLCSRRDTC
GTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVPLLGGATLTYTYRHCWPHKPLVTADAEAGMEA
LTPPPATHLSPDLSAHTLLAPDSSSEKICTVQLVGNSTWPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLPSPSPAGS
PAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAUYAALERMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (서열 번호 7)

마우스 **TNFRSF25** 서열

>uc008vzk.1 (Tnfrsf25) 길이=387

MEELPRRERSPPGAATPGSTARVQLPLFLPLLLLLLLLLLGGGQGGMSGRCDCASESQKRYGPFCCRCGCPKGYMKAPCAE
ECGNSTCLVCPQDTEFLAWENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECVSQCVSSSPFYCQPCLDCCALHHRTRLCSRRDTC
GTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVPLLGGATLTYTYRHCWPHKPLVTADAEAGMEA
LTPPPATHLSPDLSAHTLLAPDSSSEKICTVQLVGNSTWPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLPSPSPAGS
PAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAUYAALERMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (서열 번호 8)

레스스 마카크 **TNFRSF25** 서열

>gi|966914523|ref|XP_014998005.1| 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 25 아이소폼 X1
[마카카 몰라타]

MEQSRGSAVAAVASTALLLVLLGARAQGGTQSPRCDCAGDFHKKNGVFCRCGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTEFLAW
ENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECVSQCVSSSPFYCQPCLDCCALHHRTRLCSRRDTC
GTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVPLLGGATLTYTYRHCWPHKPLVTADAEAGMEA
LTPPPATHLSPDLSAHTLLAPDSSSEKICTVQLVGNSTWPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLPSPSPAGS
PAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAUYAALERMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (서열 번호 9)

사이노몰거스 마카크 **TNFRSF25** 서열

>gi|544409321|ref|XP_005544974.1| PREDICTED: 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 25 아이소폼 X2
[마카카 파스시쿨라리스]

MEQSRGSAVAAVASTALLLVLLGARAQGGTQSPRCDCAGDFHKKNGVFCRCGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTEFLAW
ENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECVSQCVSSSPFYCQPCLDCCALHHRTRLCSRRDTC
GTCLPGFYEHGDCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQMFVWQVLLAGLVVPLLGGATLTYTYRHCWPHKPLVTADAEAGMEA
LTPPPATHLSPDLSAHTLLAPDSSSEKICTVQLVGNSTWPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAPTLPSPSPAGS
PAMMLQPGPQLYDMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWRQQQPAGLGAUYAALERMGLDGC
VEDLRSRLQRGP (서열 번호 10)

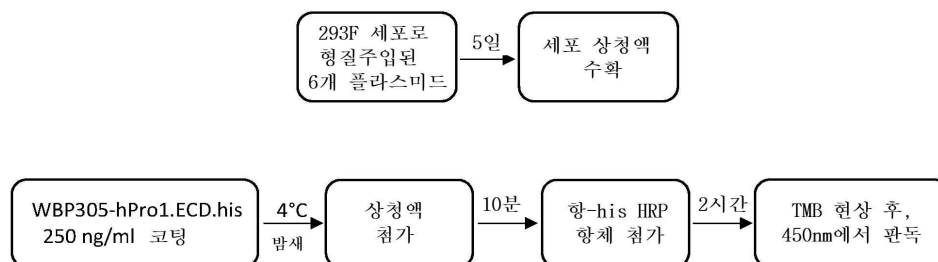
밀줄 = 단일 캡타이드

하이라이트 = 세포외 도메인

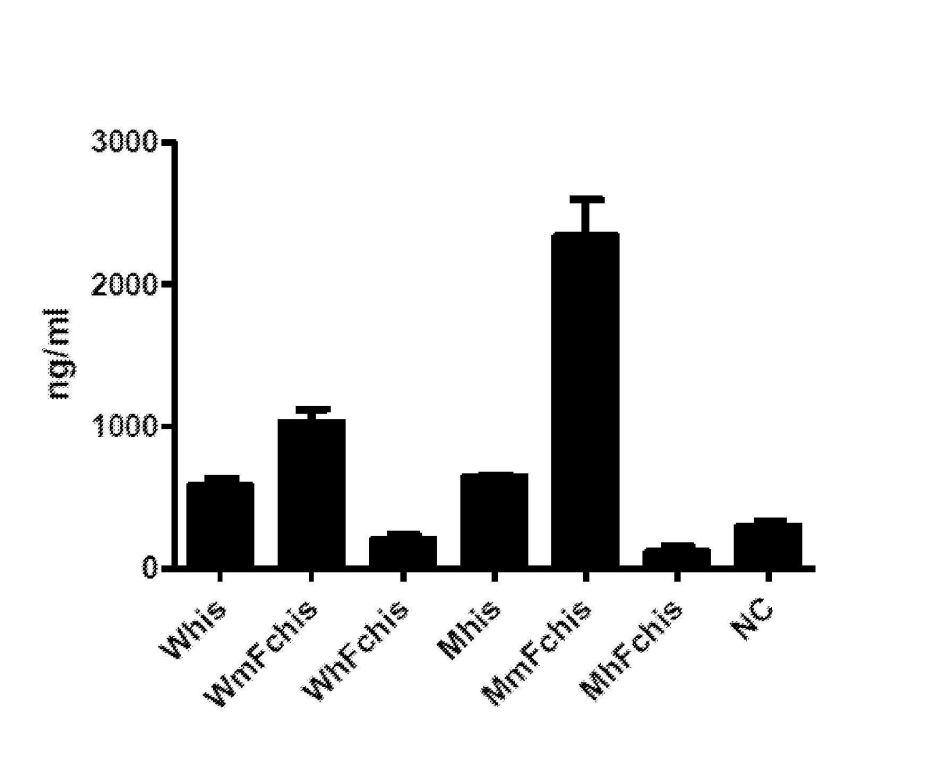
블드체 = 막관통 도메인

이중 밀줄 = PTX25 에피토프

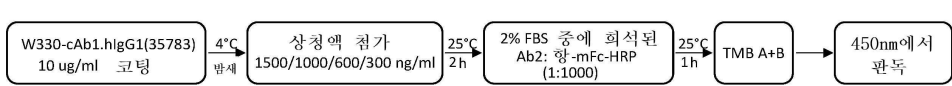
도면2



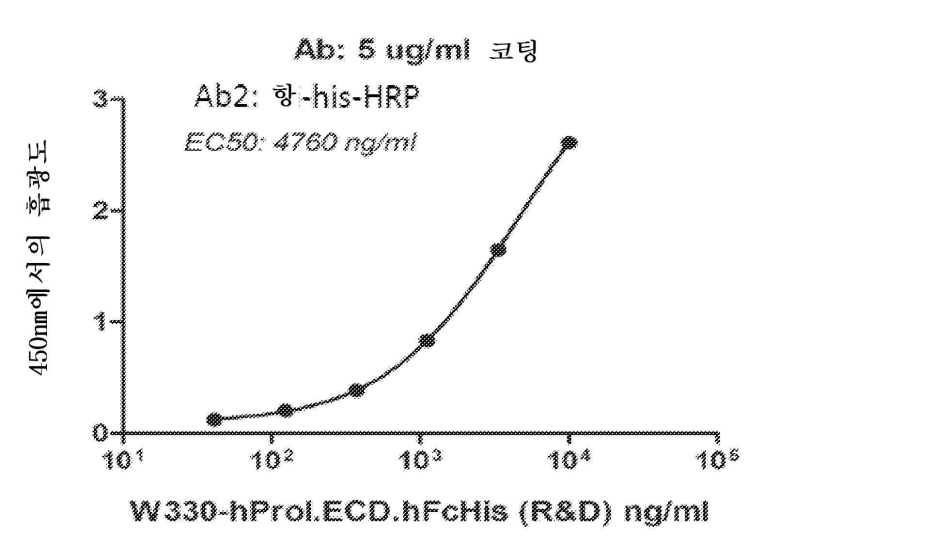
도면3



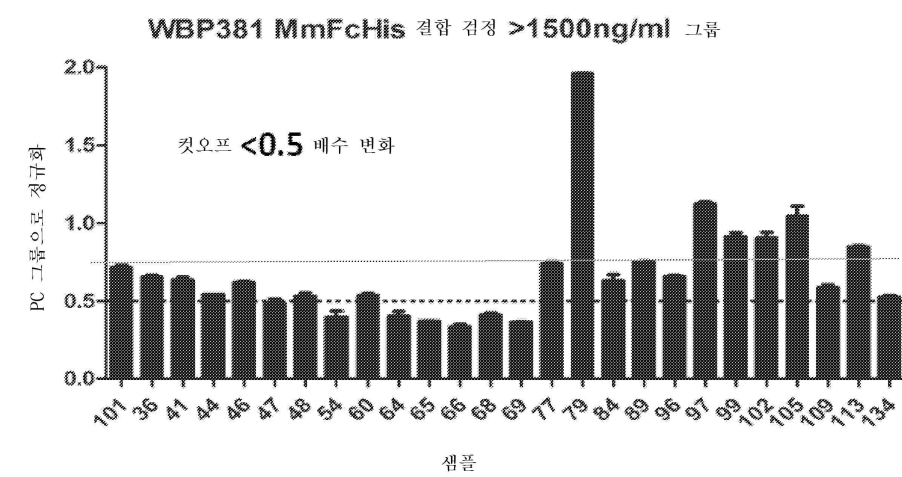
도면4



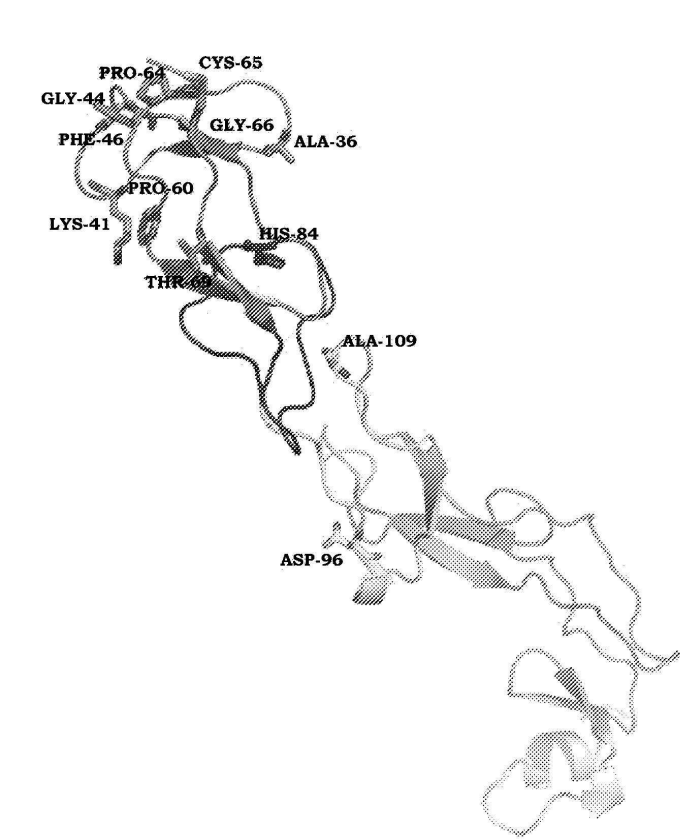
도면5



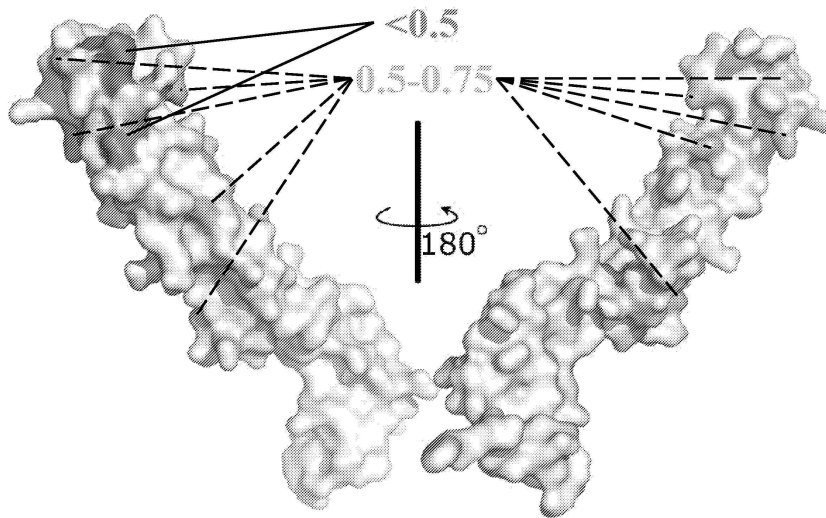
도면6



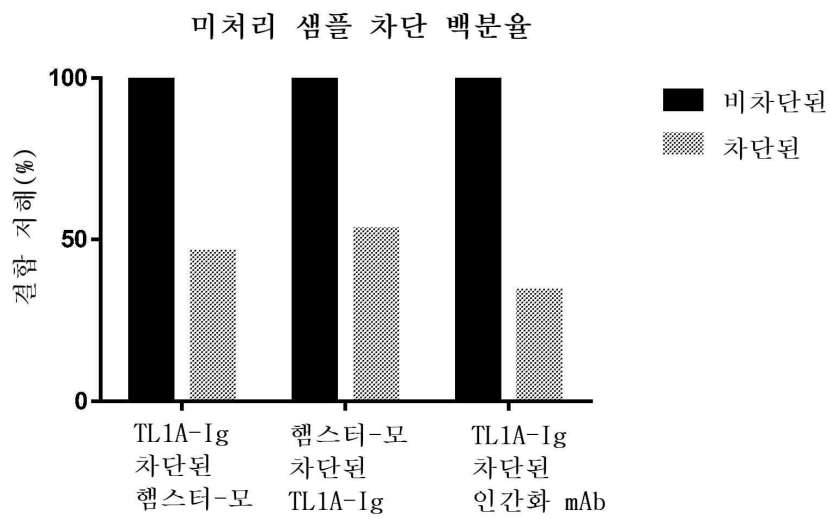
도면7



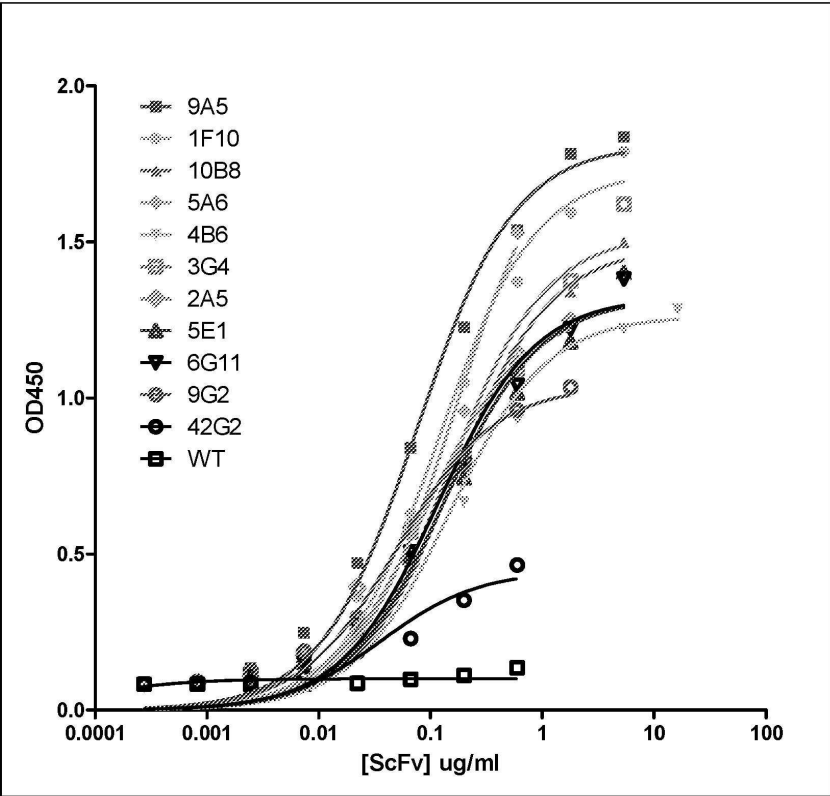
도면8



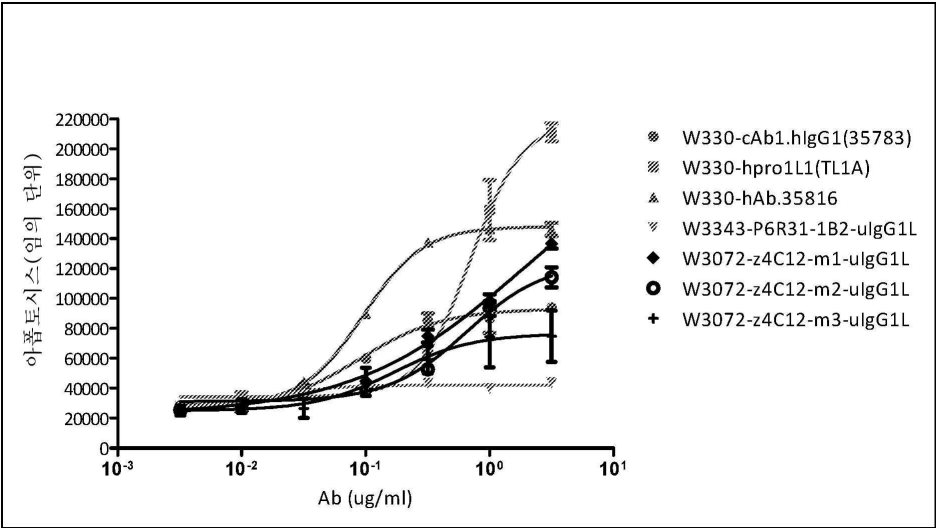
도면9



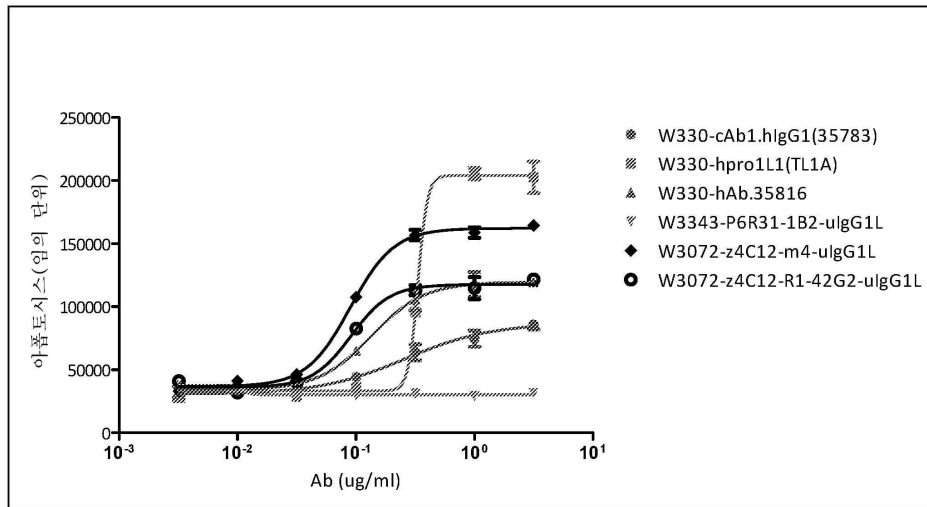
도면10



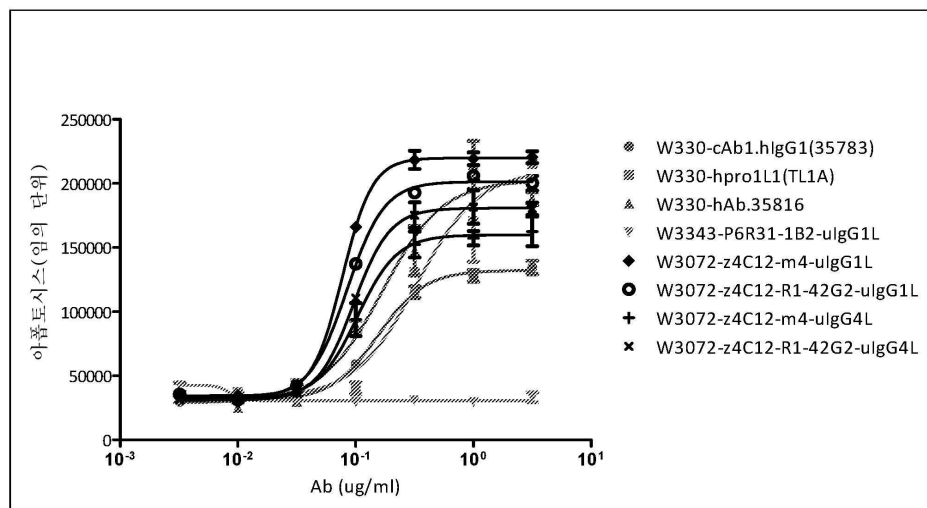
도면11a



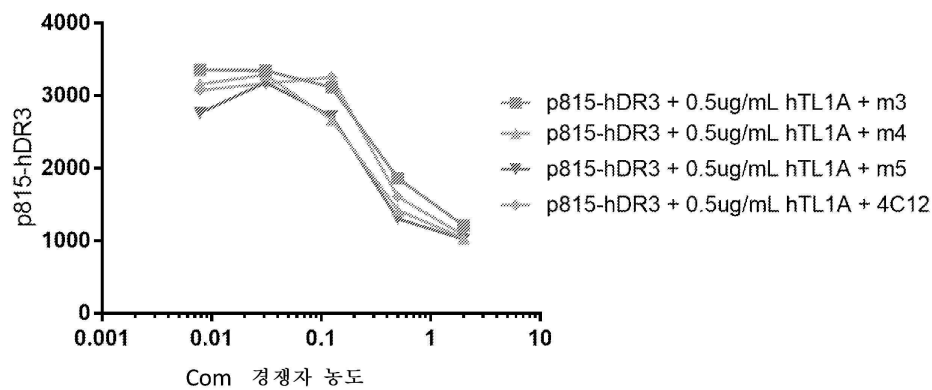
도면11b



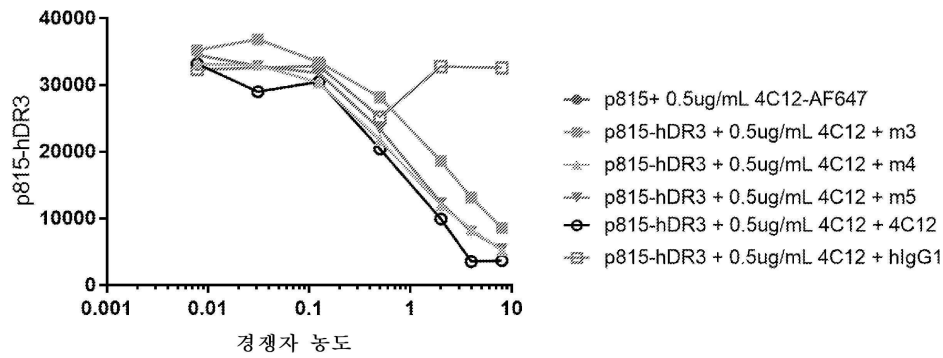
도면12



도면13a



도면13b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pelican Therapeutics, Inc.

<120> ANTI-TNFRSF25 ANTIBODIES

<130> WO2017/214547

<140> PCT/US2017/036817

<141> 2017-06-09

<150> US 62/348,009

<151> 2016-06-09

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 417

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys

35 40 45

Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro

50 55 60

Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp

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

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

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

 275 280 285
 Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro
 290 295 300
 Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser

305 310 315 320
 Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr
 325 330 335
 Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg

 340 345 350
 Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln
 370 375 380
 Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met
 385 390 395 400
 Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly

 405 410 415
 Pro

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe
100 105 110

Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg
115 120 125

Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Leu Gly
130 135 140

Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu
145 150 155 160

Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met
165 170 175

Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu
180 185 190

Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro
195 200 205

Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro
210 215 220

Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro
225 230 235 240

Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser
245 250 255

Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val
260 265 270

Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala
275 280 285

Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met
290 295 300

Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala
305 310 315 320

Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu
325 330 335

Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr

340 345 350
 Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala
 355 360 365

 Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp
 370 375 380
 Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro
 385 390
 <210> 3
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn
 20 25 30

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

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

145 150 155 160
 Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln
 165 170 175
 Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Val Leu Leu
 180 185 190
 Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile
 195 200 205
 Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys Ser Lys Leu Tyr Ser Ile
 210 215 220

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

 Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala
 290 295 300
 Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn Pro Leu Gln Lys Trp Glu
 305 310 315 320
 Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp Thr Asp Asp Pro Ala Thr
 325 330 335
 Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro Leu Arg Trp Lys Glu Phe
 340 345 350

 Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu Ile Asp Arg Leu Glu Leu
 355 360 365
 Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Met Leu Ala Thr
 370 375 380
 Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala Thr Leu Glu Leu Leu Gly
 385 390 395 400

Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly Cys Leu Glu Asp Ile Glu
405 410 415

Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Ser Leu Leu
420 425 430

Arg

<210> 4

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn

20 25 30

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro

35 40 45

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro

50 55 60

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His

65 70 75 80

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly

85 90 95

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg

100 105 110

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

115 120 125

Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr

130 135 140

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp

145 150 155 160

Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg

165 170 175

Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly

180 185 190

Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu

195 200 205

Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu

245 250 255

Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys

260 265 270

Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys

275 280 285

Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser

290 295 300

Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val

305 310 315

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn His

20 25 30

Asp Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Pro Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 6

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Ser Tyr Thr
20 25 30

Ile Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45

Tyr Leu Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80

Asn Val Gln Ser Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Ala Gly Tyr
85 90 95

Thr Leu Ala Gly Gln Tyr Gly Trp Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 7

<211> 426

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys

35 40 45

Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp

85 90 95

Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp

100 105 110

Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser

115 120 125

Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys

130 135 140

Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr

145 150 155 160

Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys

165 170 175

Val Ser Cys Pro Thr Pro Pro Pro Ser Leu Ala Gly Ala Pro Trp Gly

180 185 190

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

195 200 205

Val Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu

210 215 220

Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala

260 265 270

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

275 280 285

Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln

290 295 300

Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala

305 310 315 320

Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met

325 330 335

Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro

340 345 350

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

355 360 365

Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln

370 375 380

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

385 390 395 400

Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu

405 410 415

Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro

420 425

<210> 8

<211> 387

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

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

 115 120 125
Ser Asp Thr His Cys Gly Cys Gln Ser Gly Trp Cys Val Asp Cys Ser
 130 135 140
Thr Glu Pro Cys Gly Lys Ser Ser Pro Phe Ser Cys Val Pro Cys Gly
145 150 155 160
Ala Thr Thr Pro Val His Glu Ala Pro Thr Pro Leu Phe Trp Val Gln
 165 170 175
Val Leu Leu Gly Val Ala Phe Leu Phe Gly Ala Ile Leu Ile Cys Ala

 180 185 190
Tyr Cys Arg Trp Gln Pro Cys Lys Ala Val Val Thr Ala Asp Thr Ala
 195 200 205
Gly Thr Glu Thr Leu Ala Ser Pro Gln Thr Ala His Leu Ser Ala Ser
 210 215 220
Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Ser Ser Thr Gly Lys Ile
225 230 235 240
Cys Thr Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Asn Trp Thr Pro Gly Leu Ser

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

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

370 375 380

Arg Gly Pro

385

<210> 9

<211> 420

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 9

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

Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys
50 55 60

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

 Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys
 115 120 125
 Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys
 130 135 140
 Leu Asp Cys Arg Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg
 145 150 155 160
 Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Asp
 165 170 175

 Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu
 180 185 190
 Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val
 195 200 205
 Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr
 210 215 220
 Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Met Val Thr Ala Asp
 225 230 235 240

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

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

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

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

<210> 10

<211> 417

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 10

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

Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Leu Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp
 85 90 95

Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp
 100 105 110
 Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser
 115 120 125

 Gln Cys Gly Ser Ser Ser Pro Phe Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys
 130 135 140
 Arg Ala Leu His Arg His Thr Arg Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr
 145 150 155 160
 Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Glu His Asp Asp Gly Cys
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala
 180 185 190

 Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala
 195 200 205
 Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr
 210 215 220
 Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Met Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly
 225 230 235 240
 Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Ser Asp
 245 250 255

 Asn Ala His Thr Leu Leu Val Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys
 260 265 270
 Thr Val Gln Leu Val Asp Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro His Thr
 275 280 285
 Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Met Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro
 290 295 300
 Asn Arg Ala Leu Gly Pro Val Pro Ala Ser Thr Leu Leu Pro Glu Ser
 305 310 315 320

 Pro Val Gly Ser Pro Thr Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr
 325 330 335
 Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg

340 345 350
 Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln
 370 375 380

Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met
 385 390 395 400
 Gly Leu Asp Gly Cys Ala Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly
 405 410 415
 Pro

<210> 11
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Cricetulus migratorius
 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ser Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Leu Ser Cys Glu Ala Ser

20 25
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Cricetulus migratorius
 <400> 12
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn His Asp Leu Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Cricetulus migratorius
 <400> 13
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 14

Tyr Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Ile Ser Tyr Ala Asp Ala Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 15

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

1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 16

Asp Pro Pro Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys

20

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 19

Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Ser Tyr Thr Ile Val

1 5 10

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 20

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met Tyr

1 5 10 15

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> *Cricetulus migratorius*

<400> 21

Leu Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp

1 5 10

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> Cricetulus migratorius

<400> 22

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr

1 5 10 15

Leu Ser Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Phe

20 25 30

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Cricetulus migratorius

<400> 23

Cys Gly Ala Gly Tyr Thr Leu Ala Gly Gln Tyr Gly Trp Val

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Cricetulus migratorius

<400> 24

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 25

Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Trp Tyr Thr Ile Val

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 26

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

1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 27

Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Gly Phe Thr Ile Val

1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 28

Cys Gly Ala Gly Tyr Thr Leu Ala Asn Gln Tyr Gly Trp Val

1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 29

Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Asn Phe Thr Ile Val

1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 30

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

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 31

Asp Pro Ala Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 33

Thr Leu Ser Ser Glu Leu Ser Asn Tyr Thr Ile Val

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 34

Cys Gly Ala Gly Tyr Thr Leu Ala Arg Gln Tyr Gly Trp Val

1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 35

Cys Gly Met Gly Tyr Thr Leu Ala Asn Gln Tyr Gly Trp Val

1

5

10