



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0097952
(43) 공개일자 2022년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7018948
(22) 출원일자(국제) 2020년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년06월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/080892
(87) 국제공개번호 WO 2021/089588
국제공개일자 2021년05월14일
(30) 우선권주장
62/930,512 2019년11월04일 미국(US)
63/080,361 2020년09월18일 미국(US)

(71) 출원인
피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하
독일 할베르크무스 85399 체플린슈트라세 3
(72) 발명자
울월, 웨인
독일 할베르크무스 85399 체플린슈트라세 3 피어
이스 파마슈티컬즈 게엠베하 내
마티스, 루이스
독일 할베르크무스 85399 체플린슈트라세 3 피어
이스 파마슈티컬즈 게엠베하 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 127 항

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질

(57) 요약

본 개시내용은 종양, 특히 HER2-양성 종양을 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다. 방법은 치료적 유효량의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다. HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로, 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 3주마다 1회 투여된다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/57 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

브룬스, 잉마르

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

두에르, 마누엘라

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

유수프, 루슈디아 자린

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

제틀, 마르쿠스

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

알러스도르퍼, 안드레아

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

카스트레사나, 아이제아 모랄레스

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

솔로서, 코리나

독일 할베르크무스 85399 제플린슈트라세 3 피어이
스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질로서,

상기 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 포함하되,

상기 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하고, 여기서 항체는

(i) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR; 및

(ii) SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며; 및

리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 치료는

- a. 전체 종양 조직에서 CD8+T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;
- b. 종양 세포에서 CD8+T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;
- c. 전체 종양 조직에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;
- d. 종양 세포에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;
- e. 측정된 면적 mm²당 약 500개 미만의 처리전 수준으로부터 CD8+T 세포의 증가이되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질 또는 종양 세포의 면적이며;
- f. 표적 병변에서 적어도 30% 감소;
- g. 안정적인 질병;
- h. 부분 관해; 또는
- i. 완전 관해와 관련되는 융합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

치료는 PD-1 축 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하지 않는 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 3주마다 약 1회, 2주마다 약 1회 또는 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 2주마다 약 1회의 간격으로 투여되는 경우 융합 단백질을 약 3주마다의 간격으로 투여하는 것과 비교하여 우수한 종양 관해와 관련되는 융합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서,

우수한 종양 관해는 더 긴 관해 기간인 융합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 23

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 24

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 25

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 26

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 27

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 28

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 29

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 30

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 31

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 32

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 33

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 34

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 35

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 36

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 37

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 38

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 39

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 40

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 41

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 42

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 43

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함

하는 융합 단백질.

청구항 44

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 45

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 46

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 47

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 48

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 49

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 50

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 51

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 52

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 53

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 54

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 55

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 56

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 57

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 58

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 59

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 60

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 61

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 62

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 63

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 융합 단백질을 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 64

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 용량 제한 독성과 연관되지 않은 융합 단백질.

청구항 65

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질은 주입에 의해 투여되는 융합 단백질.

청구항 66

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 HER2 표적화 약물 또는 4-1BB/4-1BBL 경로 표적화 약물로 이전에 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 67

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 항-HER2 항체로 이전에 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 68

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 트라스투주맙으로 이전에 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 69

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 퍼투주맙으로 이전에 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 70

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 항-4-1BB 항체로 이전에 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 71

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

종양은 위암, 부인과암(예를 들어, 나팔관암, 자궁내막암 또는 난소암), 유방암, 폐암, 특히 비소세포폐암, 담낭암, 담관암종, 흑색종, 식도암, 위식도암(예를 들어, 위식도 접합부 암), 결장직장암, 직장암, 대장암, 췌장암, 담도암, 타액관암, 방광암 및 원발성 미상암으로 구성된 군에서 선택되는 융합 단백질.

청구항 72

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,

종양은 위암, 위식도암, 나팔관암, 유방암, 담낭암 및 방광암으로 구성된 군에서 선택되는 융합 단백질.

청구항 73

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,

종양은 위암, 위식도암, 나팔관암, 유방암, 및 폐암, 특히 비소세포폐암으로 구성된 군에서 선택되는 융합 단백질.

질.

청구항 74

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 위암 또는 위식도암인 융합 단백질.

청구항 75

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 위암인 융합 단백질.

청구항 76

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 나팔관암인 융합 단백질.

청구항 77

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 유방암인 융합 단백질.

청구항 78

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 폐암인 융합 단백질.

청구항 79

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 비소세포폐암인 융합 단백질.

청구항 80

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 담낭암인 융합 단백질.

청구항 81

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 흑색종인 융합 단백질.

청구항 82

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 식도암인 융합 단백질.

청구항 83

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,
종양은 자궁내막암인 융합 단백질.

청구항 84

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서,

중양은 직장암인 융합 단백질.

청구항 85

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는 융합 단백질.

청구항 86

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질의 1회 처리 주기 후 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는 융합 단백질.

청구항 87

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질의 2회 처리 주기 후 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는 융합 단백질.

청구항 88

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질의 3회 처리 주기 후 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는 융합 단백질.

청구항 89

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 B 세포 고갈제로 치료받은 적이 있는 융합 단백질.

청구항 90

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

치료는 B 세포 고갈제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 융합 단백질.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서,

B 세포 고갈제는 항-CD20 항체인 융합 단백질.

청구항 92

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

B 세포 고갈제는 오비누투주맙인 융합 단백질.

청구항 93

제89항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 오비누투주맙으로 치료받은 적이 있고, 또는 오비누투주맙은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 약 3주에서 투여일까지의 시간에 약 1000 mg 내지 약 2000 mg의 용량으로 대상체에게 투여되는 융합 단백질.

청구항 94

제89항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

오비누투주맙은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 약 7일에 약 1000 mg 내지 약 2000 mg의 용량으로 대상체에게 투여되는 융합 단백질.

청구항 95

제89항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서,

오비누투주맵은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 7일에 약 2000 mg의 용량으로 또는 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 7일 또는 6일에 1000 mg의 용량으로 대상체에게 투여되는 융합 단백질.

청구항 96

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

B 세포 고갈제는 리툭시맵인 융합 단백질.

청구항 97

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

B 세포 고갈제는 오크렐리주맵인 융합 단백질.

청구항 98

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

B 세포 고갈제는 벨투주맵인 융합 단백질.

청구항 99

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 말초 혈액에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는 융합 단백질.

청구항 100

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 림프절에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는 융합 단백질.

청구항 101

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 비장에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는 융합 단백질.

청구항 102

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 103

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 104

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 105

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 106

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 전체 종양 조직 mm^2 당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 107

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 108

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 109

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 110

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 111

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 112

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 113

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 114

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 115

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 세포당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 116

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 117

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 118

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 119

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 120

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 121

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 122

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 mm^2 종양 기질당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 123

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 124

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

대상체는 (i) 측정된 면적의 mm^2 당 약 250개 미만의 CD8+T 처리전 수준을 갖되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며, 및 (ii) 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 융합 단백질.

청구항 125

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 융합

단백질.

청구항 126

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

청구항 127

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서,

융합 단백질이 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠(chain) 및 SEQ ID NO: 51에 제시된 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠를 포함하는 융합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] CD137로도 알려진 4-1BB는 보조자극 면역 수용체 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼패밀리의 구성원이다. 4-1BB는 면역반응 조절에 중요한 역할을 하므로 암 면역요법을 위한 표적이다. 4-1BB 리간드(4-1BBL)는 4-1BB의 유일하게 알려진 천연 리간드이며 활성화된 B 세포, 단핵구 및 비장의 수지상세포와 같은 여러 유형의 항원제시 세포(APC)에서 구성적으로 발현된다. 4-1BB는 T 림프구에서도 유도될 수 있다.
- [0002] HER2 또는 HER2/neu는 인간 표피 성장 인자 수용체 패밀리의 구성원이다. 이 종양유전자의 증폭 또는 과발현은 특정 공격적 유형의 유방암을 비롯한 다양한 종양의 발달 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. HER2는 특정 종양 세포에서 매우 차별적으로 발현되는 것으로 나타났으며, 건강한 조직에 비해 그들 세포에서 훨씬 더 높은 세포 표면 밀도를 나타낸다.
- [0003] 리포칼린은 리간드에 결합하도록 조작될 수 있는 단백질성 분자이다. 다양한 리포칼린의 뮤테인(리포칼린 뮤테인)은 빠르게 확장하는 치료제 부류이며 고도로 정교한 인공 공학을 통해 구성되어 야생형 리포칼린의 천연 리간드와 다른 표적에 대해 높은 친화성과 특이성을 나타낼 수 있다(예를 들어, WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029463, WO 03/029471 및 WO 05/19256 참조).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0004] (비특허문헌 0001) 1. ALIZADEH, A. A., GENTLES, A. J., ALENCAR, A. J., LIU, C. L., KOHRT, H. E., HOUOT, R., GOLDSTEIN, M. J., ZHAO, S., NATKUNAM, Y., ADVANI, R. H., GASCOYNE, R. D., BRIONES, J., TIBSHIRANI, R. J., MYKLEBUST, J. H., PLEVITIS, S. K., LOSSOS, I. S. & LEVY, R. 2011. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. Blood, 118, 1350-8.
- (비특허문헌 0002) 2. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215, 403-10.
- (비특허문헌 0003) 3. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 25, 3389-402.
- (비특허문헌 0004) 4. BLANDO, J., SHARMA, A., HIGA, M. G., ZHAO, H., VENCE, L., YADAV, S. S., KIM, J., SEPULVEDA, A. M., SHARP, M., MAITRA, A., WARGO, J., TETZLAFF, M., BROADDUS, R., KATZ, M. H. G., VARADHACHARY, G. R., OVERMAN, M., WANG, H., YEE, C., BERNATCHEZ, C., IACOBUZIO-DONAHUE, C., BASU, S., ALLISON, J. P. & SHARMA, P. 2019. Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer

highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 1692-1697.

(비특허문헌 0005) 5. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., WINDMAN, M., RUE, S. M., ETTEBERG, S., KNEE, D. A., WILSON, N. S., DRANOFF, G. & BROGDON, J. L. 2013. Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*, 210, 1685-93.

(비특허문헌 0006) 6. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., ZHANG, J., DRANOFF, G., WILSON, N. S. & BROGDON, J. L. 2014. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcgammaRs, leading to antitumor efficacy. *Immunol Cell Biol*, 92, 475-80.

(비특허문헌 0007) 7. CHEN, P. L., ROH, W., REUBEN, A., COOPER, Z. A., SPENCER, C. N., PRIETO, P. A., MILLER, J. P., BASSETT, R. L., GOPALAKRISHNAN, V., WANI, K., DE MACEDO, M. P., AUSTIN-BRENNEMAN, J. L., JIANG, H., CHANG, Q., REDDY, S. M., CHEN, W. S., TETZLAFF, M. T., BROADDUS, R. J., DAVIES, M. A., GERSHENWALD, J. E., HAYDU, L., LAZAR, A. J., PATEL, S. P., HWU, P., HWU, W. J., DIAB, A., GLITZA, I. C., WOODMAN, S. E., VENCE, L. M., WISTUBA, II, AMARIA, R. N., KWONG, L. N., PRIETO, V., DAVIS, R. E., MA, W., OVERWIJK, W. W., SHARPE, A. H., HU, J., FUTREAL, P. A., BLANDO, J., SHARMA, P., ALLISON, J. P., CHIN, L. & WARGO, J. A. 2016. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov*, 6, 827-37.

(비특허문헌 0008) 8. CHESTER, C., SANMAMED, M. F., WANG, J. & MELERO, I. 2018. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*, 131, 49-57.

(비특허문헌 0009) 9. DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. 2006. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*, 281, 23514-24.

(비특허문헌 0010) 10. DAWICKI, W. & WATTS, T. H. 2004. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol*, 34, 743-751.

(비특허문헌 0011) 11. EISENHAEUER, E. A., THERASSE, P., BOGAERTS, J., SCHWARTZ, L. H., SARGENT, D., FORD, R., DANCEY, J., ARBUCK, S., GWYTHYER, S., MOONEY, M., RUBINSTEIN, L., SHANKAR, L., DODD, L., KAPLAN, R., LACOMBE, D. & VERWEIJ, J. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45, 228-47.

(비특허문헌 0012) 12. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.

(비특허문헌 0013) 13. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24.

(비특허문헌 0014) 14. GLAESNER, W., VICK, A. M., MILLICAN, R., ELLIS, B., TSCHANG, S. H., TIAN, Y., BOKVIST, K., BRENNER, M., KOESTER, A., PORKSEN, N., ETGEN, G. & BUMOL, T. 2010. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev*, 26, 287-96.

(비특허문헌 0015) 15. HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.

(비특허문헌 0016) 16. LEE, H. W., PARK, S. J., CHOI, B. K., KIM, H. H., NAM, K. O. & KWON, B. S. 2002. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol*, 169, 4882-8.

(비특허문헌 0017) 17. MAKKOUK, A., CHESTER, C. & KOHRT, H. E. 2016. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*, 54, 112-119.

(비특허문헌 0018) 18. MASSARELLI, E., SEGAL, N. H., RIBRAG, V., MELERO, I., GANGADHAR, T. C., URBA, W., SCHADENDORF, D., FERRIS, R. L., HOUOT, R., MORSCHHAUSER, F., LOGAN, T., LUKE, J. J., SHARFMAN, W., BARLESI, F., OTT, P. A., MANSI, L., KUMMAR, S., SALLES, G., CARPIO, C., MEIER, R., KRISHNAN, S., MCDONALD, D., MAURER, M., GU, X., NEELY, J., SURYAWANSHI, S., LEVY, R. & KHUSHALANI, N. Clinical

safety and efficacy assessment of the CD137 agonist urelumab alone and in combination with nivolumab in patients with hematologic and solid tumor malignancies. 31st Annual Meeting and Associated Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2016), 2016 National Harbor, MD, USA.

(비특허문헌 0019) 19. NEEDLEMAN, S. B. & WUNSCH, C. D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, 48, 443-53.

(비특허문헌 0020) 20. PEARSON, W. R. & LIPMAN, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2444-8.

(비특허문헌 0021) 21. SEGAL, N. H., HE, A. R., DOI, T., LEVY, R., BHATIA, S., PISHVAIAN, M. J., CESARI, R., CHEN, Y., DAVIS, C. B., HUANG, B., THALL, A. D. & GOPAL, A. K. 2018. Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res*, 24, 1816-1823.

(비특허문헌 0022) 22. SEGAL, N. H., LOGAN, T. F., HODI, F. S., MCDERMOTT, D., MELERO, I., HAMID, O., SCHMIDT, H., ROBERT, C., CHIARION-SILENI, V., ASCIERTO, P. A., MAIO, M., URBA, W. J., GANGADHAR, T. C., SURYAWANSHI, S., NEELY, J., JURE-KUNKEL, M., KRISHNAN, S., KOHRT, H., SZNOL, M. & LEVY, R. 2017. Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res*, 23, 1929-1936.

(비특허문헌 0023) 23. SILVA, J. P., VETTERLEIN, O., JOSE, J., PETERS, S. & KIRBY, H. 2015. The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation. *J Biol Chem*, 290, 5462-9.

(비특허문헌 0024) 24. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50.

(비특허문헌 0025) 25. SMITH, T. F. & WATERMAN, M. S. 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147, 195-7.

(비특허문헌 0026) 26. SNELL, L. M., LIN, G. H., MCPHERSON, A. J., MORAES, T. J. & WATTS, T. H. 2011. T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 244, 197-217.

(비특허문헌 0027) 27. TOLCHER, A. W., SZNOL, M., HU-LIESKOVAN, S., PAPADOPOULOS, K. P., PATNAIK, A., RASCO, D. W., DI GRAVIO, D., HUANG, B., GAMBHIRE, D., CHEN, Y., THALL, A. D., PATHAN, N., SCHMIDT, E. V. & CHOW, L. Q. M. 2017. Phase Ib Study of Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Combination with Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 23, 5349-5357.

(비특허문헌 0028) 28. TUMEH, P. C., HARVIEW, C. L., YEARLEY, J. H., SHINTAKU, I. P., TAYLOR, E. J., ROBERT, L., CHMIELOWSKI, B., SPASIC, M., HENRY, G., CIOBANU, V., WEST, A. N., CARMONA, M., KIVORK, C., SEJA, E., CHERRY, G., GUTIERREZ, A. J., GROGAN, T. R., MATEUS, C., TOMASIC, G., GLASPY, J. A., EMERSON, R. O., ROBINS, H., PIERCE, R. H., ELASHOFF, D. A., ROBERT, C. & RIBAS, A. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568-71.

(비특허문헌 0029) 29. VOGEL, C. L., COBLEIGH, M. A., TRIPATHY, D., GUTHEIL, J. C., HARRIS, L. N., FEHRENBACHER, L., SLAMON, D. J., MURPHY, M., NOVOTNY, W. F., BURCHMORE, M., SHAK, S., STEWART, S. J. & PRESS, M. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20, 719-26.

(비특허문헌 0030) 30. WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. & WINTER, G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544-6.

(비특허문헌 0031) 31. YAO, S., ZHU, Y. & CHEN, L. 2013. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 130-46.

(비특허문헌 0032) 32. ZALEVSKY, J., CHAMBERLAIN, A. K., HORTON, H. M., KARKI, S., LEUNG, I. W.,

SPROULE, T. J., LAZAR, G. A., ROOPENIAN, D. C. & DESJARLAIS, J. R. 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. Nat Biotechnol, 28, 157-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0005] PRS-343은 최초의 4-1BB 기반 이중특이적 치료제로 개발된 HER2/4-1BB 이중특이적 항체-리포칼린 뮤테인 융합 단백질이다. 본 개시내용은 HER2 양성(HER2+) 진행성 또는 전이성 고형 종양을 갖는 환자에서 PRS-343의 임상 연구에 기초한다.
- [0006] 본 개시내용은 무엇보다도 HER2/4-1BB 이중특이적 항체-리포칼린 뮤테인 융합 단백질을 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 방법 및 조성물은 HER2+ 종양을 치료하는 데 안전하고 효과적인 것으로 나타났다.
- [0007] 일부 구체예에서, 방법은 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg 범위의 용량으로 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 3주마다 1회 투여하는 것을 포함한다.
- [0008] 정의
- [0009] 다음 목록은 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어, 문구 및 약어를 정의한다. 여기에 나열되고 정의된 모든 용어는 모든 문법적 형태를 포함하도록 의도되었다.
- [0010] 본원에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, "4-1BB"는 인간 4-1BB(hu4-1BB)를 의미한다. 인간 4-1BB는 UniProt Q07011에 의해 정의된 전장 단백질, 이의 단편 또는 이의 변이체를 의미한다. 4-1BB는 CD137, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 9(TNFRSF9)로도 알려져 있으며 림프구 활성화(ILA)에 의해 유도된다. 일부 특정 구체예에서, 4-1BB의 비인간 종, 예를 들어 시노물구스 4-1BB 및 마우스 4-1BB가 사용된다.
- [0011] 본원에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, "HER2"는 인간 HER2(huHER2)를 의미한다. 인간 Her 2는 UniProt P04626으로 정의되는 전장 단백질, 이의 단편 또는 이의 변이체를 의미한다. HER2는 인간 표피 성장 인자 수용체 2, HER2/neu, 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-2, 분화 클러스터 340(CD340), 원종양유전자 Neu, ERBB2(인간), Erbb2(설치류), c-neu 또는 p185로도 알려져 있다. 인간 HER2는 ERBB2 유전자에 의해 인코딩된다. 일부 특정 구체예에서, 비인간 종의 HER2, 예를 들어 시노물구스 HER2 및 마우스 HER2가 사용된다.
- [0012] 용어 "항-"은 목적 단백질 표적(예를 들어, 4-1BB, 또는 HER2)과 관련된 분자를 설명하는 데 사용될 때 분자가 단백질 표적에 결합하고/하거나 하나 이상의 단백질 표적의 생물학적 기능을 조절할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본원에 기재된 "항-4-1BB" 분자는 4-1BB에 결합하고/하거나 4-1BB의 하나 이상의 생물학적 기능을 조절할 수 있다. 단백질 표적의 "생물학적 기능"은 예를 들어 결합 파트너(들)에 대한 결합 및 신호 전달 경로(들) 매개와 같은 생물학적 임무(들)을 수행하는 단백질 표적의 능력을 지칭한다.
- [0013] 본원에 사용된 "T 세포 활성화"는 T 세포의 증식 및/또는 분화를 유도하는 과정을 지칭한다. T 세포의 활성화는 면역 반응의 개시 및/또는 영구보존으로 이어질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, T 세포 활성화는 암, 자가 면역 질환 및 염증성 질병과 같은 조절되지 않는 면역 반응과 관련된 질병 또는 장애를 가진 대상체의 건강을 평가하는데 사용될 수 있다. T 세포 증식은 T 세포 집단의 확장을 지칭한다. "T 세포 증식" 및 "T 세포 확장"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0014] 용어 "T 세포 활성을 향상시키다", "T 세포를 활성화하다" 및 "T 세포 반응을 자극하다"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며 T 세포가 지속된 또는 증폭된 생물학적 기능을 갖도록 유도, 유발 또는 자극하거나, 소모되거나 비활성화된 T 세포를 재생 또는 재활성화하는 것을 지칭한다. 향상된 T 세포 활성의 예시적인 징후에는 T 세포로부터의 인터루킨-2(IL-2) 분비 증가, T 세포로부터 인터페론-감마(IFN- γ) 분비 증가, T 세포 증식 증가, 및/또는 증가된 항원 반응성(예: 바이러스, 병원체 및 종양 제거)이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 이러한 향상을 측정하는 방법은 당업자에게 알려져 있다.

- [0015] "암" 및 "암성"은 일반적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭한다. "종양"은 하나 이상의 암세포를 포함할 수 있다. "병변"은 조직 또는 기관의 국소적인 변화이다. 종양은 병변의 유형이다. "표적 병변"은 구체적으로 측정된 병변이다. "비-표적 병변"은 존재가 확인되었지만 측정이 이루어지지 않은 병변이다. 용어 "암", "종양" 및 "병변"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0016] "전이성"이라는 용어는 암세포가 처음 형성된 곳에서 떨어져 나와 신체의 다른 부분에 새로운 종양(전이성 종양)을 형성하는 암 상태를 지칭한다. "진행성" 암은 국소적으로 진행되거나 전이될 수 있다. 국소 진행성 암은 기원 부위 또는 기관 외부에서 성장했지만 아직 신체의 먼 부분으로 퍼지지 않은 암을 지칭한다.
- [0017] "종양 미세환경(TME)"은 비-암세포와 그들의 기질로 구성된 종양 주변 환경을 지칭한다. 종양 기질은 섬유아세포/근섬유아세포, 신경교, 상피, 지방, 면역, 혈관(vascular), 평활근 및 면역 세포, 혈관(blood vessel), 신호 분자 및 세포외 기질(ECM)을 포함하는 세포의 모음을 포함하며, 구조적 또는 결합적 역할을 제공한다. 이러한 맥락에서 "전체 종양 조직"은 종양 세포와 종양 기질로 구성된다.
- [0018] 본원에 사용된 "항-종양제" 또는 "항-종양 약물"은 종양, 특히 악성 종양에 작용할 수 있으며, 바람직하게는 항 종양 효과 또는 항종양 활성을 갖는다. "항-종양 효과" 또는 "항-종양 활성"은 종양 특이적 면역 반응 자극, 표적 병변 감소, 종양 크기 감소, 종양 세포 성장 억제, 전이 억제, 완전 관해, 부분 관해, 안정적인 질병, 재발 전 기간 연장, 환자의 생존 시간 연장, 또는 환자의 삶의 질 향상을 포함하는 종양, 특히 악성 종양에 대한 항-종양제의 작용을 지칭한다.
- [0019] 본원에 사용된 "치료하다" 또는 "치료"는 생리학적 병태 또는 장애 또는 임상 병리의 과정 동안 치료되는 대상체의 자연적 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료는 치료적 처치 및/또는 예방적 또는 예방적 조치일 수 있으며, 여기서 목적은 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애, 예컨대 암과 같은 과증식성 병태의 성장, 발달 또는 확산을 예방하거나 늦추는 것(경감)이다. 치료의 원하는 효과에는 검출 가능 여부에 관계없이 질병 진행 속도 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화, 증상 완화, 질병 상태의 안정화 또는 악화 방지, 개선된 예후의 완화가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 치료의 원하는 효과에는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존과 비교하여 생존을 연장하는 것도 포함된다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 병태 또는 장애를 갖고 있거나 병태 또는 장애를 갖기 쉬운 대상체 또는 병태 또는 장애가 예방되어야 하는 대상체를 포함한다.
- [0020] 종양이 있는 대상체에게 제공된 치료는 고형 종양의 관해 평가 기준(RECIST) 지침(버전 1.1)(Eisenhauer et al., 2009)에 설명된 대로 종양 관해를 유발할 수 있다. 예를 들어, 종양이 있는 대상체에게 제공되는 치료는 완전 관해, 부분 관해, 안정적인 질병 또는 진행성 질병으로 이어질 수 있다. "완전 관해(CR)"는 모든 표적 병변이 사라지는 것을 지칭한다. "부분 관해(PR)"는 기준선 합계 직경을 기준으로 하여 표적 병변의 직경 합계에서 적어도 30% 감소를 지칭한다. "진행성 질병(PD)"은 연구에서 가장 작은 합계를 기준으로 하여 표적 병변의 직경 합계에서 적어도 20% 증가를 지칭한다(이는 연구에서 가장 작은 합계인 경우 기준선 합계를 포함한다). 20%의 상대적인 증가 외에도 합계는 최소 5 mm의 절대적인 증가도 보여야 한다. "안정적인 질병(SD)"은 연구 중 최소 합계 직경을 기준으로 하여 PR 자격을 갖기에 충분한 수축 또는 PD 자격을 얻기에 충분한 증가도 지칭하지 않는다. "관해 기간(DoR)"은 첫 번째 문서화된 관해(CR 또는 PR) 날짜부터 문서화된 진행 또는 관해 달성 후 사망 날짜까지의 시간으로 계산할 수 있다.
- [0021] 약물 또는 치료제의 "유효량"은 치료의 유익하거나 원하는 효과에 영향을 미치기에 충분한 양이다. 예를 들어, 유효량의 항-종양제는 T 세포 활성화를 원하는 수준으로 향상시키기에 충분한 양일 수 있다. 일부 구체예에서, 약물 또는 치료제의 유효성은 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 항-종양제의 효과는 RECIST(고형 종양 관해 평가 기준)에 의해 결정될 수 있다. 유효량은 하나 이상의 개별 투여 또는 용량으로 투여될 수 있다. 유효량은 하나의 제제와 단독으로 또는 하나 이상의 추가 제제와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0022] 본원에 사용된 "항체"는 전체 항체 또는 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원-결합 도메인") 또는 이의 단일쇄를 포함한다. 전체 항체는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 도메인(V_H 또는 HCVR) 및 중쇄 불변 영역(C_H)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 의 3개 도메인으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 도메인(V_L 또는 LCVR) 및 경쇄 불변 영역(C_L)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아마노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원(예를 들어, PD-L1)과

상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포)와 고전적 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하여 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 선택적으로 매개할 수 있다.

[0023] 본원에 사용된, 항체의 "항원-결합 도메인" 또는 "항원-결합 단편"은 항원(예를 들어, HER2)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 단편"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_H , V_L , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H , V_L , C_L 및 C_{H1} 도메인과 C_{H1} 과 C_{H2} 도메인 사이의 영역을 구성하는 Fab'; (iv) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 Fd 단편; (v) 항체 단일 암의 V_H 및 V_L 도메인으로 구성된 단일 사슬 Fv 단편; (vi) V_H 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward et al., 1989); 및 (vii) 합성 링커에 의해 선택적으로 연결될 수 있는 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합; (viii) 짧은 링커를 사용하여 동일한 폴리펩타이드 사슬에 연결된 V_H 및 V_L 을 포함하는 "디아바디"(예를 들어, 특허 문서 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Holliger et al., 1993 참조); (ix) V_H 또는 V_L 만을 함유하는 "도메인 항체 단편"(여기서 일부 경우에는 2개 이상의 V_H 영역이 공유 결합됨)을 포함한다.

[0024] 항체는 다클론성 또는 단클론성; 이종, 동종 또는 동계; 또는 이의 변형된 형태(예: 인간화, 키메라 또는 다중 특이적)일 수 있다. 항체는 또한 완전한 인간일 수 있다. 항체와 관련하여 본원에 사용된 용어 "효과기 기능"은 항체 이소타입에 따라 달라지는 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 포식작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원제시세포에 의한 면역 복합체 매개 항원 흡수, 하향 조절 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체) 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0025] 본원에 사용된 용어 "리포칼린"은 복수의(바람직하게는 4개) 루프에 의해 일 말단에 쌍으로 연결되어 리간드-결합 포켓을 포함하고, 리간드-결합 포켓으로의 입구로 지정된 복수의 β -가닥(바람직하게는, A에서 H로 지정된 8개의 β -가닥)을 포함하는 실린더형 β -주름 시트 초2차 구조 영역을 갖는 대략 18-20 kDa 중량의 단량체 단백질을 지칭한다. 바람직하게는, 본 발명에 사용된 리간드-결합 포켓을 포함하는 루프는 β -가닥 A 및 B, C 및 D, E 및 F, 그리고 G 및 H의 열린 말단을 연결하는 루프이며, 루프 AB, CD, EF 및 GH로 지정된다. 그렇지 않으면 단단한 리포칼린 스캐폴드에서 상기 루프의 다양성은 리포칼린 패밀리 구성원 사이에서 다양한 결합 모드를 발생시키며, 각각은 다양한 크기, 모양 및 화학적 특성의 표적을 수용할 수 있다(예를 들어 Skerra, 2000, Flower et al., 2000, Flower, 1996에서 검토됨). 단백질의 리포칼린 패밀리는 매우 낮은 수준의 전체 서열 보존(종종 20% 미만의 서열 동일성을 가짐)을 공유하면서도 고도로 보존된 전체 폴딩 패턴을 유지하면서 광범위한 리간드에 결합하도록 자연적으로 진화한 것으로 이해된다. 다양한 리포칼린에서 위치 간의 대응은 또한 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 7,250,297 참조). 본원에 사용된 "리포칼린"의 정의에 속하는 단백질은 눈물 리포칼린(Tlc, Lcn1), 리포칼린-2(Lcn2) 또는 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린(NGAL), 아포지단백 D(ApoD), 아포지단백 M, α_1 -산 당단백 1, α_1 -산 당단백 2, α_1 -마이크로글로불린, 보체 성분 8 γ , 레티놀 결합 단백질(RBP), 부고환 레티노산 결합 단백질, 글리코델린, 부취제(odorant)-결합 단백질 IIa, 부취제-결합 단백질 IIb, 리포칼린-15(Lcn15) 및 프로스타글란딘 D 합성효소를 포함하는 인간 리포칼린을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본원에 사용된 "리포칼린-2" 또는 "호중구 젤라티나제 관련 리포칼린"은 인간 리포칼린-2(hLcn2) 또는 인간 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린(hNGAL)을 지칭하고, 추가로 성숙한 인간 리포칼린-2 또는 성숙한 인간 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린을 지칭한다. 단백질을 특성화하기 위해 사용될 때 용어 "성숙"은 신호 펩타이드가 본질적으로 없는 단백질을 의미한다. 본 개시내용의 "성숙 hNGAL"은 신호 펩타이드가 없는 성숙한 형태의 인간 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린을 지칭한다. 성숙한 hNGAL은 수탁 번호 P80188로 SWISS-PROT Data Bank에 기록된 서열의 잔기 21-198로 기술되며, 아미노산은 SEQ ID NO: 1에 표시되어 있다.

[0027] 본원에 사용된 "천연 서열"은 이의 제조 방식에 관계없이 자연에서 발생하거나 야생형 서열을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 이러한 천연 서열 단백질 또는 폴리펩타이드는 자연으로부터 분리될 수 있거나 재조합 또는 합성 방법과 같은 다른 수단에 의해 생산될 수 있다.

[0028] "천연 서열 리포칼린"은 자연 유래의 해당 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 리포칼린을 지칭한다.

따라서, 천연 서열 리포칼린은 임의의 유기체, 특히 포유동물로부터 각각의 자연적으로 발생하는(야생형) 리포칼린의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 리포칼린의 맥락에서 사용될 때 용어 "천연 서열"은 구체적으로 리포칼린의 자연적으로 발생하는 절단 또는 분비 형태, 리포칼린의 대안으로 접합된 형태 및 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체와 같은 자연적으로 발생하는 변이체를 포함한다. 용어 "천연 서열 리포칼린" 및 "야생형 리포칼린"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0029] 본원에 사용된 "뮤테인", "돌연변이된" 개체(단백질 또는 핵산), 또는 "돌연변이체"는 자연적으로 발생하는(야생형) 단백질 또는 핵산과 비교하여 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 교환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 상기 용어는 또한 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인의 단편을 포함한다. 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같이, 4개의 루프에 의해 일 말단에 쌍으로 연결되어 리간드-결합 포켓을 포함하고, 리간드-결합 포켓으로의 입구로 지정된 8개의 β -가닥을 포함하는 실린더형 β -주름 시트 초2차 구조 영역을 갖는 리포칼린 뮤테인을 명시적으로 포함하되, 상기 4개의 루프 중 적어도 3개 각각의 적어도 하나의 아미노산은 천연 서열 리포칼린과 비교하여 돌연변이되어 있다. 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같이 4-1BB에 결합하는 기능을 갖는다.

[0030] 본 개시내용의 리포칼린 뮤테인과 관련하여 본원에 사용된 용어 "단편"은 N-말단 및/또는 C-말단이 절단된, 즉 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산 중 적어도 하나가 결여된 전장 성숙 hNGAL 또는 리포칼린 뮤테인으로부터 유래된 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 이러한 단편은 성숙 hNGAL의 1차 서열 또는 그것이 유도된 리포칼린 뮤테인의 10개 이상, 예를 들어 20개 또는 30개 이상의 연속 아미노산을 포함할 수 있고 일반적으로 성숙 hNGAL의 번역분석에서 검출가능하다. 이러한 단편에는 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산의 최대 2개, 최대 3개, 최대 4개, 최대 5개, 최대 10개, 최대 15개, 최대 20개, 최대 25개 또는 최대 30개(사이의 모든 숫자 포함)가 결여될 수 있다. 단편은 바람직하게는 성숙 hNGAL 또는 그것으로부터 유래된 리포칼린 뮤테인의 기능적 단편이며, 바람직하게는 그것이 성숙 hNGAL 또는 그것으로부터 유래된 리포칼린 뮤테인의 바람직하게는 4-1BB와의 결합 특이성을 보유한다는 것을 의미한다. 예시적인 예로서, 이러한 기능적 단편은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열에 상응하는 위치 13-157, 15-150, 18-141, 20-134, 25-134, 또는 28-134에서 적어도 아미노산을 포함할 수 있다.

[0031] 4-1BB 또는 HER2에 대한 "단편"은 N-말단 및/또는 C-말단이 절단된 4-1BB 또는 HER2 또는 4-1BB 또는 HER2의 단백질 도메인을 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같은 4-1BB 또는 HER2의 단편은 본 개시내용의 리포칼린 뮤테인, 항체 및/또는 융합 단백질에 의해 인식 및/또는 결합되는 전장 4-1BB 또는 HER2의 능력을 보유한다.

[0032] 본원에 사용된 "이중특이적"은 분자가 적어도 2개의 별개의 표적에 특이적으로 결합할 수 있음을 지칭한다. 전형적으로, 이중특이적 분자는 2개의 표적 결합 부위를 포함하며, 각각은 상이한 표적에 대해 특이적이다. 일부 구체예에서, 이중특이적 분자는 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있다.

[0033] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "접합하다", "접합", "융합하다", "융합" 또는 "연결된"은 모든 형태의 공유 또는 비공유 결합을 통해, 유전적 융합, 화학적 접합, 링커 또는 가교제를 통한 커플링, 및 비공유 결합을 포함하나 이에 제한되지 않는 수단에 의해 2개 이상의 서브유닛이 함께 연결하는 것을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 용어 "융합 폴리펩타이드" 또는 "융합 단백질"은 2개 이상의 서브유닛을 포함하는 폴리펩타이드 또는 단백질을 지칭한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 바와 같은 융합 단백질은 2개 이상의 서브유닛을 포함하고, 이들 서브유닛 중 적어도 하나는 4-1BB에 특이적으로 결합할 수 있고, 추가 서브유닛은 HER2에 특이적으로 결합할 수 있다. 융합 단백질 내에서, 이러한 서브유닛은 공유 또는 비공유 결합에 의해 연결될 수 있다. 바람직하게는, 융합 단백질은 2개 이상의 서브유닛 사이의 번역적 융합이다. 번역적 융합은 판독 프레임의 한 서브유닛에 대한 코딩 서열을 추가 서브유닛의 코딩 서열과 유전적으로 조작함으로써 생성될 수 있다. 두 서브유닛 모두 링커를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 배치될 수 있다. 그러나, 본 개시내용의 융합 단백질의 서브유닛은 또한 화학적 접합을 통해 연결될 수 있다. 융합 단백질을 형성하는 서브유닛은 일반적으로 한 서브유닛의 C-말단이 다른 서브유닛의 N-말단에, 한 서브유닛의 C-말단이 다른 서브유닛의 C-말단에, 또는 한 서브유닛의 N-말단이 다른 서브유닛의 N-말단에, 또는 한 서브유닛의 N-말단이 다른 서브유닛의 C-말단에 서로 연결된다. 융합 단백질의 서브유닛은 임의의 순서로 연결될 수 있고 구성 서브유닛 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 하나 이상의 서브유닛이 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 단백질(복합체)의 일부인 경우, 용어 "융합 단백질"은 단백질(복합체)의 융합된 서열 및 다른 모든 폴리펩타이드 사슬(들)을 포함하는 단백질을 지칭할 수도 있다. 예시적인 예로서, 전장 면역글로불린이 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄를 통해 리포칼린 뮤테인에 융합되는 경우, 용어 "융합 단백질"은 면역 글로불린의 리포칼린 뮤테인 및 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 지칭할 수 있다. 용어 "융합 단백질"은 또한 전체 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 모두) 및 이의

중쇄 및/또는 경쇄 중 하나 또는 둘 모두에 융합된 리포칼린 뮤테인을 지칭할 수 있다.

- [0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질의 "서브유닛"이라는 용어는 단일 단백질 또는 별도의 폴리펩타이드 사슬을 지칭하며, 이는 그 자체로 안정한 폴딩 구조를 형성할 수 있고 표적에 대한 결합 모티프를 제공하는 독특한 기능을 정의할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시내용의 바람직한 서브유닛은 리포칼린 뮤테인이다. 일부 다른 구체예에서, 본 개시내용의 바람직한 서브유닛은 전장 번역글로불린 또는 이의 항원 결합 도메인이다.
- [0036] 본 개시내용의 융합 단백질에 포함될 수 있는 "링커"는 본원에 기재된 융합 단백질의 2개 이상의 서브유닛을 함께 연결한다. 연결은 공유 또는 비공유일 수 있다. 바람직한 공유결합은 아미노산 사이의 펩타이드 결합과 같은 펩타이드 결합을 통한 것이다. 바람직한 링커는 펩타이드 링커이다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 상기 링커는 하나 이상의 아미노산, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 아미노산을 포함한다. 글리신-세린(GS) 링커, 글리코실화된 GS 링커, 및 프롤린-알라닌-세린 중합체(PAS) 링커를 포함하는 바람직한 펩타이드 링커가 본원에 기재되어 있다. 다른 바람직한 링커는 화학적 링커를 포함한다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 그들의 유사성 또는 관계를 측정하는 서열의 특성을 나타낸다. 본 개시내용에서 사용된 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 본 개시내용의 단백질 또는 폴리펩타이드의 서열을 상응하는 서열과 (상동성) 정렬한 후 이 두 서열 중 더 긴 잔기의 수와 관련하여 쌍으로 동일한 잔기의 백분율을 의미한다. 서열 동일성은 동일한 아미노산 잔기의 수를 총 잔기의 수로 나누고 생성물에 100을 곱하여 측정한다. 숙련된 기술자는 사용 가능한 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 BLAST(Altschul et al., 1997), BLAST2(Altschul et al., 1990), FASTA(Pearson 및 Lipman, 1988), GAP(Needleman 및 Wunsch, 1970), Smith-Waterman(Smith 및 Waterman, 1981), 표준 매개변수를 사용하여 서열 동일성을 결정하는 Wisconsin GCG 패키지를 인식하고 있을 것이다. 서열 동일성의 백분율은 예를 들어, 2002년 11월 16일자 프로그램 BLASTP, 버전 2.2.5(Altschul et al., 1997)를 사용하여 정렬을 위해 선택된 총 아미노산 수로부터 "양성"(상동 아미노산)의 수의 백분율을 계산하여 본원에서 결정될 수 있다.
- [0038] "갭"은 아미노산의 추가 또는 삭제의 결과인 정렬의 공백이다. 따라서 정확히 동일한 서열의 두 카피는 100% 동일성을 갖지만 덜 보존되고 결실, 추가 또는 대체가 있는 서열은 서열 동일성의 정도가 더 낮을 수 있다.
- [0039] "샘플"은 임의의 대상체로부터 채취한 생물학적 샘플로 정의된다. 생물학적 샘플에는 혈액, 혈청, 소변, 대변, 정액 또는 종양 조직을 포함한 조직이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0040] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간이다. 용어 "포유동물"은 본원에서 인간, 가축 및 농장 동물, 동물원, 스포츠 또는 애완 동물(예를 들어, 양, 개, 말, 고양이, 소, 쥐, 돼지, 시노몰구스 원숭이와 같은 유인원)을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 지칭하기 위해 사용된다. 바람직하게는, 본원에 사용된 "포유동물"은 인간이다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 15% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 이내를 의미한다. 그것은 또한 구체적인 수를 포함한다. 즉, "약 20"은 20의 수를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "적어도 약"은 구체적인 수를 포함하며, 즉 "적어도 약 20"은 20을 포함한다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 "및", "또는", 및 "상기 용어에 의해 연결된 요소들의 전부 또는 임의의 다른 조합"의 의미를 포함한다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시 대상을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질(SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 50 및 53, SEQ ID NOs: 52 및 49, 및 SEQ ID NOs: 54 및 49), 레퍼런스 항체 SEQ ID NOs: 50 및 48, 및 양성 대조군 키홀 림프 헤모시아닌(KLH)의 시험관내 T 세포 면역원성 평가 결과를 제공한다. 32명의 공여자 및 전 세계 인구 분포를 반영하는 인간 백혈구 항원(HLA) 동종이형을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같은 PBMC 기반 형식을 사용하여 분석을 수행하였다. 도 1A는 자극 지수를 나타낸다(시험 물품의 존재 대 부재에서의 증식). 평균 관해는 막대로 표시된다. 응답 공여자를 정의하는 임계값(자극 지수 > 2)은 점선으로 표시된다. 도 2B는 각 시험 물품에 대한

응답자의 수를 보여준다.

도 2는 표적 의존적 방식으로 T 세포 활성화를 보조 자극하는 PRS-343의 세포 기반 활성을 보여준다. 정제된 인간 T 세포(도 2A) 또는 4-1BB 과발현-Jurkat NF- κ B 리포터 세포주(도 2B)는 PRS-343 존재하에서 HER2 발현 종양 세포주(NCI-N87(HER2 높음), MKN45(HER2 낮음) 및 HepG2(HER2 null))와 또는 종양 세포 없이 공동-배양되었다. HER2-양성 세포주의 존재하에서, Jurkat NF- κ B 리포터 세포에서의 IL-2 또는 4-1BB 클러스터링 및 다운스트림 신호전달의 용량 의존적 유도가 PRS-343에 의해 관찰되었다. 여기에 묘사된 모든 데이터는 최소 2명의 다른 공여자와 함께 수행된 실험의 대표적인 예시이다. 통계 분석: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; 및 ***, $P < 0.001$, Dunnet 다중 비교 시험과 함께 일원 분산 분석을 사용한다.

도 3은 PRS-343의 1상, 오픈-라벨, 용량 증량 연구의 가속화된 적정 설계(도 3A) 및 전체 연구 설계(도 3B)를 보여준다.

도 4는 전체 연구 설계를 도시한다.

도 5는 0.015 mg/kg 내지 8 mg/kg 범위의 단일 용량(첫 번째 용량, 주기 1의 1일 투여) 후 기하 평균 PRS-343 혈청 농도-시간 프로파일을 보여준다. 8 mg/kg 플롯에는 코호트 11(8 mg/kg, Q3W) 및 11B(8 mg/kg, Q2W)의 환자가 모두 포함된다.

도 6은 코호트 1 내지 11B에 대한 약물 노출/약력학 관계를 나타낸다(0.0005 mg/kg Q3W 내지 8 mg/kg Q2W 범위의 용량 수준).

도 7은 PRS-343을 투여받는 환자의 전체 종양 조직(도 7A), 종양 기질(도 7B) 및 종양 세포(도 7C)에서의 CD8+T 세포 확장을 보여준다. CD8+T 세포의 증가는 저용량 코호트 1-8과 비교하여 연구의 코호트 9 이상(용량 수준 ≥ 2.5 mg/kg)의 환자에서 더 두드러진다.

도 8은 응답 환자 107-012에서 전체 종양 조직(도 8A), 종양 기질(도 8B), 및 종양 세포(도 8C)에서의 CD8+T 세포 확장을 보여준다. CD8+T 세포의 증가는 전체 종양 조직 또는 종양 기질보다 종양 세포에서 더 두드러진다.

도 9는 응답 환자 108-002에서 전체 종양 조직(도 9A), 종양 기질(도 9B) 및 종양 세포(도 9C)에서의 CD8+T 세포 확장을 보여준다. CD8+T 세포의 증가는 전체 종양 조직 또는 종양 기질보다 종양 세포에서 더 두드러진다.

도 10은 응답 환자 108-002에서 전체 종양 조직(도 10A), 종양 기질(도 10B), 및 종양 세포(도 10C)에서의 CD8+Ki67+ T 세포 확장을 보여준다. CD8+Ki67+ T 세포의 증가는 종양 세포에서만 관찰된다.

도 11: 코호트 9 내지 11(각각 2.5 mg/kg, 5 mg/kg 및 8 mg/kg, Q3W)에 비해 코호트 11B(8 mg/kg, Q2W)에서 PRS-343을 사용한 평균 처리 시간이 증가함을 보여준다.

도 12는 코호트 1 내지 11B(도 12A) 및 코호트 9 내지 11B(도 12B)에 대한 표적 병변의 최상의 관해를 도시한다.

도 13은 본원에 기재된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 설계에 대한 개요를 제공한다. 대표적인 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2에 특이적인 항체(예를 들어, SEQ ID NOs: 50 및 48에 제시된 항체) 및 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO: 22의 리포칼린 뮤테인)에 기초하여 만들어졌다. 하나 이상의 항-4-1BB 리포칼린 뮤테인은 N-말단 또는 C-말단에서 펩타이드 링커를 통해 항체 중쇄 도메인(HC)의 C-말단(도 13D), HC의 N-말단(도 13A), 항체 경쇄(LC)의 C-말단(도 13C), 및/또는 LC의 N-말단(도 13B)에서 항-HER2 항체에 유전적으로 융합되어 SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 50 및 53, SEQ ID NOs: 52 및 49, 및 SEQ ID NOs: 54 및 49와 같은 융합 단백질을 생성한다. 돌연변이 S228P, F234A 및 L235A가 있는 조작된 IgG4 백본은 융합 단백질에 포함된 것처럼 항-HER2 항체에 사용되었다.

도 14는 0.015 mg/kg에서 18 mg/kg 범위의 단일 용량(첫 번째 용량, 주기 1의 1일) 후 기하 평균 PRS-343 혈청 농도-시간 프로파일을 보여준다. 8 mg/kg 플롯에는 코호트 11(8 mg/kg, Q3W) 및 11B(8 mg/kg, Q2W)의 환자가 모두 포함된다. 12 mg/kg 플롯은 코호트 12B(12 mg/kg, Q2W)의 환자를 포함하고 18 mg/kg은 코호트 13B(18 mg/kg, Q2W)의 환자를 포함한다.

도 15는 비활성 용량 코호트 1-8 대 활성 용량 코호트 9-13B에서 환자의 전체 종양 조직(도 15A) 및 가용성 4-1BB(s4-1BB)의 혈청 수준(도 15B)에서의 CD8+T 세포 확장을 보여준다. 활성 용량의 PRS-343이 처리된 환자는 종양 조직 및 순환 s4-1BB에서 증가된 CD8+T 세포를 보여 PRS-343의 4-1BB 암(arm) 활성을 입증하였다.

도 16은 임상 상태(적용 가능한 경우)를 포함하여 코호트 11B, 11C, 12B, 13B 및 0bi+11B의 환자에 대한 처리 과정을 나타낸다.

도 17은 코호트 9, 10, 11, 11B, 11C, 12B, 13B 및 0bi+11B에 대한 표적 병변에서 최상의 관해를 도시한다.

도 18은 활성 용량 코호트에서 CD8+T 세포 확장(x-배수 유도) 대 표적 병변의 % 성장/수축을 보여준다. SD≥C6, PR 및 CR이 있는 환자는 CD8+T 세포의 적어도 2.3배 증가를 나타냈다.

도 19는 기준선, 치료 후 C2 및 치료 후 C6에서 응답 환자 103-021의 표적 병변(폐, 다크 서클 참조)의 CT 스캔을 보여준다. 환자는 완전 관해(CR)를 보였다.

도 20은 PRS-343의 4-1BB 암 활성을 나타내는 CR 환자 103-021의 전체 종양 조직에서 치료 후 CD8+T 세포 확장(도 20A) 및 혈청 내 순환 s4-1BB의 증가(도 20B)를 보여준다.

도 21은 기준선과 치료 후 C4에서 응답 환자 107-012의 표적 병변(다크 서클 참조)의 CT 스캔을 보여준다. 환자는 부분 관해(PR)를 보였다.

도 22는 PRS-343의 4-1BB 암 활성을 나타내는 PR 환자 107-012의 전체 종양 조직에서 치료 후 CD8+T 세포 및 CD8+Ki67+ T 세포 확장(도 22A) 및 혈청 내 순환 s4-1BB의 증가(도 22B)를 보여준다.

도 23은 다중 처리 주기의 과정에 걸쳐 PR 환자 103-012의 혈청에서 순환 s4-1BB의 반복된 증가를 나타낸다.

도 24는 'PD & SD<C6' 및 'CR, PR & SD>C6' 환자로 분할된 활성 코호트 환자의 전체 종양 조직에서 CD8+T 세포의 처리 전 절대 수(도 24A) 및 활성 용량 코호트의 개별 응답 환자에 대한 전체 면역 세포의 %PD-L1+ 세포(IC 점수) 대 CD8+T 세포의 처리 전 절대 수의 플롯(도 24B)을 보여준다. PRS-343은 PD-L1 저/음성 환자와 요법 전에 CD8+T 세포 수가 적은 환자에서 임상적 이점을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 4-1BB는 보조자극 면역 관문 및 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 패밀리의 구성원이다. 이는 주로 활성화된 CD4+ 및 CD8+T 세포, 활성화된 B 세포 및 자연 살해(NK) 세포에서 발현되며 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 한다. 4-1BB의 클러스터링은 수용체의 활성화 및 다운스트림 신호전달을 유도한다(Yao et al., 2013, Snell et al., 2011). T 세포 수용체(TCR)가 동족 주조직 적합성 복합체(MHC) 표적에 결합함으로써 미리 자극된 T 세포에서 4-1BB를 통한 보조자극은 향상된 활성화, 생존 및 증식 뿐만 아니라 전염증(pro-inflammatory) 사이토카인의 생성 및 개선된 사멸 능력을 유발한다(Dawicki and Watts, 2004, Lee et al., 2002).
- [0046] 수용체 클러스터링이 필요한 4-1BB 활성화 모드에 맞춰, 항-4-1BB 항체와 같은 단일특이적 4-1BB-표적화제는 그 자체로 4-1BB를 클러스터링하고 효율적인 활성화를 유도하는 데 효율적이지 않을 수 있다. 또한, 단일특이적 4-1BB-표적화제는 4-1BB의 발현이 종양 침윤 림프구에 국한되지 않기 때문에 비국소화된 4-1BB 클러스터링 및 활성화를 유발할 수 있다(Makkouk et al., 2016, Alizadeh et al., 2011). TNFR 계열 구성원에 대한 최근 연구는 또한 항체가 Fc 영역을 통해 Fc-감마 수용체와 상호작용하고, 활성화 Fc-감마 수용체-발현 면역 세포와 결합하며, 후속 항종양 활성을 촉진하는 항-TNFR 항체의 기전을 설명함으로써(Bulliard et al., 2014, Bulliard et al., 2013), 항-4-1BB 항체가 Fc-감마 수용체 양성 세포의 풍부함에 따라 4-1BB 클러스터링을 유발할 수 있지만 종양 미세환경에 국한되지 않음을 시사한다.
- [0047] 따라서, 효능 및 독성은 사실상 항-4-1BB 단일요법의 주요 관심사이다. 2개의 작용제 항체, 우렐루맵(ureluma b)과 우토밀루맵(utomilumab)의 진행 중인 임상 시험은 상당한 도전을 제시한다. 우렐루맵은 1 mg/kg 이상의 용량에서 상당한 독성을 가지며 0.1 mg/kg에서만(3주마다) 안전한 것으로 입증되었다. 그러나 저용량 우렐루맵 단일요법의 임상 효능 결과는 대체로 효과가 없었고 허용 용량에서 우렐루맵의 임상 활성이 제한되었다(Massarelli et al., 2016, Segal et al., 2017). 우토밀루맵은 더 높은 용량(4주마다 최대 10 mg/kg)에서 허용되지만 우렐루맵에 비해 덜 강력한 4-1BB 작용제이며 잠재적인 효능 문제를 갖는다(Tolcher et al., 2017, Chester et al., 2018, Segal et al., 2018).
- [0048] 그러므로, 효과적이고 안전한 4-1BB-표적화 치료제에 대한 충족되지 않은 요구가 있다. 이상적인 4-1BB-표적화제는 4-1BB의 클러스터링을 유도해야 하며, 안전성 위험을 최소화하기 위해 종양 침윤 림프구에서 종양 국소 방식으로 그렇게 해야 한다. 이러한 4-1BB-표적화제는 종양 특이적 CD8+T 세포에 관여할 수 있어야 하므로 내성 용량 수준에서 효능이 달성될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 이러한 4-1BB-표적화제를 수득하기 위해, 이중특이적 제제는 한쪽 말단에 4-1BB를, 다른 말단에 차등적으로 발현되는 종양 표적을 표적화하도록 설계될 수

있다.

- [0049] 이와 관련하여 HER2는 광범위한 종양 유형에 걸쳐 임상적으로 검증된 표적이다. HER2 유전자의 증폭과 그 산물의 과발현은 유방암, 방광암, 위암, 위식도암, 결장직장암 및 담도암을 비롯한 다양한 유형의 암의 발달 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. HER2에 대한 단클론 항체인 트라스투주맙(trastuzumab)과 같은 항-HER2 요법은 초기 병기 또는 전이성 HER2 양성(HER2+) 유방암 환자에게 상당한 임상적 이점을 제공한다. 그러나 전이성 질병을 가진 많은 환자들은 치료에 반응하지 않거나 불응성 질병으로 발전하고 일부 환자들은 질병 재발을 겪는다. 예를 들어, 전이성 환경에서 트라스투주맙 단일요법은 11-26%의 반응률을 나타내며(임상 이익률: 48%), 이는 많은 HER2+ 종양이 단일요법에 반응하지 않을 것임을 암시한다(Vogel et al., 2002). 한편, HER2 이외의 바이오마커는 HER2 양성 유방암에서 항-HER2 요법을 위한 환자 선택에 대한 임상적 유용성을 입증하지 않았으며 반응 또는 내성의 바이오마커는 아직 임상적으로 검증되지 않았다.
- [0050] 따라서, HER2-양성 암 환자에 대한 더 나은 표적 요법에 대한 필요성이 남아 있다. 또한 유리한 환자 집단 및 유익한 임상 결과와 관련된 바이오마커를 식별할 필요성이 남아 있다.
- [0051] 본 개시내용은 4-1BB 표적화제를 포함하는 신규 요법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 4-1BB 표적화제는 적어도 2개의 결합 도메인을 갖는 융합 단백질을 포함하되, 하나의 결합 도메인은 4-1BB에 특이적으로 결합하도록 조작된 리포칼린 뮤테인 및 HER2에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 결합 도메인을 포함한다.
- [0052] 전술한 바와 같이, 리포칼린 뮤테인은 4개의 루프에 의해 일 말단에 쌍으로 연결된 8개의 β -가닥을 포함하는 실린더형 β -주름 시트 초2차 구조 영역을 갖는다. 이 루프는 리간드 결합 포켓을 포함하고 리간드 결합 포켓의 입구를 정의한다. 리포칼린의 결합 포켓을 형성하는 루프 영역을 항체의 6개 상보성 결정 영역(CDR)과 비교하였다. 항체와 유사하게 루프 영역은 표적 결합 특이성을 부여하고 이 영역을 돌연변이시키면 리포칼린의 결합 특성을 변경할 수 있다. 생성된 뮤테인은 때때로 "안티칼린"이라고 하며, 안티칼린 기술은 문헌에 설명되어 있다 (Skerra(2000 Biochim Biophys Acta (1482) 337-350, WO 03/029462A1; Pieris Proteolab AG, 및 Schonfeld et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 8198-8203 참조).
- [0053] 본 개시내용은 리간드-결합 포켓의 4개의 루프 영역 내에 특정 돌연변이를 포함하여 결과적으로 비천연 표적(예를 들어, 4-1BB)에 대한 결합 특이성을 갖는 뮤테인이 생성되는 이중특이적 융합 단백질의 일부로서, 리포칼린 뮤테인을 제공한다.
- [0054] 본 발명자들은 4-1BB(비-천연 표적)에 대한 결합을 부여하기 위해 루프 영역 내에 돌연변이의 특정 세트를 도입함으로써 리포칼린을 조작할 수 있음을 보여주었다(WO 2016/177762 참조, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 추가로, 상기 리포칼린 뮤테인은 융합 형식으로 포함되되, 융합체는 4-1BB 및 HER2의 동시 결합이 가능한 것으로 나타났다(WO 2016/177802 참조, 이는 본원에 참조로 포함됨). 본 개시내용은 인간 환자에서 HER2+ 종양을 치료하기 위한 약학적 조성물에서의 상기 4-1BB/HER2 융합 단백질의 용도, 및 임상 결과를 달성하기 위한 특정 치료 방법을 제공한다.
- [0055] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 바와 같은 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2+ 종양 세포 및 4-1BB 발현 T 세포를 근접하게 만들고 4-1BB 클러스터링 및 신호전달을 촉진하기 위해, HER2 신호전달을 억제하기 위해, 국소 면역 활성화를 제공하는 종양 항원 특이적 T 세포에 보조자극 신호를 전달하며, 및 종양 세포 사멸 및 종양 파괴를 촉진하도록 구상된다.
- [0056] 본원에 기재된 바와 같이, PRS-343은 4-1BB-양성 T 세포를 HER2+ 종양 세포와 연결하여 4-1BB 클러스터링을 촉진함으로써 종양 항원-특정 T 세포에 강력한 보조자극 신호를 제공하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질이다. PRS-343은 HER2 의존적 방식으로 종양에서 CD137 활성화를 국소화하도록 설계되었다. PRS-343의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시되어 있다.
- [0057] 본 개시내용은 PRS-343의 안전성 및 효능을 평가하기 위해 HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양을 갖는 환자에서 수행된 PRS-343의 최초의 인간 1상 연구를 제공한다. PRS-343 투여 후, 약동학(PK) 프로파일, 약력학(PD) 효과 및 PK/PD 상관관계가 결정되었다.
- [0058] 본원에 제시된 연구 결과에 기초하여, 본 개시내용은 예를 들어 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 예컨대 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을

제공한다.

- [0059] 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명자들은 리포칼린 결합 도메인 및 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 사용하여 안전하고 효과적이며 HER2+ 종양을 앓고 있는 환자에서 놀랍게도 유의한 임상 결과를 달성하는 새로운 치료 방법을 발견하였다. 본 개시내용은 약학적 조성물로 투여되는 기술된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질이 일반적으로 면역 요법에 반응하지 않는 종양 유형을 포함하여 다수의 종양 유형에 걸쳐 과도하게 사전에 치료받은 환자 집단에서 지속적인 항종양 활성을 나타냄을 입증한다.
- [0060] 추가로, 본 발명자들은 치료 전에 종양 조직에서 더 적은 수의 CD8+ T 세포를 갖는 환자가 본원에 기재된 치료 요법에 따라 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료에 반응함을 발견함으로써, 환자가 다른 관문 약물에 반응하지 않는 경우 개선된 대체 치료 표준을 제안한다.
- [0061] 본 개시내용은 예를 들어 전체 종양 조직에서 CD8+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가; 종양 세포에서 CD8+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가; 전체 종양 조직에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가; 종양 세포에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가; 측정된 면적 mm²당 약 500개 미만의 처리전 수준으로부터 CD8+ T 세포의 증가이되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며; 혈청 내 가용성 4-1BB(s4-1BB) 수준의 증가; 표적 병변에서 적어도 30% 감소; 안정적인 질병; 부분 관해; 및 완전 관해를 포함하는 임상 결과를 달성하는데 있어서 인간에서의 효과를 입증한다.
- [0062] 방법은 무엇보다도, 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg 범위의 용량으로 개시된 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 개시된 조성물은 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 3주마다 1회 투여될 수 있다.
- [0063] **A. 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질**
- [0064] 일부 구체예에서, 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 임의의 순서로 2개 이상의 서브유닛을 함유한다: (1) HER2에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 서브유닛, 및 (2) 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인을 포함하는 제2 서브유닛(도 4).
- [0065] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 적어도 하나의 추가 서브유닛, 예를 들어, 제3 서브유닛을 함유한다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 융합 단백질은 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인을 포함하는 제3 서브유닛을 함유한다.
- [0066] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 적어도 하나의 서브유닛은 이의 N-말단 및/또는 이의 C-말단에서 또 다른 서브유닛에 융합된다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 적어도 하나의 서브유닛은 링커를 통해 또 다른 서브유닛에 융합된다. 본원에 기재된 바와 같은 링커는 펩타이드 링커, 예를 들어 구조화되지 않은 글리신-세린(GS) 링커, 글리코실화된 GS 링커, 또는 프롤린-알라닌-세린 중합체(PAS) 링커일 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NO: 4에 제시된 바와 같은 (Gly₄Ser)₃ 링커((G4S)₃)가 사용된다. 다른 예시적인 링커는 SEQ ID NOs: 5-14에 제시되어 있다.
- [0067] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 제2 서브유닛은 이의 N-말단에서 링커, 바람직하게는 (G₄S)₃ 링커를 통해 제1 서브유닛에 포함된 항체 또는 이의 항원-결합 도메인의 중쇄 불변 영역(CH)의 C-말단의 각각에 연결된다(도 4D).
- [0068] 일부 구체예에서, 리포칼린 뮤테인 서브유닛은 펩타이드 링커를 통해 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 항체 서브유닛에 융합된다. 일부 구체예에서, 리포칼린 뮤테인 서브유닛은 펩타이드를 통해 이의 N-말단 또는 이의 C-말단, 항체 중쇄(HC)의 C-말단, HC의 N-말단, 항체 경쇄(LC)의 C-말단, 및/또는 LC의 N-말단(도 4)에서 항체 서브유닛에 융합된다. 일부 바람직한 구체예에서, 리포칼린 뮤테인 서브유닛은 펩타이드 링커, 바람직하게는 (G₄S)₃ 링커를 통해 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 항체 서브유닛의 각각의 HC에 그것의 N-말단에서 융합된다(도 4D).
- [0069] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함한다.
- [0070] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 제1 서브유닛에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인의 Fc 영역의 Fc 기능은 보존된다. 따라서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 4-1BB 및 HER2와 동시에 결합하면서 동시에 Fc 수용체-양성 세포에 결합할 수 있다. 일부 다른 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 제1 서브유닛에 포함된 항체의 Fc 영역 또는 이의 항원 결합 도메인의 Fc

기능은 감소되거나 완전히 억제되는 한편, 융합 단백질은 동시에 4-1BB 및 HER2와 결합한다. 일부 구체예에서, 이는 예를 들어, IgG4가 IgG1에 비해 감소된 Fc-감마 수용체 상호작용을 나타내는 것으로 공지되어 있기 때문에, IgG1 백본에서 IgG4로의 전환에 의해 달성될 수 있다. 일부 구체예에서, Fc-감마 수용체에 대한 잔기 결합을 추가로 감소시키기 위해, 돌연변이가 F234A 및 L235A와 같은 IgG4 백본 내로 도입될 수 있다. 일부 구체예에서, S228P 돌연변이는 또한 IgG4 반쪽 항체의 교환을 최소화하기 위해 IgG4 백본 내로 도입될 수 있다 (Silva et al., 2015). 일부 구체예에서, F234A 및 L235A 돌연변이는 감소된 ADCC 및 ADCP(Glaesner et al., 2010)를 위해 및/또는 M428L 및 N434S 돌연변이 또는 M252Y, S254T 및 T256E 돌연변이는 연장된 혈청 반감기를 위해(Dall'Acqua et al. al., 2006, Zalevsky et al., 2010) 도입될 수 있다. 일부 구체예에서, 추가 N297A 돌연변이는 천연 글리코실화 모티프를 제거하기 위해, 제공된 CD137/HER2 이중특이적 융합 단백질의 항체 중쇄에 존재할 수 있다.

[0071] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및/또는 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.

[0072] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 SEQ ID NO: 46에 제시된 중쇄 가변 영역(HCVR) 및/또는 SEQ ID NO: 47에 제시된 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.

[0073] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 SEQ ID NO: 49에 제시된 중쇄 및/또는 SEQ ID NO: 50에 제시된 경쇄를 포함한다.

[0074] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 SEQ ID NO: 46에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 더 높은 서열 동일성을 갖는 HCVR, 및/또는 SEQ ID NO: 47에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 더 높은 서열 동일성을 갖는 LCVR을 갖는다. 다른 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 더 높은 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및/또는 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 더 높은 서열 동일성을 갖는 경쇄를 갖는다.

[0075] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 항-HER2 항체이다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 트라스투주맙이다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결합 도메인은 IgG4 백본을 갖는 트라스투주맙이다.

[0076] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 4-1BB에 대한 결합 특이성을 갖는 성숙한 인간 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린(hNGAL)의 뮤테인이다. 성숙한 hNGAL의 뮤테인은 본원에서 "hNGAL 뮤테인"으로 지정될 수 있다.

[0077] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 항-CD3 항체와 함께 플라스틱 접시에 고정될 때 높은 친화성으로 인간 4-1BB에 결합하고/하거나 인간 T 세포를 보조자극할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NOs: 21-39 또는 이의 단편 또는 변이체로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NOs: 21-39로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 더 높은 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질에 포함된 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 더 높은 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

- [0078] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 4-1BB-특이적 hNGAL 뮤테인을 가요성 비-면역원성 펩타이드 링커에 의해 연결된 트라스투주맙 IgG4 변이체에 유전적으로 융합함으로써 생성된다.
- [0079] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 50 및 53, SEQ ID NOs: 52 및 49, 및 SEQ ID NOs: 54 및 49로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0080] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 50 및 53, SEQ ID NOs: 52 및 49, 및 SEQ ID NOs: 54 및 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 더 높은 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질이 1개 초과인 아미노산 사슬을 포함하는 경우, 서열 동일성에 대한 주어진 값은 두 아미노산 사슬 모두에서 아미노산 잔기의 수에 의해 정규화된 평균 서열 동일성에 관한 것이다. 예를 들어 융합 단백질이 100개의 아미노산을 갖는 아미노산 사슬 A 및 50개의 아미노산을 갖는 아미노산 사슬 B로 구성되고, 및 또 다른 융합 단백질은 아미노산 사슬 A와 80% 서열 동일성을 갖는 100개의 아미노산을 갖는 아미노산 사슬 A' 및 50개의 아미노산과 아미노산 사슬 B와 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 사슬 B'로 구성되는 경우, 두 융합 단백질 사이의 평균 서열 동일성은 $(100/(100+50)) \times 80\% + (50/(100+50)) \times 95\% = 85\%$ 서열 동일성이 될 것이다. 일부 바람직한 구체예에서, 융합 단백질이 하나 이상의 아미노산 사슬을 포함하는 경우, 서열 동일성에 대한 주어진 값은 목적 단백질이 1개의 사슬에 대해 적어도 주어진 서열 동일성 값을 갖는 아미노산 서열을 포함함을 의미한다. 이중특이적 융합 단백질은 이중특이적 융합 단백질의 다른 사슬에 대해 적어도 주어진 값의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0081] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2 및 4-1BB를 동시에 결합할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질은 HER2-의존적 방식으로 4-1BB 클러스터링 및 신호전달을 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질은 HER2-양성 종양 미세환경에서 CD137 신호전달을 활성화할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질은 HER2-양성 종양 미세환경에서 T 세포 반응을 보조자극하고/거나 T 세포 기능을 향상시킬 수 있다.
- [0082] 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠(chain) 및 SEQ ID NO: 51에 나타난 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠를 포함한다.
- [0083] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2+ 종양 세포의 존재 하에 T 세포 반응을 자극할 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2+ 종양 세포의 존재 하에서 IL-2 생산을 유도할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합은 약 35 pmol/L의 효능(EC₅₀)으로 HER2-양성 NCI-N87 세포의 존재하에서 IL-2 생산을 유도한다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 HER2+ 종양 세포의 존재하에서 4-1BB 클러스터링 및 다운스트림 신호전달을 유도할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합은 약 50 pmol/L의 효능(EC₅₀)을 갖는 HER2-양성 세포의 존재하에서 Jurkat NF-α 리포터 세포주에서 4-1BB 클러스터링 및 다운스트림 신호전달을 유도한다. 종양 세포의 존재하에서 제공된 융합 단백질에 의한 T 세포 반응의 자극은 예를 들어 실시예 1에 기본적으로 기재된 시험관내 T 세포 활성화 분석에서 평가될 수 있다.
- [0084] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 하나 이상의 항종양 효과를 가질 수 있다. 하나 이상의 항종양 효과는 표적 병변의 감소, 종양 크기의 감소, 종양 성장 억제, 종양 재발 지연, 및/또는 개선된 전체 생존율일 수 있다.
- [0085] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 표적 병변을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 병변은 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100%로 감소될 수 있다.
- [0086] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 바람직하게는 종양 미세환경에서 정맥내 투여 후 대상체에서 CD8+T 세포 확장을 자극할 수 있다.

일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 CD8+T 세포의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체의 CD8+T 세포 수는 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수로 증가될 수 있다. CD8+T 세포 수는 측정된 면적의 mm²당 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 1000개, 또는 훨씬 더 많이 증가할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체의 CD8+T 세포 수는 측정된 면적의 mm²당 약 500개 미만, 약 250개 미만, 약 100개 미만, 약 50개 미만의 세포의 처리전 수준으로부터 증가할 수 있다. 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 세포 또는 종양 기질일 수 있다. CD8+T 세포의 증가는 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질에서보다 종양 세포에서 더 두드러질 수 있다.

[0087] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 바람직하게는 종양 미세환경에서 정맥내 투여 후 대상체에서 CD8+Ki67+ T 세포 증식 및/또는 확장을 자극할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 CD8+Ki67+ T 세포의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. CD8+Ki67+ T 세포의 증가는 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질에서보다 종양 세포에서 더 두드러질 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체의 CD8+Ki67+ T 세포 수는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수만큼 증가될 수 있다.

[0088] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서, 바람직하게는 종양 미세환경에서 종양 침윤 림프구(TIL) 증식 및/또는 확장을 자극할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체에서 TIL의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체의 TIL은 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수로 증가될 수 있다. TIL의 증가는 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질에서보다 종양 세포에서 더 두드러질 수 있다. TIL은 CD8+T 세포, CD4+ T 세포, 자연 살해 세포 및 B 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0089] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 바이오마커 수준의 변화를 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질은 대상체에서 바이오마커의 수준을 감소시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질은 대상체에서 바이오마커의 수준을 증가시킬 수 있다. 바이오마커는 예를 들어 CD4, CD8, PD-L1, Ki67, (가용성) CD137(4-1BB), HER2, IL-8, 및 FoxP3일 수 있다.

[0090] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 가용성 4-1BB(s4-1BB)의 수준을 증가시킬 수 있다. 일부 구체예에서, s4-1BB는 순환하는 s4-1BB이다. 일부 구체예에서, s4-1BB의 수준은 대상체의 혈청에서 증가된다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체에서 s4-1BB의 수준은 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10 또는 훨씬 더 많은 배수만큼 증가될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체에서 s4-1BB의 수준은 약 500 이상, 약 1000 이상, 약 2000 이상, 약 3000 이상, 약 4000 이상, 약 5000 이상, 약 6000 이상, 약 7000 이상, 약 8000 이상, 약 9000 이상, 약 10000 이상, 약 15000 이상, 또는 약 20000 pg/mL 이상의 혈청으로 증가될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체에서 s4-1BB의 수준은 약 500 이상, 약 1000 이상, 약 2000 이상, 약 3000 이상, 약 4000 이상, 약 5000 이상, 약 6000 이상, 약 7000 이상, 약 8000 이상, 약 9000 이상, 약 10000 이상, 약 15000 이상, 또는 약 20000 pg/mL 이상의 혈청으로 증가될 수 있다.

[0091] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 약 10시간 내지 약 110시간의 반감기를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 약 10시간 이상, 약 14시간 이상, 약 20시간 이상, 약 50시간 이상, 약 60시간 이상, 약 70시간 이상, 약 100시간 이상, 약 100시간 이상의 반감기 105시간, 적어도 약 110시간, 또는 그 이상의 반감기를 가질 수 있다. 특정 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 적어도 약 72시간의 반감기를 가질 수

있다. 특정 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 적어도 약 104시간의 반감기를 가질 수 있다. 반감기 값은 표준 편차를 고려하여 실시예 3에 제공된 데이터를 기반으로 한다.

[0092] 일부 구체예에서, 대상체에 정맥내 투여한 후 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 피크 혈청 농도(C_{max})는 약 $0.08 \mu\text{g/mL}$ 내지 약 $150 \mu\text{g/mL}$ 일 수 있다. C_{max} 값은 표준 편차를 고려하여 실시예 3에 제공된 데이터를 기반으로 한다.

[0093] 일부 구체예에서, 대상체에 정맥내 투여한 후 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 시간 경과에 따른 혈청 농도(AUC_{inf})는 약 $20 \mu\text{gxh/hmL}$ 내지 약 $24000 \mu\text{gxh/mL}$ 일 수 있다. AUC_{inf} 값은 표준 편차를 고려하여 실시예 3에 제공된 데이터를 기반으로 한다.

[0094] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 대상체, 예를 들어 인간과 같은 포유동물에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체는 HER2+ 진행성 또는 전이성 종양을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체는 위암(예를 들어, 위선암), 부인과암(예를 들어, 나팔관암, 자궁내막암 또는 난소암), 유방암, 폐암, 특히 비소세포폐암, 담낭암, 담관암종, 흑색종, 식도암, 위식도암(예를 들어, 위식도 접합부 암), 결장직장암, 직장암(예를 들어, 직장 선암), 대장암, 췌장암, 담도암, 타액관암, 방광암 및/또는 원발성 미상암을 가질 수 있다.

[0095] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 이전에 치료받은 대상체에게 투여될 수 있다. 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체는 이전에 HER2-표적화 약물, 4-1BB/4-1BBL 경로-표적화 약물, PD-1 신호전달 경로-표적화 약물, 및/또는 CTLA-4 신호전달 경로-표적화 약물로 치료받았을 수 있다. HER2-표적화 약물은 트라스투주맵(trastuzumab) 또는 퍼투주맵(pertuzumab)과 같은 항-HER2 항체일 수 있다. 4-1BB/4-1BBL 경로 표적 약물은 우렐루맵 또는 우토밀루맵과 같은 항-4-1BB 항체일 수 있다. 일부 구체예에서, 대상체는 이전에 PD-1 신호전달 경로-표적화 약물로 치료받은 적이 없다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 사용한 치료는 PD-1 신호전달 경로-표적화 약물을 사용한 (공동)치료를 포함하지 않는다. PD-1 신호전달 경로-표적화 약물은 니볼루맵, 펌브롤리주맵 또는 세미플리맵과 같은 항-PD-1 항체일 수 있다. CTLA-4 신호전달 경로-표적화 약물은 이필리무맵과 같은 항-CTLA-4 항체일 수 있다.

[0096] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 B 세포 고갈제로 사전-치료된 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, B 세포 고갈제는 항-CD20 항체, 예컨대 리툭시맵, 오비누투주맵, 오크렐리주맵 또는 벨투주맵일 수 있다.

[0097] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 오비누투주맵으로 사전 치료된 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 오비누투주맵은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 대상체에게 첫 번째 투여 전 약 7일에 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 오비누투주맵은 약 1000 mg 내지 약 2000 mg 의 용량으로 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 오비누투주맵은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 대상체에게 첫 번째 투여 전 7일 에 약 2000 mg 의 용량으로 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, 오비누투주맵은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 첫 번째 투여 전 7일 및 6일에 1000 mg 의 용량으로 대상체에게 투여된다.

[0098] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 어쥬번트로서 투여될 수 있다.

[0099] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 mm^2 종양 조직당 약 1000개 미만, 약 750개 미만, 약 500개 미만, 약 400개 미만, 약 400개 미만, 약 300개 미만, 약 250개 미만, 약 200개 미만, 약 150개 미만, 약 100개 미만, 약 90개 미만, 약 80개 미만, 약 70개 미만, 약 60개 미만, 약 50개 미만, 약 45개 미만, 약 40개 미만, 약 35개 미만, 또는 훨씬 더 적은 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 mm^2 종양 조직당 약 250개 미만의

CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. .

- [0100] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 전체 면역 세포의 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 또는 심지어 더 낮은 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0101] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 mm² 종양 조직당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준 및 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. .
- [0102] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 항-약물 항체(ADA)를 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, ADA는 제공된 융합 단백질을 약 0.05 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량 수준으로 정맥내 투여 후 대상체에서 검출될 수 있다. 일부 구체예에서, ADA는 약 0.05 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg 또는 그 이상의 용량 수준에서 제공된 융합 단백질의 정맥내 투여 후 대상체에서 검출될 수 있다. 일부 구체예에서, ADA는 제공된 융합 단백질의 제1 투여 후, 1회의 처리 주기 후, 2회의 처리 주기 후, 3회의 처리 주기 후, 또는 심지어 그 이후에 대상체에서 검출될 수 있다.
- [0103] 일부 다른 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥내 투여 후 대상체에서 ADA를 유도하지 않는다.
- [0104] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 0.0005 mg/kg, 약 0.0015 mg/kg, 약 0.005 mg/kg, 약 0.015 mg/kg, 약 0.05 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5.0 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg 또는 더 높은 용량 수준을 허용하는 유리한 안전성 프로파일을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5.0 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg 또는 더 높은 용량 수준을 허용할 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg 또는 더 높은 용량 수준을 허용할 수 있다.
- [0105] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 매주마다 약 1회, 2주마다 약 1회, 3주마다 약 1회 또는 4주마다 약 1회의 투여 스케줄을 허용하는 유리한 약동학적 특성을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 1주에 약 2회, 1주에 약 1회, 10일마다 약 1회, 2주마다 약 1회, 3주마다 약 1회, 4주마다 약 1회, 5주마다 약 1회, 매달 약 1회, 6주마다 약 1회, 7주마다 약 1회, 8주마다 약 1회 또는 2달마다 약 1회의 투여 스케줄을 허용할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 1주에 약 1회, 2주마다 약 1회, 또는 3주마다 약 1회의 투여 스케줄을 허용할 수 있다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 3주마다의 투여 스케줄과 비교하여 2주마다의 투여 스케줄에 따라 투여될 때 우수한 종양 관해, 예컨대, 더 긴 관해 기간을 제공할 수 있다.
- [0106] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0107] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg의 용량으로 2주마

다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 또는 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0108] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0109] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0110] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0111] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0112] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 융합 단백질의 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 혈청 농도를 초래하는 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 융합 단백질의 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 혈청 농도를 초래하는 용량은 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg 또는 약 27 mg/kg의 용량일 수 있다. 용량은 매주 약 1회, 2주마다 약 1회 또는 3주마다 약 1회의 간격으로 투여될 수 있다.

[0113] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 대상체에게 투여한 후 용량 제한 독성과 관련이 없다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여된 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg, 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여된 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg, 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여된 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다.

[0114] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 주입에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 정맥 주입에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0115] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 항종양제, 항감염제, 항염증제 및/또는 면역조절제로 사용될 수 있다.

[0116] 본 개시내용의 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 본원에 제공된 방법에서 사용될 수 있다.

[0117] **B. 본 개시내용의 방법**

- [0118] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 매주 1회, 2주마다 1회 또는 3주마다 1회 투여될 수 있다. 대상체는 위암(예를 들어, 위선암), 부인과암(예를 들어, 나팔관암, 자궁내막암 또는 난소암), 유방암, 폐암, 특히 비소세포폐암, 담낭암, 담관암종, 흑색종, 식도암, 위식도암(예를 들어, 위식도 접합부암), 결장직장암, 직장암(예를 들어, 직장 선암), 대장암, 췌장암, 담도암, 타액관암, 방광암 및/또는 원발성 미상암을 가질 수 있다.
- [0119] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 종양을 치료하는데 사용하기 위한 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 용도를 제공한다. SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 매주 1회, 2주마다 1회 또는 3주마다 1회 투여될 수 있다. 대상체는 위암(예를 들어, 위선암), 부인과암(예를 들어, 나팔관암, 자궁내막암 또는 난소암), 유방암, 폐암, 특히 비소세포폐암, 담낭암, 담관암종, 흑색종, 식도암, 위식도암(예를 들어, 위식도 접합부암), 결장직장암, 직장암(예를 들어, 직장 선암종), 대장암, 췌장암, 담도암, 타액관암, 방광암 및/또는 원발성 미상암을 가질 수 있다.
- [0120] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 정맥내 주입에 의해 투여하는 것을 포함한다.
- [0121] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 정맥내 주입에 의해 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 용도를 제공한다.
- [0122] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 의약의 제조를 위한 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 용도를 제공하되, 치료는 바람직하게는 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 정맥으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0123] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 대상체에게 투여된다.
- [0124] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 매주 약 1회, 약 2주마다 약 1회, 약 3주마다 약 1회, 또는 4주마다 약 1회 대상체에게 투여된다.
- [0125] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하는 것은 하나 이상의 항-종양 효과를 달성하기에 충분하다. 예를 들어, 융합 단백질의 투여는 표적 병변을 감소시키고, 종양 크기를 감소시키며, 종양 성장을 억제하고, 종양 재발을 지연시키고/시키거나 전체 생존을 개선시킬 수 있다.
- [0126] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 2주마다 약 1회 투여하는 것은 3주마다 약 1회 융합 단백질을 투여하는 것과 비교하여 우수한 임상적 관해, 예컨대 더 긴 관해기간을 달성한다.
- [0127] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 표적 병변이 감소된다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 표적 병변이 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 감소된다.
- [0128] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서, 바람직하게는 종양 미세환경에서

CD8+T 세포 증식 및/또는 확장을 초래한다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 CD8+T 세포의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 CD8+T 세포 수는 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 10 또는 더 많은 배수로 증가한다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 CD8+T 세포 수는 측정된 면적 mm^2 당 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 1000개, 또는 더 많이 증가한다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 CD8+T 세포 수는 측정된 면적 mm^2 당 약 500개 미만, 약 250개 미만, 약 100개 미만, 약 50개 미만 또는 더 낮은 처리전 수준으로부터 증가한다. 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 세포 또는 종양 기질일 수 있다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체의 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질보다 종양 세포에서 CD8+T 세포의 더 현저한 증가가 유발된다.

[0129] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체, 바람직하게는 종양 미세환경에서 CD8+Ki67+ T 세포 증식 및/또는 확장이 유발된다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 CD8+Ki67+ T 세포의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질보다 종양 세포에서 CD8+Ki67+ T 세포의 더 현저한 증가가 초래된다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 CD8+Ki67+ T 세포 수는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 10, 또는 더 많은 배수로 증가될 수 있다.

[0130] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체, 바람직하게는 종양 미세환경에서 종양-침윤성 림프구(TIL) 증식 및/또는 확장이 유발된다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질이 투여된 대상체에서 TIL의 증가는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수로 TIL이 증가한다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체의 전체 종양 조직 및/또는 종양 기질에서보다 종양 세포에서 TIL이 더 현저하게 증가한다.

[0131] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 바이오마커 수준이 감소하거나 증가한다. 바이오마커는 예를 들어, CD4, CD8, PD-L1, KI67, (가용성) CD137 (4-1BB), HER2, IL-8 및 FOXP3일 수 있다.

[0132] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 가용성 4-1BB(s4-1BB)의 수준이 증가한다. 일부 구체예에서, s4-1BB는 순환하는 s4-1BB이다. 일부 구체예에서, s4-1BB의 수준은 대상체의 혈청에서 증가된다. 일부 구체예에서, s4-1BB의 수준은 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10 또는 훨씬 더 많은 배수로 증가될 것이다. 일부 구체예에서, s4-1BB의 수준은 약 500 이상, 약 1000 이상, 약 2000 이상, 약 3000 이상, 약 4000 이상, 약 5000 이상, 약 6000 이상, 약 7000 이상, 약 8000 이상, 약 9000 이상, 약 10000 이상, 약 15000 이상, 또는 약 20000 pg/mL 이상의 혈액 혈청의 농도로 증가될 수 있다. 일부 구체예에서 S4-1BB 수준은 약 500 이상, 약 1000 이상, 약 2000 이상, 약 3000 이상, 약 4000 이상, 약 5000 이상, 약 6000 이상, 약 7000 이상, 약 8000 이상, 약 9000 이상, 약 100000 이상, 약 15000 이상 또는 약 200000 이상의 pg/mL 혈액 혈청으로 증가될 수 있다.

[0133] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 투여는 융합 단백질의 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 혈청 농도를 초래한다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg, 예컨대 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량 수준으로 투여된다. 융합 단백질은 매주 약 1회, 2주마다 약 1회, 또는 3주마다 약 1회의 간격으로 투여될 수 있다.

[0134] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하면 대상체에서 첫 번째 용량 후, 1회 처리 주기 후, 2회 처리 주기 후, 3회 처리 주기 후, 또는 더 나중에 항-약물 항체(ADA)가 생성된다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 0.05 mg/kg 내지 약 27 mg/kg, 예컨대 약 0.05 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량 수준으로 투여된다.

- [0135] 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 투여는 대상체에서 항-약물 항체(ADA)를 생성하지 않는다.
- [0136] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 투여하는 것은 대상체에게 투여된 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg, 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여된 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여한 후 용량 제한 독성과 연관되지 않는다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 최대 약 2.5 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 8 mg/kg, 최대 약 12 mg/kg, 최대 약 18 mg/kg 또는 최대 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여될 때 대상체에게 투여한 후 용량 제한 독성과 연관이 없다.
- [0137] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 감소된 표적 병변, 감소된 종양 크기, 억제된 종양 성장, 지연된 종양 재발 및/또는 개선된 전체 생존과 같은 하나 이상의 항종양 효과를 초래한다.
- [0138] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 투여된 양은 대상체에서 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60 %, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100%로 표적 병변을 감소시킨다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 투여된다.
- [0139] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효한 양을 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 투여된 양은 대상체의 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 9, 약 10, 또는 더 많은 배수로, 또는 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 1000, 또는 훨씬 더 많은 처리된 수준으로 CD8+T 세포 증식 및/또는 팽창을 초래한다. 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 세포 또는 종양 기질일 수 있다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 투여된다.
- [0140] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 대상체의 전체 종양 조직, 종양 세포, 및/또는 종양 기질에서 CD8+Ki67+ T 세포 증식 및/또는 확장을 초래한다. 일부 구체예에서, 제공된 융합 단백질과 함께 투여된 대상체의 CD8+Ki67+ T 세포 수는 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수로 증가된다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 투여된다.
- [0141] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 대상체의 전체 종양 조직, 종양 세포 및/또는 종양 기질에서 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 또는 훨씬 더 많은 배수로 종양 침윤 림프구(TIL) 증식 및/또는 확장을 초래한다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 적어도 1회 투여된다.

- [0142] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 융합 단백질의 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 혈청 농도를 초래한다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg, 예를 들어, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량 수준에서 투여된다. 융합 단백질은 매주 약 1회, 2주마다 약 1회 또는 3주마다 약 1회의 간격으로 투여될 수 있다.
- [0143] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 대상체에서 첫 번째 투여 후, 1회 처리 주기 후, 2회 처리 주기 후, 3회 처리 주기 후, 또는 심지어 그 이후 항-약물 항체(ADA)를 생성한다. 일부 구체예에서, 융합 단백질은 약 0.05 mg/kg 내지 약 27 mg/kg, 예컨대 약 0.05 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량 수준에서 투여된다.
- [0144] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 대상체에서 항-약물 항체(ADA)를 생성하지 않는다.
- [0145] 일부 구체예에서, 본 개시내용은 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법을 제공하되, 방법은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 투여된 양은 처리 중단 후 부분 관해, 완전 관해 및/또는 지속 관해(예를 들어, 지속 부분 관해 또는 완전 관해)와 같은 대상체에서의 관해를 초래한다.
- [0146] 일부 구체예에서, 대상체는 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 처리 전에 하나 이상의 암 요법으로 치료받았다. 일부 구체예에서, 대상체는 융합 단백질의 처리 전에 트라스투주맙 또는 퍼투주맙과 같은 HER2 표적 약물, 우렐루맙 또는 우토밀루맙과 같은 4-1BB/4-1BBL 경로 표적 약물, 니볼루맙, 펌브롤리주맙 또는 세미플리맙과 같은 PD-1 신호전달 경로 표적 약물, 및/또는 이필리루맙과 같은 CTLA-4 신호전달 경로-표적화 약물로 치료받았다. 일부 구체예에서, 대상체는 하나 이상의 암 요법에 내성을 갖는다. 일부 구체예에서, 대상체는 이전에 PD-1 신호전달 경로-표적화 약물로 치료받은 적이 없다. 일부 구체예에서, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질을 사용한 치료는 PD-1 신호전달 경로-표적화 약물을 사용한 (공동)치료를 포함하지 않는다.
- [0147] 일부 구체예에서, 대상체는 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 처리 전에 B 세포 고갈제로 치료되었다. 일부 구체예에서, 대상체는 융합 단백질의 처리 전에 리툽시맙, 오비누투주맙, 오크렐리주맙 또는 벨투주맙과 같은 항-CD20 항체로 치료를 받았다. 일부 구체예에서, 대상체는 융합 단백질의 처리전 약 7일에 약 1000 mg 내지 약 2000 mg의 용량으로 오비누투주맙으로 치료되었다. 일부 구체예에서, 대상체는 융합 단백질의 처리전 7일에 약 2000 mg의 용량으로 또는 융합 단백질의 처리전 7일 및 6일에 1000 mg의 용량으로 오비누투주맙으로 치료받았다.
- [0148] 일부 구체예에서, 대상체는 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 처리전 mm^2 종양 조직당 약 1000개 미만, 약 750개 미만, 약 500개 미만, 약 400개 미만, 약 400개 미만, 약 300개 미만, 약 250개 미만, 약 200개 미만, 약 150개 미만, 약 100개 미만, 약 90개 미만, 약 80개 미만, 약 70개 미만, 약 60개 미만, 약 50개 미만, 약 45개 미만, 약 40개 미만, 약 35개 미만, 또는 훨씬 더 적은 CD8+T 세포를 갖는다. 일부 구체예에서, 대상체는 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 처리전 mm^2 종양 조직당 약 250개 미만의 CD8+T 세포를 갖는다.
- [0149] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 전체 면역 세포의 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 전체 면역 세포의 약 5%, 또는 심지어 더 낮은 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0150] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융

합 단백질은 mm² 종양 조직당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준 및 총 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.

- [0151] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB는 약 0.0005 mg/kg, 약 0.0015 mg/kg, 약 0.005 mg/kg, 약 0.015 mg/kg, 약 0.05 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 5.0 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg, 또는 그 이상의 용량 수준으로 투여된다. 일부 구체예에서, 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5.0 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg, 또는 그 이상의 용량 수준으로 투여된다. 일부 구체예에서, 용합 단백질은 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 27 mg/kg, 또는 그 이상의 용량 수준으로 투여된다.
- [0152] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB는 매주 약 1회, 2주마다 약 1회, 3주마다 약 1회 또는 4주마다 약 1회의 투여 스케줄로 투여된다. 일부 구체예에서, 용합 단백질은 매주 약 2회, 매주 약 1회, 10일마다 약 1회, 2주마다 약 1회, 3주마다 약 1회, 4주마다 약 1회, 5주마다 약 1회, 매달 약 1회, 6주마다 약 1회, 7주마다 약 1회, 8주마다 약 1회, 또는 두달마다 약 1회의 투여 스케줄로 투여된다.
- [0153] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0154] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격, 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0155] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0156] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0157] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격, 또는 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0158] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 약 2.5 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 18 mg/kg, 또는 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 대상체에게 투여된다.
- [0159] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 주입에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HER2/4-1BB 이중특이적 용합 단백질은 정맥내 주입에 의해 대상체에게 투여된다.
- [0160] 일부 구체예에서, 본 개시내용에 의해 제공되는 방법은 추가 요법을 더 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 방사선 요법, 수술(예를 들어, 유방 절제술(lumpectomy) 및 유방 절제술(mastectomy)), 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역요법, 골수 이식, 나노요법, 단클론 항체 요법, 또는 전술한

것의 조합일 수 있다. 이러한 추가 요법은 보조 요법 또는 선행 요법의 형태일 수 있다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 저분자 효소 억제제 또는 항건이제의 투여이다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 부작용 제한제(예를 들어, 항메스꺼움제 등과 같은 치료 부작용의 발생 및/또는 중증도를 감소시키도록 의도된 제제)의 투여이다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 항-약물 항체(ADA)를 감소시키는 제제의 투여이다. 일부 구체예에서, 추가 요법은 B 세포 고갈제의 투여이다.

[0161] **C. 약학적 제형**

[0162] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 치료 조성물의 "유효성분"으로서 사용하기 위한 표준 제약 관행에 따라 제형화될 수 있다. 이러한 분자를 포함하는 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 활택제, 희석제 또는 부형제를 함유할 수 있으며, 이는 조성물의 투여를 용이하게 하고/하거나 작용 부위로의 조성물의 전달을 용이하게 한다. 적합한 담체, 희석제 및 부형제는 당업자에게 공지되어 있으며 탄수화물, 왁스, 수용성 및/또는 팽윤성 중합체, 친수성 또는 소수성 물질, 젤라틴, 오일, 용매, 물 등과 같은 물질을 포함한다. 본 개시내용의 조성물은 임의의 적합한 형태, 예를 들어 정제, 환제, 분말, 로젠지, 향낭, 카세, 엘릭시르, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸(고체 또는 액체 매질), 예를 들어, 활성 화합물을 10중량% 이하로 함유하는 연고, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 좌약, 멸균 주사 용액, 멸균 포장 분말 등 몇 가지 비제한적인 대안을 들 수 있다. 이러한 조성물(또는 제형)은 통상적인 용해 및 혼합 절차와 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0163] 일부 구체예에서, 본 개시내용의 제제는 동결건조 제제, 밀링 분말, 또는 수용액의 형태로 다양한 경로 및 유형의 투여를 위해 제조될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 개시내용의 제제는 정맥내 주입을 위해 제조될 수 있다.

[0164] 일부 구체예에서, SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 제공된 HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질은 20 mM 히스티딘, 250 mM 소르비톨, pH 6.3, 0.01% PS80 중 약 25 mg/mL의 농도로 표적 단백질과 함께 수용액으로서 제형화될 수 있다.

[0165] 본 개시내용의 추가 목적, 이점 및 특징은 하기 실시예 및 그의 첨부 도면의 조사 시 당업자에게 명백할 것이나, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 비록 본 개시내용은 예시적인 구체예 및 선택적인 특징에 의해 구체적으로 개시되어 있지만, 본원에 개시된 내용의 수정 및 변형은 당업자에 의해 의존될 수 있고 그러한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주되는 것으로 이해되어야 한다.

[0166] 본 발명은 다음 항목을 추가로 특징으로 할 수 있다.

[0167] 항목 1. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 전체 종양 조직에서 CD8+ T 세포 수의 약 1.5배 이상 증가와 연관되며, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0168] 항목 2. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 종양 세포에서 CD8+ T 세포 수의 약 1.5배 이상 증가와 연관되며, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0169] 항목 3. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 전체 종양 조직에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가와 연관되며, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

- [0170] 항목 4. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 종양 세포에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 약 1.5배 이상 증가와 연관되며, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0171] 항목 5. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 측정된 면적 mm²당 약 500개 미만의 처리전 수준으로부터 CD8+T 세포의 증가와 연관되되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며, 여기서 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0172] 항목 6. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 대상체의 혈청 내 가용성 4-1BB(s4-1BB) 수준의 증가와 연관되되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0173] 항목 7. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 표적 병변에서 적어도 30% 감소와 연관되되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0174] 항목 8. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 안정적인 질병과 연관되되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0175] 항목 9. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 부분 관해와 연관되되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0176] 항목 10. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 완전 관해와 연관되되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열

과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0177] 항목 11. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 (i) 측정된 면적 mm^2 당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 가지되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며, (ii) 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 가지며, 여기서, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR, 및 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며, 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0178] 항목 12. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는

[0179] a. 전체 종양 조직에서 CD8+T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;

[0180] b. 종양 세포에서 CD8+T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;

[0181] c. 전체 종양 조직에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;

[0182] d. 종양 세포에서 CD8+Ki67+ T 세포 수의 적어도 약 1.5배 증가;

[0183] e. 측정된 면적 mm^2 당 약 500개 미만의 처리전 수준으로부터의 CD8+T 세포의 증가이되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며;

[0184] f. 혈청 내 가용성 4-1BB(s4-1BB) 수준의 증가;

[0185] g. 표적 병변에서 적어도 30% 감소;

[0186] h. 안정적인 질병;

[0187] i. 부분 관해; 또는

[0188] j. 완전 관해와 관련되고;

[0189] 여기서 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하되, 항체는

[0190] (i) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR; 및

[0191] (ii) SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며; 및

[0192] 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0193] 항목 13: 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는데 사용하기 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg 또는 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 포함하되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하며, 여기서 항체는

[0194] (i) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR; 및

[0195] (ii) SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며; 및

[0196] 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0197] 항목 14. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 대상체에게 PD-1 축 억제제를 투여하는 것을 포함하지 않는다.

- [0198] 항목 15. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 3주마다 약 1회, 2주마다 약 1회, 또는 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0199] 항목 16. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0200] 항목 17. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0201] 항목 18. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0202] 항목 19. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 3주마다의 간격으로 투여하는 것과 비교하여 2주마다 약 1회의 간격으로 투여될 때 우수한 종양 관해와 연관된다.
- [0203] 항목 20. 항목 19의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 우수한 종양 관해는 더 긴 관해 기간이다.
- [0204] 항목 21. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0205] 항목 22. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 적어도 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 융합 단백질을 투여하는 것을 포함한다.
- [0206] 항목 23. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0207] 항목 24. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0208] 항목 25. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0209] 항목 26. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0210] 항목 27. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0211] 항목 28. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0212] 항목 29. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0213] 항목 30. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0214] 항목 31. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0215] 항목 32. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회 내지 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0216] 항목 33. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0217] 항목 34. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0218] 항목 35. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0219] 항목 36. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지

약 18 mg/kg의 용량으로 3주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.

- [illegible]

량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.

- [0241] 항목 58. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0242] 항목 59. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0243] 항목 60. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 27 mg/kg의 용량으로 2주마다 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0244] 항목 61. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0245] 항목 62. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0246] 항목 63. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0247] 항목 64. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0248] 항목 65. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0249] 항목 66. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0250] 항목 67. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0251] 항목 68. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0252] 항목 69. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0253] 항목 70. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 5 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0254] 항목 71. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 8 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0255] 항목 72. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 12 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0256] 항목 73. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 18 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0257] 항목 74. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 27 mg/kg의 용량으로 매주 약 1회의 간격으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0258] 항목 75. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 용량 제한 독성과 관련이 없다.
- [0259] 항목 76. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 융합 단백질은 주입에 의해 투여된다.
- [0260] 항목 77. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 이전에 HER2 표적화 약물 또는 4-1BB/4-1BBL 경로 표적화 약물로 치료받은 적이 있다.
- [0261] 항목 78. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 이전에 항-HER2 항체로 치료받은 적이 있다.
- [0262] 항목 79. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 이전에 트라스투주맙으로 치

료받은 적이 있다.

- [0263] 항목 80. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 이전에 페르투주맙으로 치료받은 적이 있다.
- [0264] 항목 81. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 이전에 항-4-1BB 항체로 치료받은 적이 있다.
- [0265] 항목 82. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 위암(예를 들어, 위선암종), 부인과암(예를 들어, 나팔관암, 자궁내막암 또는 난소암), 유방암, 폐암, 특히 비소세포폐암, 담낭암, 담관암종, 흑색종, 식도암, 위식도암(예를 들어, 위식도 접합부 암), 결장직장암, 직장암(예를 들어, 직장선암종), 대장암, 췌장암, 담도암, 타액관암, 방광암 및 원발성 미상암으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0266] 항목 83. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 위암, 위식도암, 나팔관암, 유방암, 담낭암 및 방광암으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0267] 항목 84. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 위암, 위식도암, 나팔관암, 유방암, 및 폐암, 특히 비소세포폐암으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0268] 항목 85. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 위암 또는 위식도암이다.
- [0269] 항목 86. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 위암이다.
- [0270] 항목 87. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 나팔관암이다.
- [0271] 항목 88. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 유방암이다.
- [0272] 항목 89. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 폐암이다.
- [0273] 항목 90. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 비소세포폐암이다.
- [0274] 항목 91. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 담낭암이다.
- [0275] 항목 92. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 흑색종이다.
- [0276] 항목 93. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 식도암이다.
- [0277] 항목 94. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 자궁내막암이다.
- [0278] 항목 95. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 종양은 직장암이다.
- [0279] 항목 96. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는다.
- [0280] 항목 97. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질의 1회 처리 주기 후에 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는다.
- [0281] 항목 98. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질의 2회 처리 주기 후에 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는다.
- [0282] 항목 99. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질의 3회 처리 주기 후에 융합 단백질에 대한 항-약물 항체를 갖는다.
- [0283] 항목 100. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 B 세포 고갈제로 치료받은 적이 있다.
- [0284] 항목 101. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 치료는 B 세포 고갈제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0285] 항목 102. 항목 100 또는 101의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, B 세포 고갈제는 항-CD20 항체이다.
- [0286] 항목 103. 항목 100 내지 102 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, B 세포 고갈제는 오비누투주맙이다.
- [0287] 항목 104. 항목 100 내지 103 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 오비누투주맙으로

치료받았으며, 또는 오비누투주맵은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 약 3주에서 투여일까지의 시간에 약 1000 mg 내지 약 2000 mg의 용량으로 대상체에게 투여된다.

- [0288] 항목 105. 항목 100 내지 항목 104 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 오비누투주맵은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 약 7일에 약 1000 mg 내지 약 2000 mg의 용량으로 대상체에게 투여된다.
- [0289] 항목 106. 항목 100 내지 105 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 오비누투주맵은 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 7일에 약 2000 mg의 용량으로 또는 융합 단백질의 첫 번째 투여 전 7일 및 6일에 1000 mg의 용량으로 대상체에게 투여된다.
- [0290] 항목 107. 항목 100 내지 102 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, B 세포 고갈제는 리톡시맵이다.
- [0291] 항목 108. 항목 100 내지 102 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, B 세포 고갈제는 오크렐리주맵이다.
- [0292] 항목 109. 항목 100 내지 항목 102 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, B 세포 고갈제는 벨투주맵이다.
- [0293] 항목 110. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 말초 혈액에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는다.
- [0294] 항목 111. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 림프절에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는다.
- [0295] 항목 112. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 융합 단백질로 치료를 시작할 때 비장에서 약 1:5 이하의 B 세포 대 T 세포 비율을 갖는다.
- [0296] 항목 113. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0297] 항목 114. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0298] 항목 115. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0299] 항목 116. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0300] 항목 117. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0301] 항목 118. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0302] 항목 119. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 전체 종양 조직당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0303] 항목 120. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0304] 항목 121. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0305] 항목 122. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.

- [0306] 항목 123. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0307] 항목 124. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0308] 항목 125. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0309] 항목 126. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 세포당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0310] 항목 127. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 500개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0311] 항목 128. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 400개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0312] 항목 129. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 300개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0313] 항목 130. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0314] 항목 131. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 200개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0315] 항목 132. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 150개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0316] 항목 133. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 mm^2 종양 기질당 약 100개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0317] 항목 134. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 갖는다.
- [0318] 항목 135. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 대상체는 (i) 측정된 면적 mm^2 당 약 250개 미만의 CD8+T 세포의 처리전 수준을 가지되, 측정된 면적은 전체 종양 조직, 종양 기질, 또는 종양 세포의 면적이며, (ii) 전체 면역 세포의 약 25% 미만의 PD-L1+ 세포의 처리전 수준을 가진다.
- [0319] 항목 136. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열과 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는다.
- [0320] 항목 137. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 융합 단백질은 SEQ ID NOs: 50 및 51에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0321] 항목 138. 이전 항목 중 어느 하나의 사용을 위한 융합 단백질에 있어서, 융합 단백질은 SEQ ID NO: 50에 나타난 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠(chain) 및 SEQ ID NO: 51에 나타난 아미노산 서열을 갖는 2개의 쇠를 포함한다.
- [0322] 항목 139. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에게 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg 또는 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 포함하되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하고, 여기서 항체는 (i) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR; 및 (ii) SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열

과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며; 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0323] 항목 140. 대상체에서 HER2+ 종양을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 융합 단백질의 용도에 있어서, 치료는 융합 단백질을 약 2.5 mg/kg 내지 약 27 mg/kg 또는 약 8 mg/kg 내지 약 27 mg/kg의 용량으로 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하되, 융합 단백질은 양 중쇄의 C-말단에서 4-1BB에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 융합된 HER2에 특이적인 항체를 포함하며, 여기서 항체는 (i) SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR), 및 SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 제시된 3개의 경쇄 CDR; 및 (ii) SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 중쇄, 및 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 경쇄를 포함하며; 및 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NO: 22에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0324] 항목 141. 항목 139의 방법 또는 항목 140의 용도에 있어서, 치료는 항목 1 내지 138 중 어느 하나에서 정의된 바와 같다.

[실시예]

[0326] 실시예 1: HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질의 T 세포 면역원성 평가

[0327] 사람에서 항-약물 항체 형성의 위험을 조사하기 위해, HER2/4-1BB 이중특이적 융합 단백질 SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 50 및 53, SEQ ID NOs: 52 및 49 및 SEQ ID NOs: 54 및 49, 뿐만 아니라 레퍼런스 항체 SEQ ID NOs: 50 및 48에 대해 시험관내 T 세포 면역원성 평가를 수행하였다.

[0328] 인간 백혈구 항원(HLA) 동종이형을 포함하고 전 세계 인구 분포를 반영하도록 선택된 32명의 공여자의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)를 해동하고 세척한 다음 웰당 3×10^5 세포 밀도로 96웰 플레이트에 씨딩하였다. 분석 배지에 희석된 시험 물질을 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세포에 첨가한 다음 37°C 및 5% CO₂의 가습 분위기에서 7일 동안 인큐베이션하였다. 분석 배지만을 블랭크로 사용하고 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)을 순수한 양성 대조군으로 시험하였다. 7일째에, PBMC는 표면 표현형 CD3+ 및 CD4+ 마커에 대해, 그리고 세포 증식 마커로 사용되는 DNA-포함 EdU(5-ethynyl-2'deoxyuridine)에 대해 표지되었다. CD3+CD4+EdU+ 증식 세포의 백분율은 Guava easyCyte 8HT 유세포 분석기를 사용하여 측정하고 GuavaSoft InCyte 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0329] 이 분석의 결과는 도 1에 도시된다. 도 1A에서 자극 지수가 표시되었으며, 이는 시험 물품의 존재 대 부재에서의 증식 비율에 의해 얻었다. 응답 공여자를 정의하는 임계값(자극 지수 > 2)은 점선으로 표시된다. 도 1B에서 이 임계값에 의해 정의된 응답 공여자의 수를 표시하였다. 분명히, 레퍼런스 항체 SEQ ID NOs: 50 및 48에 반응하는 공여자의 수는 1명이며 따라서 적은 반면, 32명의 공여자 모두는 역치 이상의 강력한 증식으로 양성 대조군 KLH에 반응한다. 이중특이적 융합 단백질의 경우, 응답 공여자의 수는 SEQ ID NOs: 50 및 51, SEQ ID NOs: 54 및 49, SEQ ID NOs: 50 및 53, 및 SEQ ID NOs: 52 및 49에 대해 각각 0, 1, 2 및 3이다.

[0330] 결과는 이중특이적 융합 단백질, 특히 SEQ ID NOs: 50 및 51 및 SEQ ID NOs: 54 및 49가 시험관내 T 세포 면역원성 평가에서 거의 반응을 유도하지 않음을 입증하며, 이는 인간에서 면역원성 반응을 유도할 위험이 낮음을 시사하는 것이다.

[0331] 실시예 2: PRS-343의 시험관내 T 세포 활성화

[0332] PRS-343에 의해 매개되는 HER2 표적-의존적 T 세포 활성화는 상이한 수준의 HER2를 발현하는 세포주의 패널을 사용하여 공동-배양 실험에서 평가되었다. HER2 수용체(NCI-N87: HER2 높음, MKN45: HER2 낮음, HepG2: HER2 null)의 임상적으로 관련된 수준의 범위를 나타내는 암 세포주를 PRS-343의 클러스터링 및 후속 T 세포 활성화를 매개하는 능력에 대해 시험하였다. 잠재적인 치료 창을 평가하기 위해 HER2의 배경 수준을 발현하는 것으로 알려진 건강한 조직에서 유래한 세포주도 포함되었다.

[0333] 요약하면, 암세포 또는 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 미토마이신 C(Sigma Aldrich)로 전처리된 건강한 조직으로부터 유래된 세포를 항-CD3으로 사전 코팅된 배양 플레이트에 씨딩하고 가습된 5% CO₂ 분위기에서 37°C에서 밤새 배양하였다. T 세포 현탁액(5×10^4 세포)을 시험 물품과 함께 첨가하고 3일 동안 인큐베이션하였다. T 세포 활성화 수준은 전기화학발광(ECL) 면역분석(IL2 DuoSet 키트 사용, R&D Systems)을 사용하여 상등액에서 인간 IL-2를 정량화하여 측정하였다.

[0334] PRS-343에 의한 4-1BB 경로의 특이적 활성화는 또한 루시퍼라제 리포터 세포 분석(Promega)을 사용하여 평가되었으며, 여기서 4-1BB 과발현 리포터 세포주(NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat 세포)는 HER2-양성 종양 세포주이고, 4-1BB 경로 활성화는 발광에 의해 측정되었다.

[0335] 예시적인 실험의 결과는 도 2에 도시된다. HER2-양성 세포주의 존재하에서, IL-2의 용량 의존적 유도가 PRS-343에서 관찰되었다. 특히, PRS-343은 약 35 pmol/L(EC₅₀)의 효능으로 HER2-양성 NCI-N87 세포 존재하에서 IL-2 생산을 유도한다. HER2의 기초 수준을 발현하는 세포주로 실험을 수행했을 때, PRS-343-의존적 IL-2 유도는 관찰되지 않았다. 또한 PRS-343은 약 50 pmol/L(EC₅₀)의 효능을 갖는 HER2-양성 세포의 존재하에서 리포터 세포주에서 Jurkat NF- κ B에서 4-1BB 클러스터링 및 다운스트림 신호전달을 유도한다.

[0336] 1차 T 세포 활성화 분석 및 Jurkat NF- κ B 리포터 분석 모두에서 종 모양의 반응이 관찰되어, 반응은 종양 세포 표적 HER2, 약물 PRS-343 및 T 세포 수용체 4-1BB의 삼원 복합체 형성이 필요하며 HER2 및 4-1BB가 개별적으로 PRS-343으로 포화될 때 파괴될 수 있음을 시사한다.

[0337] 실시예 3: HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양 환자에서 PRS-343의 용량 증량 연구

[0338] 실시예 3은 실시예 4에서 제공된 코호트 1-13에 대한 추가 정보와 함께 코호트 1-11에 대한 이 연구에 대한 정보를 제공한다.

[0339] A. 연구 목적 및 개요

[0340] 이 실시예는 표준 치료 옵션을 사용할 수 없거나, 더 이상 효과적이지 않거나, 내약성이 없거나, 환자가 표준 요법을 거부한 HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양 환자에서 PRS-343의 1상, 오픈-라벨, 용량 증량 연구를 설명한다. 연구의 주요 목적은 안전성 프로파일을 특성화하고 PRS-343의 최대 허용 용량(MTD) 또는 권장 2상 용량(RP2D)을 제시하는 것이다. 연구의 2차 목적은 PRS-343의 약동학(PK) 프로파일을 특성화하고, PRS-343의 투여 스케줄을 조사하며, PRS-343의 효능에 대한 예비 추정치를 얻고, PRS-343의 잠재적 면역원성을 평가하는 것이다. PRS-343의 약력학적(PD) 효과를 평가하고 가능한 PK/안전성, PK/PD 및 PK/유효성 상관관계를 평가한다.

[0341] PRS-343은 20 mM 히스티딘, 250 mM 소르비톨, pH 6.3, 0.01% PS80 중 25 mg/mL의 표적 단백질 농도에서 16 mL의 PRS-343 약물 제품을 함유하는 20 mL 유리 바이알에 수용액으로 공급되었다. 등록된 대상체는 처음에 3주마다(Q3W, 21일 주기) 2시간에 걸쳐 정맥내(IV) 주입으로 투여된 PRS-343을 받았다(스케줄 1). 안전성, PK 및 PD 데이터가 다른 투여 스케줄을 평가해야 한다고 제안하는 경우 스케줄 2 또는 3(각각 28일 주기에서 2주마다(Q2W) 또는 4주마다(Q4W) 투여)를 수행할 수 있다. 평가된 각 스케줄에 대해 별도의 MTD가 결정될 수 있다. 환자들은 스케줄 1에 따라 각 21일 주기의 1일, 스케줄 2에 따라 각 28일 주기의 1일과 15일, 또는 스케줄 3에 따라 각 28일 주기의 1일에 전용 코호트(표 1)에서 다른 용량 수준에 할당되었고 PRS-343을 받았다.

표 1

[0342] PRS-343 용량 수준

코호트	용량 (mg/kg)
1	0.0005
2	0.0015
3	0.005
4	0.015
5	0.05
6	0.15
7	0.5
8	1.0
9	2.5
10	5.0
11	8.0

[0343] 가속화된 적정 설계가 초기 코호트에 사용되었다(도 3A). 환자가 주기 1에서 2등급 치료 관련 부작용(AE)을 경험할 때까지 코호트당 1명의 환자만이 각 증량 용량 코호트에 등록되었으며, 이때 2명의 추가 환자가 등록되었다. 두 번째 환자가 2등급 치료 관련 AE를 경험한 경우 표준 용량 증량 단계가 시작되었다. 두 환자 모두 2등급

치료 관련 AE를 경험하지 않은 경우 가속화된 걱정이 계속되었다. 단일 환자가 용량 제한 독성(DLT)을 경험한 경우 수정된 3+3 설계가 시작되었다(도 3B). 표준 용량 증량 단계에서 수정된 3+3 설계가 사용되어 DLT가 관찰되는 경우 3~4명의 환자가 코호트에 등록되어 총 6명의 평가 가능한 환자로 확장되었다. 수정된 3+3 설계는 이전에 시작되지 않은 경우 용량 수준 8~11 이상(각각 1 mg/kg 내지 8 mg/kg 이상)에 대해 시작될 예정이었다. 각 코호트가 등록되고 코호트의 모든 환자가 주기 1을 완료한 후 모든 코호트의 안전성 데이터를 검토하여 추가 용량 증량을 진행할지 여부를 결정하였다.

[0344] 내약성이 없는 용량의 확인 후, 이전 용량의 등록은 해당 용량이 6명의 평가 가능한 환자에게 투여될 때까지 재개될 것이다. MTD는 환자의 $\geq 33\%$ 에서 DLT를 유발하는 용량 미만의 용량 수준으로 정의된다. MTD라고 하려면 최소 6명의 평가 가능한 환자를 용량 수준에서 평가해야 한다. MTD가 확립되면 최대 30명의 추가 환자가 MTD 및/또는 안전성/PD/PK/유효성 데이터가 RP2D를 결정하기 위해 더 낮은 용량 수준에 대한 추가 평가를 뒷받침하는 경우 더 낮은 용량 수준에서 개별 확장 코호트에 등록된다.

[0345] 대상체는 다음 기준에 기초하여 연구에 등록되었다: 1. 선별 절차를 포함하여 연구 절차를 수행하기 전에 얻은 서명된 서면 동의서; 2. 18세 이상의 남녀; 3. 용량 증량: 조직학적으로 또는 세포학적으로 확인된 절제불가능한/국소 진행성 및/또는 전이성 HER2+ 고형 종양 악성종양의 진단이며 이에 대한 표준 요법이 이용가능하지 않거나, 더 이상 효과적이지 않거나, 허용되지 않거나, 환자에 의해 거부된 경우. 확장 코호트: HER2 표적화 4-1BB 작용제(예를 들어, 위/위식도/식도, 유방, 방광)에 반응할 가능성이 있는 것으로 간주되는 절제불가능한/국소 진행성 또는 전이성 HER2+ 고형 종양; 4. 용량 증량 및 확장 코호트: 임상 병리 보고서에 의해 문서화된 HER2+ 고형 종양; 5. 유방암, 위암 및 위식도 접합부 암이 있는 환자는 진행성/전이성 질병에 대해 이전에 HER2 표적 요법을 적어도 1회 받은 적이 있어야 한다; 6. ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태(PS) 0-1; 7. 최소 3개월의 예상 수명; 8. 용량 증량: RECIST v1.1에 따라 평가 또는 측정 가능한 질병. 확장 코호트 (추가 30명의 환자): RECIST에 따라 측정 가능한 질병; 9. 아래 정의된 적절한 기관 기능: a) 혈청 AST 및 ALT $\leq 3 \times \text{ULN}$; 간기능 현재 $\leq 5 \times \text{ULN}$ 을 충족하는 경우. b) 총 혈청 빌리루빈 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$. c) 혈청 크레아티닌 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ 또는 Cockcroft-Gault 공식에 의해 계산된 사구체 여과율(GFR) $\geq 50 \text{ mL/분}$. d) 헤모글로빈 $\geq 9 \text{ g/dL}$. e) ANC $\geq 1500/\text{mm}^3$. f) 혈소판 수 $\geq 75,000/\text{mm}^3$. g) 심초음파 또는 다중 게이트 획득 스캔에 의해 결정된 좌심실 박출률(LVEF) $\geq 50\%$; 10. 모든 이전 누적 독소루비신 용량은 $\leq 360 \text{ mg/m}^2$ 이어야 한다. 이전 누적 에피루비신 용량은 $\leq 720 \text{ mg/m}^2$ 이어야 한다; 11. 가임 여성은 연구 약물 시작 전 96시간 이내에 혈청 또는 소변 임신 검사에서 음성이어야 한다; 12. 여성은 모유 수유를 해서는 안된다; 13. 가임 여성은 연구 약물 PRS-343을 사용한 치료 기간 및 치료 완료 후 90일 동안의 피임 방법 지침을 따르는 데 동의해야 한다; 14. 가임 여성과 성생활을 하는 남성은 연구 약물 PRS-343 치료 기간과 치료 완료 후 90일 동안 피임 방법(들)에 대한 지침을 따르는 데 동의해야 한다.

[0346] 추가로, 다음 기준 중 임의의 하나를 충족하는 대상체는 등록되지 않았다: 1. 알려진 통제되지 않는 중추신경계(CNS) 전이 및/또는 암종성 수막염. 참고: 이전에 치료를 받은 뇌 전이가 있는 환자들은 그들이 안정적이고(연구 치료제의 첫 번째 투여 전 최소 4주 동안 영상화에 의해 진행의 증거가 없고 모든 신경학적 증상이 기준선으로 복귀한 경우), 새롭거나 확장된 뇌 전이의 증거가 없고, 연구 치료 전 적어도 7일 동안 스테로이드에 대해 임상적으로 안정한 경우 참여할 수 있다. 암종성 수막염은 임상적 안정성에 관계없이 환자의 연구 참여를 배제시킨다; 2. 지난 24주 이내에 심근경색, 관상동맥우회술, 불안정협심증, 관상동맥성형술 또는 스텐트 삽입을 포함하는 급성 관상동맥 증후군의 병력; 3. 뉴욕 심장 협회(NYHA) 기능 분류 시스템에 의해 정의된 클래스 II, III 또는 IV 심부전의 병력 또는 현재; 4. 트라스투주맙 및/또는 퍼투주맙에서 박출률이 정상 하한치 미만으로 떨어진 이력; 5. 환자 정보를 이해하고, 사전 동의를 제공하고, 연구 프로토콜을 준수하거나 연구를 완료하는 환자의 능력을 손상시키는 의학적, 정신의학, 인지적 또는 기타 상태; 6. 연구자의 판단에 따라 환자에게 연구 참여가 부적절하다고 판단되는 모든 중증 동시 질병 또는 병태(활동성 감염, 심장 부정맥, 간질성 폐 질환 포함); 7. 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)에 의한 이전에 알려진 활성 감염; 또는 B형 간염 또는 C형 간염 감염. B형 간염 코어 항체(HBcAb)가 양성인 환자는 바이러스 디옥시리보핵산(DNA) 상태를 평가하고 모니터링해야 한다. C형 간염 바이러스(HCV) 핵심 항체가 양성인 환자는 HCV 리보핵산(RNA)이 음성인 경우 등록할 수 있다; 8. PRS-343의 성분/부형제에 대한 주입 반응의 이력; 9. 연구 치료제의 첫 번째 용량 전 7일 이내에 전신 스테로이드 요법(1일 10 mg 초과와 프레드니손 또는 등가물) 또는 임의의 다른 형태의 면역억제 요법(참고: 국소, 흡입, 비강 및 안과용 스테로이드는 금지되지 않음); 10. 과거에 전신 치료가 필요한 자가면역 질환(즉, 질병 조절제, 코르티코스테로이드 또는 면역억제제 사용). 대체 요법(예를 들어, 티록신, 인슐린 또는 부신 또는 뇌

하수체 기능 부전에 대한 생리학적 코르티코스테로이드 대체 요법 등)이 허용된다; 11. 탈모증, 빈혈(헤모글로빈 수치가 연구 포함 기준을 충족해야 함) 및 말초 신경병증(2등급 이하로 회복되어야 함) 메스꺼움 및 설사를 제외하고 항구토제 및 설사제 치료가 소진되지 않은 경우 이전 항암 치료의 부작용으로부터 치료 전 기준선 또는 1등급까지 회복되지 않음; 12. 1) 치유적 치료를 받은 비흑색종 피부암, 2) 경부암 또는 유방암의 치유적 치료, 또는 3) 알려진 활성 질병이 없고 지난 2년간 투여된 처리가 없는 기타 악성 종양을 제외한 두 번째 원발성 암의 병력 연령; 13. 예정된 주기 1의 1일(C1D1) 투여 후 3주 이내에 연구 치료를 받은 경우; 14. 예정된 C1D1 투여의 3주(니트로소우레아 및 미토마이신 C의 경우 6주) 이내에 세포독성 화학요법을 받은 경우; 15. 방사선이 비-내장 구조(예를 들어, 사지 뼈 전이)에 대한 제한된 필드를 포함하지 않는 한, 예정된 C1D1 투여 후 3주 이내에 방사선 요법의 수령; 16. 예정된 C1D1 투여 후 3주 이내에 면역요법, 생물학적 요법, 표적화된 저분자, 호르몬 요법에 의한 치료의 수령; 17. 예정된 C1D1 투여 후 4주 이내에 트라스투주맵 또는 아도-트라스투주맵 엠탄신 또는 트라스투주맵과 동일한 에피토프에 관여하는 임의의 다른 실험 약물의 수령; 18. 다른 치료 임상 시험에 동시 등록; 19. 예정된 C1D1 투여 후 3주 이내의 대수술.

[0347] **B. 연구 절차**

[0348] HER2 상태가 알려지지 않은 대상체는 스크리닝 전에 HER2 시험을 받기 위해 사전 스크리닝 방문에서 별도로 동의서를 받았다. 모든 대상체는 약물 투여 전 28일 이내에(-28일에서 -1일까지) 스크리닝되어 연구 선택 기준을 충족하고 기준선(투여 1일차)에 대해 평가되었다. 스케줄 1에서, 대상체는 주기 1의 1일에 PRS-343의 첫 번째 용량을 받은 후 각 주기의 1일에 후속 용량을 받았다(3주마다). 환자 평가는 주기 1의 1, 2, 3, 4, 8 및 15일; 주기 2의 1일 및 2일부터 8일까지; 주기 3의 1, 2, 3, 4, 8, 15일; 그런 다음 모든 후속 주기의 1일에 이루어졌다. 평가는 주기 2, 4, 6, 8의 21일($\pm$ 7일)과 그 후 4주기마다 21일(12주[$\pm$ 7일])에도 수행되었다.

[0349] 스케줄 2에서, 대상체는 주기 1의 1일에 PRS-343의 첫 번째 용량을 받은 후 주기 1의 15일에 용량을 받았고 각 주기의 1일 및 15일에 후속 용량을 받았다(4주마다). 환자 평가는 주기 1의 1, 2, 3, 4, 8, 15 및 22일; 주기 2의 1일, 2일에서 8일 및 15일; 사이클 3의 1, 2, 3, 4, 8, 15일; 그런 다음 모든 후속 주기의 1일 및 15일에 이루어졌다. 평가는 주기 2, 4, 6의 28일($\pm$ 7일)과 그 후 3주기마다(12주[$\pm$ 7일]) 28일에도 수행되었다.

[0350] 스케줄 3에서, 대상체는 주기 1의 1일에 PRS-343의 첫 번째 용량을 받은 후 각 주기의 1일에 후속 용량을 받았다(4주마다). 환자 평가는 주기 1의 1, 2, 3, 4, 8 및 15일; 주기 2의 1일 및 2일에서 8일; 주기 3의 1일; 주기 4의 1, 2, 3, 4, 8, 15일; 그런 다음 모든 후속 주기의 1일에 이루어졌다. 평가는 주기 2, 4, 6의 28일($\pm$ 7일)과 그 후 3주기마다(12주[$\pm$ 7일]) 28일에도 수행되었다.

[0351] 용량 제한 독성(DLT)은 각 스케줄의 첫 번째 주기 동안(예: 스케줄 1에 대한 주기 1의 첫 번째 용량 후 21일) 보고되었다. 연구 전반에 걸쳐 안전성에 대해 대상체를 모니터링하였다. 연구 약물 중단 기준이 충족될 때까지 투여를 계속할 것이다(질병 진행 또는 연구에서 철회). 대상체는 마지막 용량을 받은 후 30일($\pm$ 3일)에 안전 추적 관찰을 위해 돌아올 것이다.

[0352] **C. 종료점 및 평가**

[0353] 이 연구의 1차 종료점은 국립 암 연구소(National Cancer Institute) 부작용 사례에 대한 공통 용어 기준(NCI CTCAE) 버전 4.03에 따라 등급이 매겨진 부작용(AE)의 발생률 및 중증도이다. PRS-343의 안전성과 내약성은 연구 기간 동안 지속적으로 활력 징후, 신체 검사, ECOG 수행 상태, 심전도(ECG) 및 실험실 안전성 시험을 기반으로 평가되었다.

[0354] 연구 참여 동안(연구 약물이 처음 투여된 시점에서 시작하여) 연구 약물의 마지막 용량 후 30일까지 환자는 AE에 대해 모니터링되었다. 진행 중인 모든 심각한 부작용 사례(SAE)는 해결 또는 안정화될 때까지 추적되었다. 활력 징후의 평가에는 체온, 수축기 및 이완기 혈압 판독값(mm Hg), 맥박(분당 박동수[BPM]) 및 호흡수(분당 호흡수[BRPM])가 포함되었다. 3중의 12-리드 ECG 측정은 미리 결정된 시점에서 수행되었고 동시에 수집된 경우 혈액 수집 전에 예정된 수집 시간의 10분 이내에 수집되었다. 1일 투여 전 수행된 3회 반복 ECG 측정의 평균은 모든 투여 후 비교에 대한 환자의 기준선 보정 QT(QTc) 값으로 사용되었다. 혈액학, 응고, 혈청 화학, 소변 검사, 임신 선별 검사, 좌심실 박출률, 사이토카인 및 유실 혈액 샘플을 포함한 실험실 평가를 위해 혈액 및 소변 샘플을 수집하였다.

[0355] 1차 종료점의 경우, PRS-343을 1회 이상 투여받은 모든 대상체가 안전성 분석에 포함되었다. 안전성 데이터는 표 및/또는 그래픽 형식으로 제공되며 적절한 용량 코호트 및 시간별로 설명적으로 요약된다. 절대값 데이터와 기준 데이터의 변경 사항은 적절하게 요약된다. 이 연구의 2차 종료점은 혈청 PK 매개변수; 스케줄 1 뿐만 아니

라 (해당되는 경우) 스케줄 2 및 스케줄 3에 대한 PK 및 안정성 프로파일; 종양 관해; 관해 기간; 질병 통제율; 항-PRS-343 항체(ADA)의 존재 및/또는 농도; 및 PD 마커이다.

[0356] PK 분석 및 ADA 평가를 위한 정맥혈 샘플을 미리 결정된 시점에 수집하였다. 단일 제제 PRS-343의 PK 특성을 평가하기 위한 PK 프로파일을 등록된 모든 대상체로부터 수집하였다. PRS-343에 대해 결정된 PK 매개변수에는 곡선 아래 면적(AUC), AUC_{24h} , AUC_{inf} , C_{max} , 최대 용량 농도까지의 시간(t_{max}) 및 PRS-343의 최종 반감기($t_{1/2}$)가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 종양 표지자를 포함한 종양 평가는 미리 결정된 시점에 수행될 것이며 종양 관해 및 진행은 RECIST, 버전 1.1에 따라 평가되었다. PD 마커는 종양 생검에서 림프구 아형 또는 마커 또는 투여 기간 전, 투여 중 및 투여 기간 후에 미리 결정된 시점에서 혈장의 말초 혈액 및 사이토카인 수준을 정량화함으로써 평가되었다. 이용 가능하고 실현 가능한 것으로 측정된 PD 마커에는 처리전(주기 1 전, 1일 투여) 및 처리중 종양 생검(주기 2, 2일에서 8일 이내)에서 평가되는 IHC 세포 서브세트(예를 들어, CD8, CD4, PDL-1, Ki67), 처리전(주기 1 전, 1일 투여) 및 처리중 혈장 샘플에서 평가되는 4-1BB, 가용성 HER2 및 IFN- γ , 처리전(주기 1 전, 1일 투여) 및 처리중 혈장 샘플에서 평가되는 CD8 T 세포, CD4 T 세포, 및 재발후(선택적) 종양 생검에서 평가되는 IHC 세포 서브세트(예를 들어, CD8, CD4, PDL-1, Ki67)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가로, PK/PD 상관관계 및 종양 관해에 대한 상관관계가 연구된다.

[0357] 실시예 4. HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양 환자에서 PRS-343의 용량 증량 연구

[0358] 이 실시예는 코호트 1-13에 대한 이 연구에 대한 정보 및 코호트 1-11에 대한 중간 데이터를 제공한다.

[0359] A. 연구 목적 및 개요

[0360] 연구 목적은 실시예 3에 기술된 바와 같았다.

[0361] 환자들은 추가의 코호트 12 및 13을 포함하는 전용 코호트에서 상이한 용량 수준으로 할당되었고(표 2) 초기에 3주마다(Q3W) 2시간에 걸쳐 정맥내(IV) 주입에 의해 투여된 PRS-343을 받았다(스케줄 1). 안전성, 약동학 및 PD 데이터가 다른 투여 스케줄을 평가해야 한다고 제안하는 경우 스케줄 2(2주마다, Q2W) 또는 스케줄 3(매주, Q1W)을 수행할 수 있다. 평가된 각 스케줄에 대해 별도의 MTD가 결정될 수 있다. 평가된 각 스케줄에 대해 별도의 MTD가 결정될 수 있다.

[0362] 코호트 1 내지 4(각각 0.0005 mg/kg 내지 0.015 mg/kg)에 1+3 용량 증량 설계가 사용되었고, 코호트 5 내지 11(0.05 mg/kg 내지 8 mg/kg)에 3+3 설계가 사용되었다. 코호트 11(8 mg/kg) 이상에서 코호트 13(18 mg/kg)까지 세 가지 투여 스케줄(Q1W, Q2W 및 Q3W)이 연구되었다(도 4).

표 2

PRS-343 용량 수준

코호트	용량 (mg/kg)
1	0.0005
2	0.0015
3	0.005
4	0.015
5	0.05
6	0.15
7	0.5
8	1
9	2.5
10	5.0
11	8
12	12
13	18

[0364] B. 연구 절차

[0365] 연구 절차는 스케줄 3의 것을 제외하고는 실시예 3에 기술된 바와 같았다. 대상체는 주기 1의 1일에 PRS-343의 첫 번째 용량을 받은 후 주기 1의 8일 및 15일에 용량을 받았고 각 주기의 1, 8일 및 15일에 후속 용량을 받았다(3주마다). 스케줄 3에 대한 환자 평가는 주기 1의 1, 2, 3, 4, 8 및 15일; 주기 2의 1, 2, 3, 4, 8, 15일

및 21일(± 7일); 그런 다음 모든 후속 주기의 1일, 8일 및 15일에 이루어졌다. 평가는 주기 4, 6, 8의 21일(± 7일)에, 그리고 그 이후에는 3주기마다 수행되었다.

[0366] 특히, 환자는 RECIST v1.1에 따라 종양 관해/진행에 대해 평가되었다. 스케줄 1의 경우, 환자는 투여의 초기 24주(처음 8주기) 동안 6주마다 평가된다. 24주 스캔 후, 종양 평가는 12주마다 수행된다. 스케줄 2 및 3의 경우, 환자는 투여의 초기 24주 동안 8주마다 평가된다(스케줄 2의 경우 처음 6주기 및 스케줄 3의 경우 처음 8주기). 24주 스캔 후, 종양 평가는 12주마다 수행된다.

[0367] C. 종료점 및 평가

[0368] 연구 절차는 실시예 3에 기재된 바와 같았다.

[0369] D. 데이터 분석/방법

[0370] (i) PK

[0371] PRS-343의 예비 약동학(PK) 결과는 3주마다 0.0005, 0.0015, 0.005, 0.015, 0.05, 1, 2.5, 5 및 8 mg/kg(Q3W) 및 2주마다 8 mg/kg(Q2W)의 용량 수준에서 이용할 수 있다. PRS-343은 2시간 정맥내 주입으로 투여되었다. Q3W 투여 요법에서 PRS-343 단일 용량 및 다중 용량 약동학은 각각 첫 번째 용량(주기 1의 1일) 및 세 번째 용량(주기 3의 1일) 후에 특성화되었다. Q2W 투여 요법에서 PRS-343 단일 용량 및 다중 용량 약동학은 각각 첫 번째 용량(주기 1의 1일) 및 다섯 번째 용량(주기 3의 1일) 후에 특성화되었다. 혈청 농도 데이터 및 계획된 시간은 비구획 방법을 사용하여 분석되었으며 예비 PK 결과가 여기에 표시된다.

[0372] (ii) 항-약물 항체 형성

[0373] 코호트당 샘플 크기가 상대적으로 작고 진행 중인 연구에서 더 많은 데이터가 수집되고 있다는 점을 감안할 때, 항-약물 항체 결과 및 결론은 예비로 해석되어야 한다. 수집된 면역원성 샘플은 항-PRS-343 항체(ADA)에 대한 검증된 분석을 사용하여 분석되었고, 샘플이 ADA에 대해 양성으로 확인된 경우, 역가 값이 결정되었다. 분석의 가장 낮은 측정 가능한 역가 값은 50이었다. 면역원성 샘플에서 ADA가 검출되지 않은 경우 환자는 ADA 음성인 것으로 간주되었다. ADA가 검출된 경우 관찰된 최대 역가 값에 따라 환자는 저역가(정량 한계 미만의 값, 50 및 150의 값) 또는 고역가(150보다 큰 임의의 값)로 분류되었다. 150의 역가 값 컷오프는 부분적으로 PRS-343 약동학에 대한 150보다 큰 역가 값의 상당한 영향을 기반으로 ADA 양성 환자를 분류하는 데 사용되었다.

[0374] (iii) 효능

[0375] RECIST 버전 1.1(부록 1)을 사용하여 조사자에 의해 평가된 바와 같이 측정가능하거나 평가가능한 질병을 갖는 환자에 대한 종양 관해에 의해 효능을 평가하였다. 관해 기간은 완전 관해(CR) 또는 부분 관해(PR)를 달성한 환자에 대해 계산되었으며 첫 번째 문서화된 관해(CR 또는 PR) 날짜부터 문서화된 진행 또는 관해 달성 후 사망 날짜까지의 시간으로 정의되었다. 질병 통제율은 최소 12주 동안 지속되는 CR, PR 또는 SD(안정적인 질병)를 달성한 환자의 백분율로 정의되었다.

[0376] (iv) PD - CD8T 세포 수의 처리 유도된 변화의 정량화

[0377] PRS-343이 활성 약물인지 여부를 조사하기 위해, 처리 유도된 PD 마커 변화는 면역조직화학(IHC) 염색에 의한 처리전(주기 1, 1일 투여 전) 및 처리중 종양 생검(주기 2, 2-8일 이내)에서 종양 생검에서 CD8+T 세포를 정량화함으로써 평가되었다.

[0378] 코어 바늘 생검을 임상 프로토콜에 의해 특정된 바와 같이 취하여, 포르말데히드로 고정하고 파라핀에 매립하며, 항-CD8 항체 및 기타 마커를 사용하여 발색성 IHC에 대해 3 μM 섹션으로 분할하였다. 종양 세포 및 기질 영역의 병리학 유도 디지털 주석을 수행하였다. CD8+T 세포는 종양 세포, 종양 기질 및 전체 종양 조직(종양 기질 + 종양 세포)의 mm² 당 계수되었다.

[0379] E. 예비 결과

[0380] 총 52명의 환자들은 단일 제제로 투여된 PRS-343으로 처리되었다(표 3 및 4). 처리 당시의 종양값 연령은 61세였으며 환자의 32명(62%)이 여성이었다. 처리된 환자의 40(77%)은 ECOG PS가 1이었고 나머지는 PS가 0이었다. 이것은 이전에 5회 이상의 요법을 받은 적이 있는 20 또는 38%, 4회 요법을 받은 적이 있는 10(19%), 및 3회 요법을 받은 적이 있는 11% 또는 21%의 과도하게 치료 받은 환자 집단이었다. 연구된 광범위한 종양 유형 중 19개(37%)는 위식도암, 13개(25%)는 유방암, 6개(12%)는 부인과암이었다.

표 3

[0381] 현재 PRS-343 연구의 등록

코호트	용량 & 복용법	환자 수
1	0.0005 mg/kg Q3W	1
2	0.0015 mg/kg Q3W	1
3	0.005 mg/kg Q3W	1
4	0.015 mg/kg Q3W	2
5	0.05 mg/kg Q3W	2
6	0.15 mg/kg Q3W	5
7	0.5 mg/kg Q3W	7
8	1 mg/kg Q3W	6
9	2.5 mg/kg Q3W	6
10	5 mg/kg Q3W	9
11	8 mg/kg Q3W	6
11B	8 mg/kg Q2W	6
TBD (데이터 기반)	8 mg/kg Q2W	
총		52

표 4

[0382] 등록된 대상체의 기준선 특징

특징	n (%)
연령, 중앙값 (범위)	61 (29-92)
성별	
F	32 (62%)
M	20 (38%)
ECOG PS	
0	12 (23%)
1	40 (77%)
사전 치료 라인	
1	6 (12%)
2	5 (10%)
3	11 (21%)
4	10 (19%)
5+	20 (38%)
평균 HER2 표적화 치료	
유방	
위	
원발성 암 유형	n (%)
담도	2 (4%)
방광	2 (4%)
유방	13 (25%)
대장	5 (10%)
췌장	2 (4%)
위식도	19 (37%)
부인과	6 (12%)
췌장	1 (2%)
기타-타액관	1 (2%)
기타-흑색종	1 (2%)

[0383] 보고된 치료 관련 부작용 사례 중 가장 흔한 것은 주입 관련 반응(10건 또는 모든 TRAE의 9%), 피로(10건 또는 모든 TRAE의 9%) 및 보고된 모든 TRAE의 7 또는 6%에서 였다(표 5).

표 5

치료 관련 부작용

≥1 환자에서 발생	N = 111 n (%)	% 등급 3
주입 관련 반응	10 (9%)	2 (2%)
피로	10 (9%)	1 (1%)
오한	7 (6%)	0
홍조	7 (6%)	3 (3%)
메스꺼움	7 (6%)	0
설사	7 (6%)	0
구토	6 (5%)	0
비-심장성 흉통	5 (6%)	1 (1%)

(i) 예비 PK 결과

단일 용량 기하 평균 혈청 농도는 도 5에 표시되고 예비 PK 매개변수는 표 6에 표시된다.

표 6

예비 기하 평균(%CV) 단일 용량(주기 1) PRS-343 약동학적 매개변수

코호트	용량 & 복용법	환자수	C _{max} (μg/mL)	t _{max} (h) ¹	AUC ₂₄ (μg·h/mL)	AUC _{INF} (μg·h/mL)	t _{1/2} (h)
1	0.0005 mg/kg Q3W	N=1	BLQ				
2	0.0015 mg/kg Q3W	N=1	BLQ				
3	0.005 mg/kg Q3W	N=1	BLQ				
4	0.015 mg/kg Q3W	N=2	0.08 (56%)	0.08 (0.08-0.08)	이용불가	이용불가	이용불가
5	0.05 mg/kg Q3W	N=2	0.89 (53%)	0.08 (0.08-0.08)	13 (21%)	21 (2%)	14.8 (32%)
6	0.15 mg/kg Q3W	N=5	2.09 (54%)	0.5(0.08-8)	39 (53%)	78 (68%)	23.5 (19%)
7	0.5 mg/kg Q3W	N=6	10.35 (23%)	0.2(0.08-8)	214 (28%)	793 (65%)	52.9 (35%)
8	1 mg/kg Q3W	N=6	19.46 (28%)	0.08(0.08-0.08)	376 (27%) ²	1657 (41%) ²	64.3 (30%) ²
9	2.5 mg/kg Q3W	N=6	45.34 (35%)	0.08 (0.08-0.08)	928 (34%)	4530 (77%)	74.8 (50%)
10	5 mg/kg Q3W	N=7	119.74 (15%)	0.1(0.08-4)	2480 (17%)	17033 (53%)	118 (45%)
11	8 mg/kg Q3W	N=5	146.39 (25%)	0.4(0.08-4)	3243 (19%)	23930 (39%)	104 (51%)
11B	8 mg/kg Q2W	N=6	142.59 (31%)	0.2 (0.08-8)	3137 (33%)	21763 (35%)	106 (31%)

BLQ(below limit of quantification: 정량 한계 미만

¹ 중앙값(범위)

² n = 5

혈청 PRS-343 농도는 0.0005 mg/kg 내지 0.05 mg/kg 용량 수준에서 매우 낮거나 정량 한계 미만이었다. 0.15 mg/kg 용량 수준에서 혈청 PRS-343 농도는 투여 후 3일 동안 측정가능하였으며 0.5 및 1 mg/kg 용량 수준에서 혈청 PRS-343 농도는 여러 환자에서 투여 후 최대 14일까지 측정가능하였다. 2.5 mg/kg 용량 수준에서 시작하여

여러 환자에서 3주 투여 간격 동안 혈청 농도를 측정할 수 있었다.

[0392] PRS-343의 최대 혈청 농도는 일반적으로 주입 종료 후 5분 이내에 관찰되었다. 소수의 환자에서 주입 종료 후 4 시간 또는 8시간에 최대 혈청 농도가 관찰되었다. 그러나 이러한 농도는 주입 종료 농도가 정량 한계 미만인 한 환자를 제외하고는 주입 종료 농도보다 실질적으로 크지 않았다.

[0393] 용량 범위 0.5 mg/kg 내지 8 mg/kg에서 PRS-343 Cmax 및 AUC24는 용량 비례 방식으로 증가하였다. PRS-343은 2.5 mg/kg 내지 8 mg/kg 용량 수준에서 용량 비례 AUCINF를 나타냈다. PRS-343 약동학 매개변수의 변동성은 낮거나 중간이었다. 반감기를 신뢰할 수 있는 추정치에 사용할 수 있는 충분한 데이터 포인트가 있는 2.5 mg/kg 이상의 용량 수준에서 평균 반감기가 최소 3일인 것으로 추정되었다. 8 mg/kg Q3W의 최고 용량에서 평균 PRS-343 반감기는 104시간(4.3일)으로 추정되었다.

[0394] 주기 3 다중 용량 약동학 결과는 제한된 수의 환자에서 이용가능하고 면역원성 결과(ADA 형성)의 맥락에서 논의된다.

[0395] (ii) 예비 ADA 형성 결과

[0396] ADA에 대해 분석된 하나 이상의 투여 후 샘플을 갖는 환자에서 ADA의 발생률은 표 7에 요약되어 있다.

표 7

[0397] 항-PRS-343 항체(항약물 항체, ADA)의 발생률

코호트	용량 & 복용법	투여 후 적어도 1개의 샘플을 갖는 환자수	측정가능한 ADA가 없는 환자의 수(%)	저역가 ADA 환자 수(%) (역가 ≤ 150)	고역가 ADA 환자 수(%) (역가 > 150)	각 용량 수준에서 보고된 최고 역가
1	0.0005 mg/kg Q3W	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	984,000
2	0.0015 mg/kg Q3W	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	n/a
3	0.005 mg/kg Q3W	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	n/a
4	0.015 mg/kg Q3W	2	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	n/a
5	0.05 mg/kg Q3W	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	12,100
6	0.15 mg/kg Q3W	5	4 (80%)	0 (0%)	1 (20%)	1,350
7	0.5 mg/kg Q3W	6	1 (16.7%)	1 (16.7%)	4 (66.7%)	8,860,000
8	1 mg/kg Q3W	5	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)	36,500
9	2.5 mg/kg Q3W	5	0 (0%)	3 (60%)	2 (40%)	109,000
10	5 mg/kg Q3W	5	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	450
11	8 mg/kg Q3W	5	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	36,500
11B	8 mg/kg Q2W	3	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	4,050
코호트 9, 10, 11 & 11B		18	6 (33.3%)	7 (38.9%)	5 (27.8%)	
모든 코호트		40	17 (42.5%)	8 (20%)	15 (37.5%)	

[0398] 0.0005 mg/kg 내지 8 mg/kg 범위의 용량에서 적어도 1회 투여 후 면역원성 샘플과 함께 PRS-343이 처리된 40명의 환자 중 17명의 환자가 ADA 음성이었다. ADA는 저역가로 간주되는 환자 8명과 고역가를 갖는 것으로 간주되는 환자 15명을 포함하여 나머지 23명의 환자에서 적어도 1회 투여 후 샘플에서 검출되었다.

[0399] 전반적인 안전성 프로파일에 기초하여, PRS-343의 추가 평가는 더 높은 용량 수준에서 계속될 것으로 예상된다. 따라서 면역원성 데이터는 2.5, 5 및 8 mg/kg의 세 가지 최고 용량 수준(현재 임상적으로 관련이 있는 것으로 간주됨)에 대해서도 요약되어 있다. 코호트 9 이상에서 18명의 환자 중 6명의 환자는 ADA 음성, 7명의 환자는 저역가의 ADA 양성, 5명의 환자는 고역가의 ADA 양성이었다.

[0400] 대부분의 ADA 양성 환자에서 면역원성 평가의 첫 번째 시점인 첫 번째 투여 후 14일 이내에 ADA가 검출되었다.

[0401] 적용 가능한 경우, ADA 역가와 함께 주기 1 및 3 모두에서 예비 약동학 데이터가 있는 11명의 환자에서 PRS-343 노출의 약동학에 대한 ADA의 효과가 표 8에 제시되어 있다.

표 8

[0402] 주기 1 및 주기 3 예비 PK 데이터가 모두 있는 환자에서 PRS-343의 노출

대상체 ID	PRS-343 용량 및 투여 복용법	주기 1 PRS-343 AUC(0-t), mgxh/mL	주기 3 PRS-343 AUC(0-t), mgxh/mL	ADA 결과 및 역가(해당하는 경우 최대 주기 4의 1일)
111-001	0.15 mg/kg Q3W	114	90.6	C1D15: ADA 음성 C3D1: ADA 음성 C4D1: ADA 음성
111-002	0.15 mg/kg Q3W	99.3	0.847	C1D15: 역가 50 C3D1: 역가 1350 C4D1: 역가 1350
104-005	0.5 mg/kg Q3W	1790	61.7	C1D15: ADA 음성 C3D1: 역가 1350 C4D1: 역가 12100
106-001	1 mg/kg Q3W	1320	200	C1D15: 역가 12100 C3D1: 역가 450 C4D1: 이용불가
107-004	1 mg/kg Q3W	171	0.592	C1D15: 이용불가 C3D1: 이용불가 C3 스케줄없음: 역가 4050 C4D1: 역가 150 C5D1: 역가 36500
108-002	2.5 mg/kg Q3W	7243	1857	C1D15: ADA 음성 C3D1: ADA 음성 C4D1: 이용불가
103-013	5 mg/kg Q3W	12537	1968	C1D15: 역가 < 50 C3D1: 이용불가 C4D1: 이용불가
103-015	5 mg/kg Q3W	13578	1516	데이터 이용불가
103-009	8 mg/kg Q3W	35192	49990	C1D15: ADA 음성 C3D1: ADA 음성 C4D1: ADA 음성
108-005	8 mg/kg Q3W	25132	4362	C1D15: ADA 음성 C3D1: ADA 음성 C4D1: 역가 1350
103-012	8 mg/kg Q2W	26353	217	데이터 이용불가
104-006	8 mg/kg Q2W	28332	8392	C1D15: 역가 50 C2D15: 역가 50 C3D1: 역가 150 C4D1: 이용불가
107-012	8 mg/kg Q2W	15227	1946	데이터 이용불가
110-003	8 mg/kg Q2W ¹	17219	1330	C1D15: ADA 음성 C2D15: 이용불가 C3D1: 이용불가 C4D1: 이용불가
¹ 주기 1 1일 PRS-343 용량: 481.6 mg; 주기 3 Day 1 PRS-343 용량: 309 mg				

[0403] 주기 3 PRS-343 노출의 감소와 최대 주기 4의 1일까지 결정된 ADA 역가 값 사이의 관계 평가는 주기 3에서 실질적으로 더 낮은 PRS-343 노출은 단일 환자(대상체 ID 104-006)를 제외하고는 450 이상의 역가 값과 관련이 있음

을 시사한다.

- [0404] ADA가 없는 환자에서 주기 1 및 주기 3 노출은 유사하여 Q3W 투여 후 축적이 없음을 나타낸다. 환자(대상체 ID 108-002)는 주기 4의 1일까지 ADA가 감지되지 않은 주기 3에서 노출이 더 낮았다.
- [0405] (iii) PK/PD 관계
- [0406] PRS-343의 최대 활성은 시험관내에서 10 nM(= 2 $\mu\text{g/mL}$)에서 관찰되었고 약물의 10%가 종양에 도달한다는 가정을 나타내는 전임상 데이터세트에 기초하여, 혈청 농도 $\geq 20 \mu\text{g/mL}$ 는 종양에서 PRS-343의 전체 활성에 필요한 것으로 예측되었다.
- [0407] 도 6은 약물 노출/PD 관계 그래프를 보여준다. 코호트 1 내지 8(0.0005 mg/kg 내지 1 mg/kg 범위의 용량 수준)의 경우 약물 노출은 20 $\mu\text{g/mL}$ 미만이다. 코호트 9부터(2.5 mg/kg 이상의 용량 수준), 혈장 약물 수준은 20 $\mu\text{g/mL}$ 이상이다.
- [0408] 코호트 9부터(2.5 mg/kg 이상의 용량 수준), CD8+T 세포 침윤의 강한 증가가 일부 환자에서 관찰되었으며, 가장 특히 오래 지속되는 안정적인 질병(SD)(108-002) 및 부분 관해(PR)(107-012)는 처리 시 CD8+T 세포의 3배 및 4.8배 유도를 각각 보여주었다(도 6).
- [0409] 이들 결과는 PRS-343의 4-1BB 압 활성이 환자에게 유익한 종양에서 CD8+T 세포의 수준을 증가시킬 수 있음을 입증하며, 2.5 mg/kg 이상의 용량 수준은 PRS-343의 강력한 면역 자극 효과에 의해 입증되는 활성 용량 범위에 있음을 나타낸다.
- [0410] (iv) 약물 활성 및 반응의 긴급 결정인자
- [0411] CD8+T 세포의 더 현저한 증가가 코호트 9로부터 $\geq 2.5 \text{ mg/kg}$ 의 용량을 받은 환자에서 측정되었다는 관찰에 기초하여(도 7), 더 높은 용량에 대해 PRS-343 유도된 CD8+T 세포 수의 증가를 정량화하였다. 코호트(코호트 9-11B) 및 저용량 코호트(코호트 1-8)와 비교된다.
- [0412] 평균적으로, 전체 종양 조직에서, 저용량 코호트와 비교하여 고용량 코호트에서 CD8+T 세포의 2배 유도가 관찰되었다(도 7). 추가로, CD8+T 세포 변화는 HER2/4-1BB 이중특이적인 작용 방식과 일치하는 종양 기질 및 전체 종양 조직(도 7A 및 7C)과 비교하여 HER2+ 양성 종양 세포(도 7B)에서 더 두드러지며, 이는 HER2+ 종양 세포 및 CD8+T 세포를 발현하는 4-1BB의 근접성을 강제하는 본원에 개시된 HER2/4-1BB 이중특이적 작용 방식과 일치한다.
- [0413] 약물 활성에 대한 추가 증거는 CD8+T 세포 증가가 처리의 혜택을 받는 환자, 예를 들어, SD $>120\text{d}$ 를 갖는 환자 108-002(도 7A 및 9) 및 PR을 갖는 환자 107-012(도 7A 및 8)에서 특히 강력함을 보여주는 데이터에서 비롯된다.
- [0414] 응답 환자 107-012 및 108-002의 예시적인 결과는 각각 도 8 및 도 9에 나타나 있다. 놀랍게도, 환자 107-012는 처리 전 생검에서 매우 낮은 CD8+T 세포 수를 보여주며(전체 종양 조직의 46개의 CD8+T 세포/ mm^2) 처리 후 4.6배 증가하였다. 두 환자에 대한 CD8+T 세포의 배수 증가는 종양 기질(환자 107-012 및 환자 108-002의 경우 1.9배)과 비교하여 종양 세포에서 더 두드러졌으며(환자 107-012의 경우 5.7배 및 환자 108-002의 경우 5.1배), 이는 HER2+ 종양 세포와 4-1BB+/CD8+T 세포의 근접성을 유도하는 본원에 개시된 HER2/4-1BB 이중특이적 분자의 작용 방식과 일치한다.
- [0415] 현재 문헌 증거는 적응증에 따라 환자에서 약물이 효능을 나타내기 위해 처리 전에 종양 조직에서 관문 분자가 ≥ 250 개의 CD8+T 세포/ mm^2 를 필요로 한다는 것을 시사한다(Blando et al., 2019, Chen et al., 2016, Tumeh et al., 2014). 놀랍게도, 코호트 11B에서 응답한 환자 107-012 및 103-012는 처리 전 생검에서 매우 적은 수의 CD8+T 세포를 보여주었다(종양 조직에서 각각 46개 및 110개 CD8+T 세포/ mm^2). 이는 본원에 개시된 바와 같은 4-1BB 기반 이중특이적 약물이 표준 관문 약물이 할 수 없는 환자 이익을 생성할 수 있음을 시사한다.
- [0416] 응답 환자 108-002의 CD8+Ki67+ T 세포 확장에 대한 예시적인 결과가 또한 본원에 제시되어 있다(도 10). 특히, CD8+Ki67+ T 세포 확장은 종양 세포(도 10C)에서만 관찰되고 종양 기질(도 10B)에서는 관찰되지 않아 본원에 기재된 바와 같은 4-1BB 기반 이중특이적 약물은 종양 세포 부근에서만 CD8+T 세포를 활성화시킨다는 것을 추가로 시사한다.
- [0417] (v) 종양 관해

[0418] 연구 집단의 전임상 데이터 및 PK/PD 상관관계로부터, 20 $\mu\text{g/mL}$ 가 중양 미세환경에서 효과적인 용량을 초래하는 약물의 혈청 농도인 것으로 추정되었다. 이 혈청 농도는 코호트 9에서 도달하였다. 18명의 평가 가능한 환자가 코호트 9-11B에 존재하며, 그 중 2명의 환자는 부분 관해를 기록하였고 8명의 환자는 안정적인 질병을 보였다 (표 9).

표 9

[0419] PRS-343의 활성 용량 범위에서 관해 요약

코호트 최상의 관해	11B 8 mg/kg, Q2W	11 8 mg/kg, Q3W	10 5 mg/kg, Q3W	9 2.5 mg/kg, Q3W	총
관해 평가 가능한 환자	5	4	4	5	18
CR/PR	-/2*	-/-	-/-	-/-	-/2
SD	3	2	1	2	8
PD	-	2	3	3	8
ORR	40%	0%	0%	0%	11%
DCR	100%	50%	25%	40%	55%

[0420] 도 11은 PRS-343에 대한 환자의 처리 기간을 도시한다. 코호트 9(2.5 mg/kg, Q3W)에서 환자는 평균 69일 동안 (54일의 표준 편차 또는 SD)(주기 1의 1일부터 처리 방문 종료 사이의 시간으로 정의됨) 연구에 머물렀고, 코호트 10 환자(5 mg/kg, Q3W)는 평균 50일(SD 39일) 동안 연구에 머물렀으며, 코호트 11 환자(8 mg/kg, Q3W)는 평균 49일(SD 39일) 동안 연구에 머물렀고, 코호트 11B 환자(8 mg/kg, Q2W)는 평균 119일(SD 9일) 동안 연구에 머물렀다. 용량 증가에 따른 연구 기간의 증가는 약물의 혈청 농도 증가 및 질병 반응의 확률 및 기간 증가에 해당할 수 있다.

[0421] 실시예 5. HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양 환자에서 PRS-343의 용량 증량 연구

[0422] 이 실시예는 코호트 1-13 및 오비누투주맵(obi) 처리전 코호트에 대한 데이터를 제공한다. 실시예 4는 코호트 1-13에 대한 데이터를 제공하고 실시예 3은 코호트 1-11에 대한 데이터를 제공한다.

[0423] A. 연구 목적 및 개요

[0424] 연구 목적은 실시예 3에 기술된 바와 같다.

[0425] 환자는 실시예 4에 기재된 바와 같이 전용 코호트 1 내지 13에서 상이한 용량 수준으로 할당되어 PRS-343을 받는다.

[0426] ADA 형성을 감소시키는 오비누투주맵 전처리 가능성은 스케줄 2(Q2W)(코호트 11에 해당)에 따라 8 mg/kg의 용량으로 PRS-343을 투여받는 최대 10명의 환자에서 연구된다. B 세포 고갈에 대한 추가 용량 및 스케줄을 시험할 수 있다. 오비누투주맵이 ADA 형성을 감소시키는 것으로 나타났고 새로운 안전성 문제가 발생하지 않는 경우 이 전략은 PRS-343을 투여받는 추가 환자에서 B 세포 고갈 및 ADA 발병률 감소에 사용될 수 있다.

[0427] 대상체 포함 기준은 실시예 3에 기술된 바와 같으므로 배제 기준으로서 다음이 추가된다: 7. 잠복성 또는 활동성 B형 간염 감염이 있는 환자는 오비누투주맵을 투여받는 처리전 코호트에서 제외된다; 9. 연구 치료제의 첫 번째 용량 전 7일 이내에 전신 스테로이드 요법(>10 mg 1일 프레드니손 또는 등가물) 또는 임의의 다른 형태의 면역억제 요법(참고: 국소, 흡입, 비강 및 안과용 스테로이드는 금지되지 않음). 이 기준은 처리전 오비누투주맵을 투여받는 환자에게는 적용되지 않는다.

[0428] B. 연구 절차

[0429] 연구 절차는 실시예 3 및 4에 기재된 바와 같다.

[0430] 오비누투주맵 처리전 코호트에 등록된 대상체(8 mg/kg에서 PRS-343 Q2W 수용)에 대해, 오비누투주맵은 GAZYVA® (오비누투주맵) 패키지 삽입물 또는 기관 지침에 따라 투여된다.

[0431] C. 종료점 및 평가

[0432] 연구 절차는 실시예 3에 기재된 바와 같다. 실험실 평가를 위해, B형 간염 바이러스(HBV) 감염은 또한 활성인

것으로 평가되고 HBV에 의한 잠복 감염은 오비누투주맙 투여 전에 배제된다.

[0433] 실시예 6. HER2+ 진행성 또는 전이성 고형 종양 환자에서 PRS-343의 용량 증량 연구

[0434] 이 실시예는 코호트 1-13 및 오비누투주맙 처리전 코호트에 대한 이 연구에 대한 정보를 제공하고 이러한 코호트에 대한 (추가) 중간 데이터를 제공한다.

[0435] A. 연구 목표 및 개요

[0436] 연구 목적은 실시예 3, 4 및 5에 기술된 바와 같다.

[0437] 환자들은 표 10에 나타낸 바와 같이 전용 코호트에서 상이한 용량 수준으로 할당되었고, 3주마다 2시간(Q3W; 1일 투여; 21일 주기), 2주마다(Q2W, 1일 및 15일 투여, 28일 주기) 및 매주(Q1W, 1일, 8일 및 15일 투여, 21일 주기)에 걸쳐 정맥내(IV) 주입에 의해 투여된 PRS-343을 받았다.

표 10

PRS-343 연구의 환자 코호트

코호트	용량 & 복용법
1	0.0005 mg/kg Q3W
2	0.0015 mg/kg Q3W
3	0.005 mg/kg Q3W
4	0.015 mg/kg Q3W
5	0.05 mg/kg Q3W
6	0.15 mg/kg Q3W
7	0.5 mg/kg Q3W
8	1 mg/kg Q3W
9	2.5 mg/kg Q3W
10	5 mg/kg Q3W
11	8 mg/kg Q3W
11B	8 mg/kg Q2W
11C	8 mg/kg Q1W
12B	12 mg/kg Q2W
13B	18 mg/kg Q2W
Obi+11B	8 mg/kg Q2W

[0439] 대상체 포함 및 배제 기준은 실시예 3에 기술된 바와 같다. 주요 포함 기준은 다음과 같다: 표준 요법에서 진행되었거나 표준 요법이 이용가능하지 않은 HER2+ 진행성/전이성 고형 종양 악성종양의 진단; ASCO, CAP 또는 기관 지침에 의해 문서화된 HER2+ 고형 종양; 유방암, 위암 및 GEJ 암이 있는 환자는 진행성/전이성 질병에 대해 이전에 적어도 하나의 HER2 표적 요법을 받았어야 한다. RECIST v1.1에 따른 측정 가능한 질병; ECOG 0 또는 1; 적절한 간, 신장, 심장 및 골수 기능. 주요 제외 기준은 다음과 같다. 트라스투주맙 및/또는 페루주맙에서 정상 하한치 미만의 박출률; 등록 전 7일 이내에 전신 스테로이드 요법 또는 기타 형태의 면역억제 요법; 알려진, 증상이 있는, 불안정하거나 진행 중인 CNS 원발성 악성종양; 등록 전 21일 이내에 방사선 요법(비 내장 구조에 대한 제한된 필드 방사선은 허용된다(예: 사지 뼈 전이)).

[0440] B. 연구 절차

[0441] 연구 절차는 실시예 4에 기재된 바와 같았다(또한 오비누투주맙을 사용한 전처리에 관한 실시예 5 참조).

[0442] C. 종료점 및 평가

[0443] 연구 절차는 실시예 3 및 5에 기재된 바와 같았다. 또한, 순환하는 s4-1BB의 수준을 평가하였다. s4-1BB는 이전에 항-4-1BB 작용제 단클론 항체로 치료받은 환자의 혈청에서 증가된 것으로 나타났다(Segal et al., 2018).

[0444] D. 데이터 분석/방법

[0445] 데이터 분석 및 방법은 실시예 4에 기재된 바와 같았다.

[0446] 혈청 s4-1BB 수준은 독점적인 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)에 의해 평가되었다. 혈청 s4-1BB 수준을 평가

하기 위한 대체 분석은 Segal et al., 2018에 설명되어 있다.

PD-L1 양성 세포의 백분율(IC 점수)은 면역조직화학(IHC) 염색에 의해 결정하였다.

E. 예비 결과

총 74명의 환자들은 단일 제제로 투여된 PRS-343으로 치료받았다(표 10 및 11). 치료 시 중앙값 연령은 63세이고 환자의 44(59%)는 여성이었다. 치료를 받은 환자 중 55명(74%)은 ECOG PS가 1이고 나머지는 PS가 0이었다. 이것은 이전에 5회 이상의 요법을 받은 적이 있는 28% 또는 38%, 4회 요법을 받은 적이 있는 11명(15%), 3회 요법을 받은 15% 또는 21%의 과도하게 치료 받은 환자 집단이었다. 연구된 광범위한 중앙 유형 중 27개(36%)에서 위식도암, 16개(22%)에서 유방암, 10개(14%)에서 대장암이 있었다.

표 11

등록된 대상체의 기준선 특성 및 원발성 암 유형

특징	n (%)
연령, 중앙값 (범위)	63 (24-92)
성별	
F	44 (59%)
M	30 (41%)
ECOG PS	
0	19 (26%)
1	55 (74%)
사전 치료 라인	
1	9 (12%)
2	10 (14%)
3	15 (21%)
4	11 (15%)
5+	28 (38%)
평균 HER2 표적화 치료	
유방	7
위	3
원발성 암 유형	n (%)
위식도	27 (36%)
유방	16 (22%)
대장	10 (14%)
부인과	9 (12%)
담도	7 (9%)
방광	2 (3%)
췌장	1 (1%)
기타-출처 불명의 암	1 (1%)
기타-타액관	1 (1%)

보고된 치료 관련 부작용 사례 중 가장 흔한 것은 주입 관련 반응(27건 또는 모든 TRAE의 19%), 피로(11건 또는 모든 TRAE의 8%) 및 보고된 모든 TRAE의 11 또는 8%에서 구토였다(표 12). 한 TRAE는 등급 3 이상이었다: 코호트 10에서 등급 4 주입 관련 반응(5 mg/kg PRS-343, Q3W).

표 12

치료 관련 부작용(TRAE)

>1 환자에서 발생	N = 145 n (%)	% Grade 3
주입 관련 반응	27 (19%)	3 (2%)
피로	11 (8%)	1 (1%)Nausea
구토	8 (6%)	0
오한	8 (6%)	0
빈혈증	2 (1%)	1 (1%)

관절통	2 (1%)	0
무력증	2 (1%)	0
기침	2 (1%)	0
식욕 감소	2 (1%)	0
설사	6 (4%)	0
현기증	2 (1%)	0
호흡곤란	3 (2%)	0
홍조	5 (3%)	2 (1%)
비심장성 흉통	4 (3%)	0
감각이상	3 (2%)	1 (1%)
소양증	3 (3%)	0
발진	2 (1%)	0

[0453] PRS-343의 단일 용량 기하 평균 혈청 농도는 도 14에 나와 있다. PRS-343의 평균 최종 반감기는 대략 5일이었다. 환자의 36%는 활성 용량 범위(≥ 2.5 mg/kg)를 포함하는 코호트에서 역가가 1:150 이상인 ADA 양성이었다(데이터에는 표시되지 않음).

[0454] 연구 집단의 임상 데이터에 기초하여, 중앙 미세환경에서 효과적인 용량을 초래하는 약물의 혈청 농도는 20 μ g/mL인 것으로 추정되었다. 이 혈청 농도는 코호트 9에서 도달하였다. 33명의 평가 가능한 환자가 코호트 9-13B에 존재하며, 그 중 1명의 환자는 완전 관해를 기록하였고 3명의 환자는 부분 관해를 기록하였으며 13명의 환자는 안정적인 질병을 보였다(표 13).

표 13

[0455] PRS-343의 활성 용량 범위에서 관해 요약

코호트 최상의 관해	13B 18 mg/kg, Q2W	12B 12 mg/kg, Q2W	11C 8 mg/kg, Q1W	Obi 8 mg/kg, Q2W	11B 8 mg/kg, Q2W	11 8 mg/kg, Q3W	10 5 mg/kg, Q3W	9 2.5 mg/kg, Q3W	총
평가 가 능한 환 자	3	2	4	2	7	4	6	5	33
CR	1	-	-	-	-	-	-	-	1
PR	-	-	-	-	3	.	-	-	3
SD	-	-	1	1	3	3	3	2	13
ORR	33%	0%	0%	0%	43%	0%	0%	0%	12%
DCR	33%	0%	25%	50%	86%	75%	50%	40%	52%

[0456] 투여 전 생검 및 투여 후 생검(주기 2; 2-8일)이 수행되었다. 도 15A에 나타난 바와 같이, 활성 용량의 PRS-343(코호트 9-13B)이 처리된 환자는 중앙 조직에서 증가된 CD8+T 세포를 나타냈다. 또한, 이 환자는 혈청에서 증가된 수준의 순환 s4-1BB를 나타내어(도 15B), PRS-343의 4-1 BB 압 활성을 입증한다. 완전 관해, 부분 관해, 안정적인 질병 및 질병 진행과 같은 임상 상태(해당되는 경우)를 포함하여 시간 경과에 따른 코호트 11B, 11C, 12B, 13B 및 Obi+11B의 환자에 대한 처리 과정은 도 16에 나와 있다. 도 17은 코호트 9, 10, 11, 11B, 11C, 12B, 13B 및 Obi+11B에 대한 표적 병변의 최상의 관해를 보여준다. 도 18에 도시된 바와 같이, 임상적 이점이 연장된 환자(SD $\geq$ C6, PR 및 CR)는 전체 중앙 조직에서 CD8+T 세포의 증가를 나타냈다.

[0457] 표 13 및 14 및 도 16 내지 19에 나타난 바와 같이, 코호트 13B의 한 환자(18 mg/kg, Q2W)는 PRS-343 처리 시 완전 관해를 나타내었다(특히 도 19에 묘사된 CT 스캔 참조). 환자는 심장파 폐로 전이된 4기 직장 선암종을 가진 59세 남성이다(사전 치료 라인: 5+; FoundationOne HER2 증폭, 사내 시험 IHC 3+; MSS, TMB 낮음(2 mt/Mb)).

표 14

[0458] CR이 확인된 직장암 환자

병변	병변부위	병변크기 (mm)			
		기준선	C2 처리후	C4 처리후	C6 처리후
표적 1	폐	22	13	0	0
% 기준선으로부터의 변화	-	-	-41%	-100%	-100%
비-표적 1	-	유	유	무	무

[0459] 도 20에 나타난 바와 같이, 처리 후 환자는 종양에서 증가된 CD8+T 세포 수(도 20A) 및 혈청에서 증가된 순환 s4-1BB 수준을 나타내어, PRS-343의 4-1BB 암 활성을 입증하였다(도 20B). 표 15는 부분 관해가 확인된 코호트 11B(8 mg/kg, Q2W)의 위암 환자(107-012)에 대한 처리 결과를 보여준다(도 21의 CT 스캔 참조). 환자는 간, 림프절 및 부신으로 전이된 4기 위선암을 가진 80세 여성이다(사전 치료 라인: 2, HER2 IHC 3+, PD-L1 양성(CPS=3), NGS: ERBB2 증폭, TP53 돌연변이, CDK12 및 SF3B1의 변경).

표 15

[0460] PR이 확인된 위암 환자

병변	병변부위	병변크기 (mm)				
		기준선	C2 처리후	C3 처리후	C4 처리후	C6 처리후
표적 1	간	14	12	10	9	8
표적 2	간	20	16	10	8	9
표적 3	췌장	19	16	14	14	14
% 기준선으로부터의 변화	-	-	-17%	-36%	-42%	-42%
비-표적 1	폐	유	유	유	유	유
비-표적 2	위	유	유	유	유	무
비-표적 3	위	유	유	유	유	무

[0461] 도 22에 나타난 바와 같이, 처리 후 환자는 종양에서 증가된 CD8+T 세포 수 및 CD8+Ki67+ T 세포 수(도 22A) 뿐만 아니라 혈청에서 증가된 순환 s4-1BB 수준을 나타내어 PRS-343의 4-1BB 암 활성을 입증하였다(도 22B). 도 23은 다중 처리 주기의 과정에 걸쳐 코호트 11B(8 mg/kg, Q2W)의 PR 환자 103-012의 혈청에서 순환 s4-1BB의 반복된 증가를 나타낸다. 환자는 나팔관암을 앓고 있다. 도 24는 PRS-343이 처리전 낮은 CD8+T 세포 수를 갖는 환자(<250/mm² 종양 면적; 도 24A 및 B) 뿐만 아니라 PD-L1 저/음성 환자(총 면역 세포의 <25% PD-L1+ 세포(IC 점수); 도 24B)에서 장기간의 임상 이익(부분 관해, 완전 관해 포함)을 유도한다는 것을 보여준다.

[0462] 요약하면, PRS-343은 시험된 모든 용량과 스케줄에서 허용 가능한 안전성 프로파일을 보여주었고 일반적으로 면역 요법에 반응하지 않는 종양 유형을 포함하여 여러 종양 유형에 걸쳐 사전 처리를 많이 받은 환자 집단에서 지속적인 항종양 활성을 보여주었다. PRS-343을 사용한 처리는 응답자의 종양 미세환경에서 CD8+T 세포 수와 증식 지수의 분명한 증가를 가져왔다. 가용성 4-1BB 수준의 증가는 PRS-343의 4-1BB 암의 활성을 입증하였다.

[0463] 본원에서 예시적으로 설명된 실시예들은 여기에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한의 부재하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "함유하는(containing)" 등의 용어는 제한 없이 광범위하게 읽어야 한다. 또한, 여기에 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 설명의 용어로 사용되었으며, 이러한 용어 및 표현을 사용하여 표시 및 설명된 특징 또는 그 일부의 등가물을 배제하려는 의도는 없지만, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 수정이 가능함을 인식한다. 따라서, 비록 본 구체예가 바람직한 구체예 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되었지만, 그 수정 및 변형은 당업자에 의해 의지될 수 있고, 그러한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다는 것으로 이해해야 한다. 여기에 설명된 모든 특허, 특허 출원, 교과서 및 동료 검토 간행물은 그 전체가 참고로 여기에 포함된다. 또한, 본원에 참조로 포함된 레퍼런스에서 용어의 정의 또는 사용이 일치하지 않거나 여기에 제공된 해당 용어의 정의와 반대되는 경우, 본원에 제공된 해당 용어의 정의가 적용되고 레퍼런스에서 해당 용어의 정의는 적용되지 않는다. 일반 개시내용에 속하는 보다 좁은 종 및 아속 그룹 각각은 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 본원에는 절제된 재료가 여기에 구체적으로 인용되었는지 여부에 관계없이 속에서 주제를 제

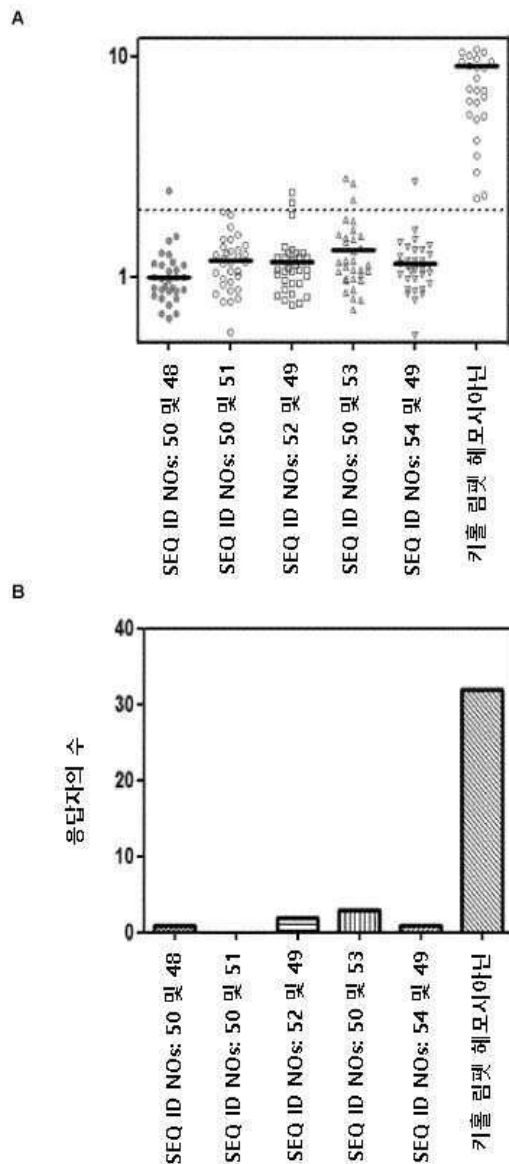
거하는 단서 또는 부정적인 제한이 있는 본 발명의 일반적인 설명이 포함된다. 또한, 특징이 마쿠쉬 그룹의 관점에서 설명되는 경우, 당업자는 개시 내용이 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 멤버 또는 멤버의 하위 그룹 관점에서도 설명된다는 것을 인식할 것이다. 추가 구체예는 다음 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0464]

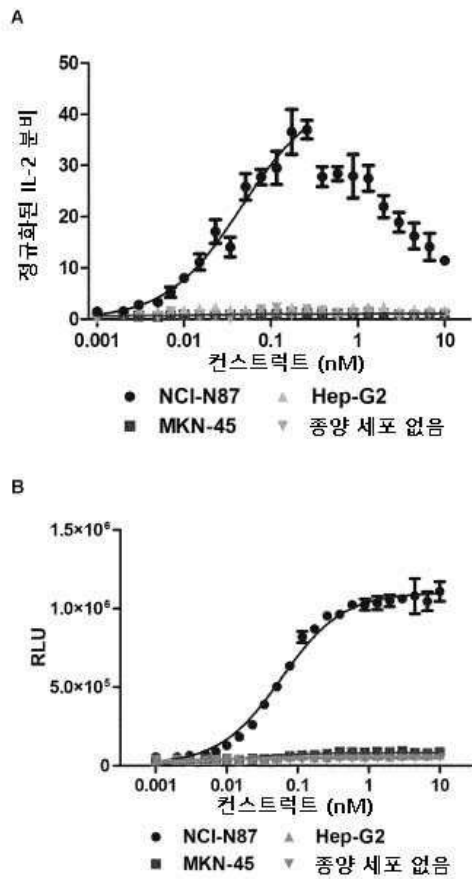
등가물: 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 구체예에 대한 다수의 등가물을 인식하거나 일상적인 실험만 사용하여 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음 청구범위에 포함되도록 의도된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 본원에 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1

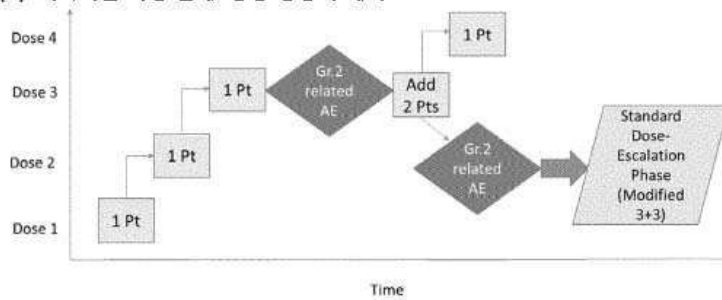


도면2



도면3

(A) 가속화된 적정 단계: 용량 증량의 예시

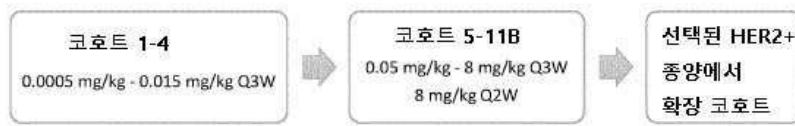


(B) 전체 연구 설계

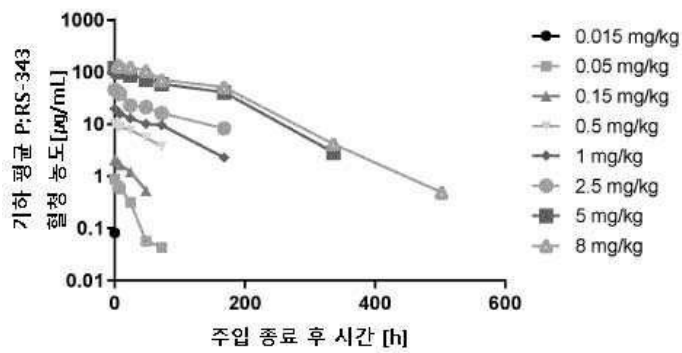


도면4

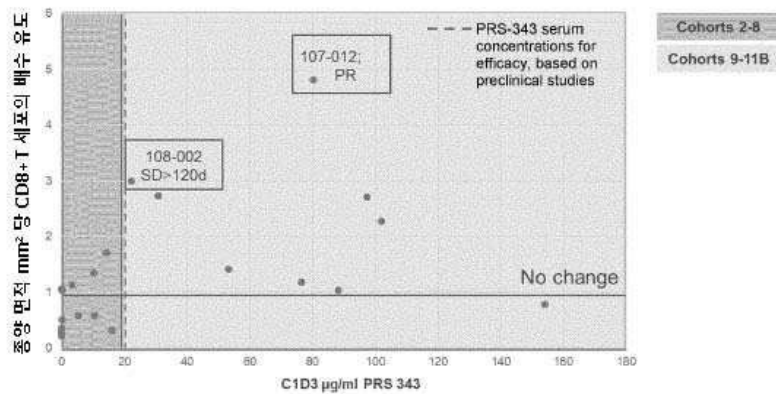
연구 설계



도면5

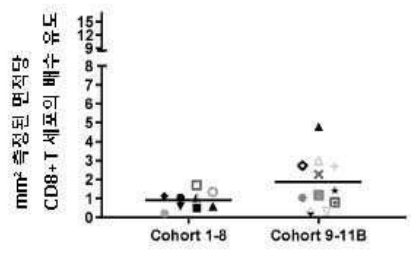


도면6

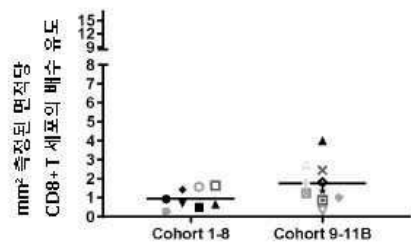


도면7

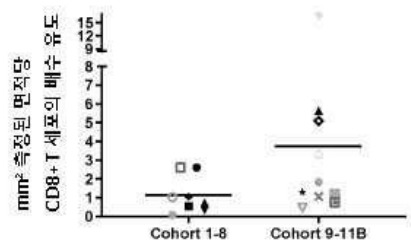
A. 전체 종양 조직



B. 해당 기질

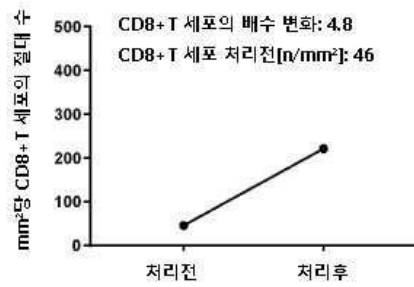


C. 해당 세포

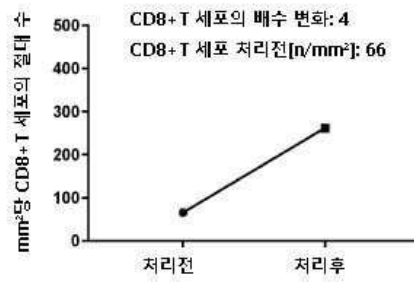


도면8

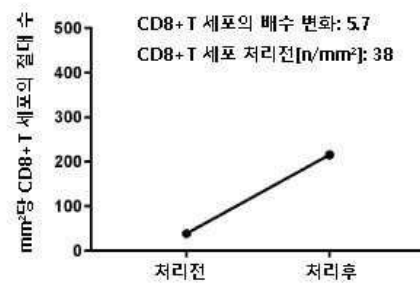
A. 전체 종양 조직



B. 종양 기질

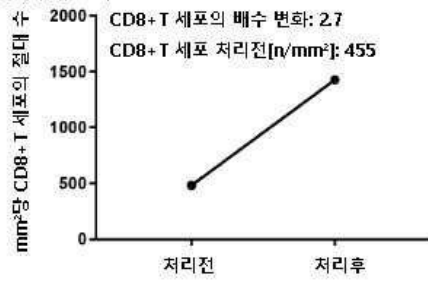


C. 종양 세포

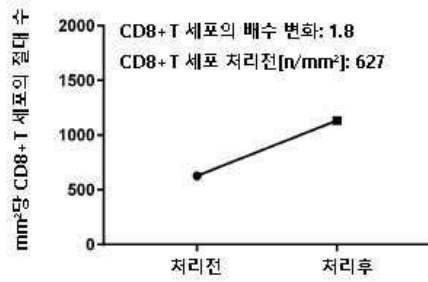


도면9

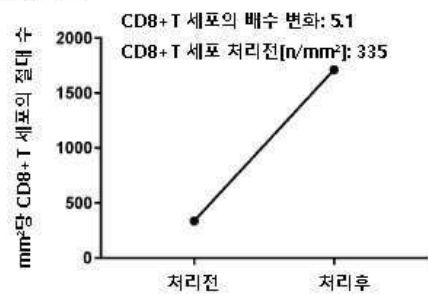
A. 전체 종양 조직



B. 종양 기질

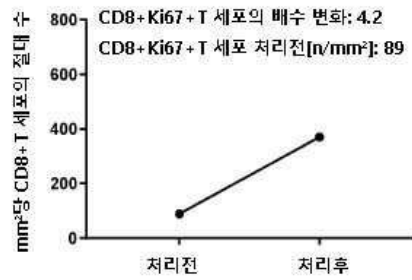


C. 종양 세포

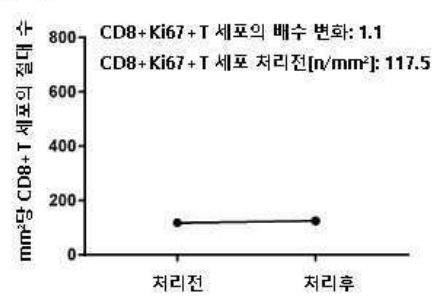


도면10

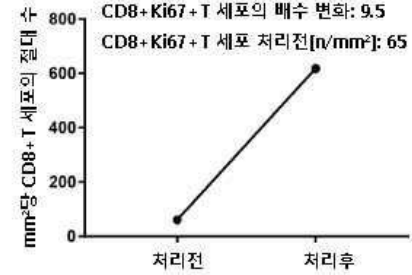
A. 전체 종양 조직



B. 종양 기질



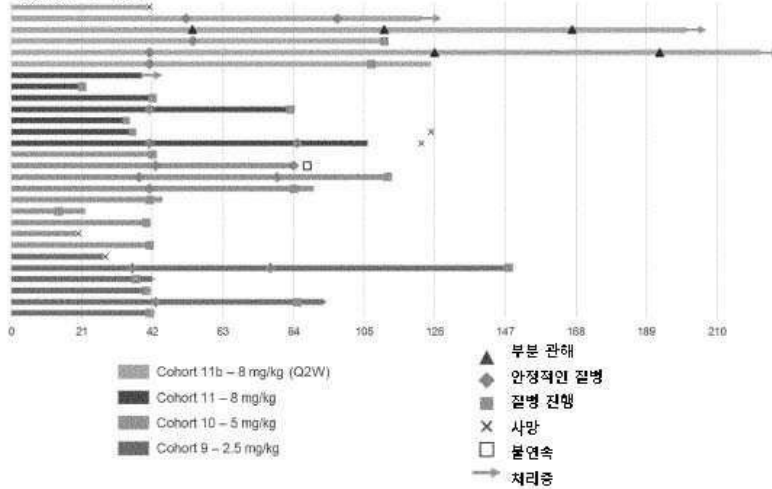
C. 종양 세포



도면11

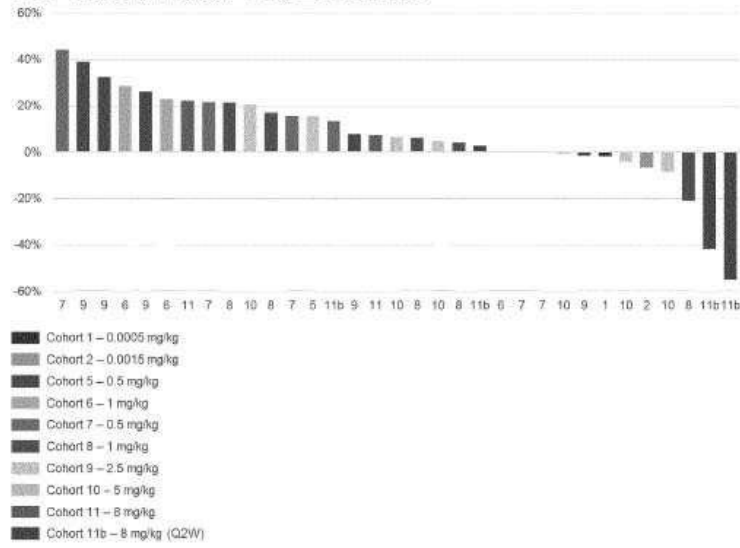
기간(일)

대상체의 수=28

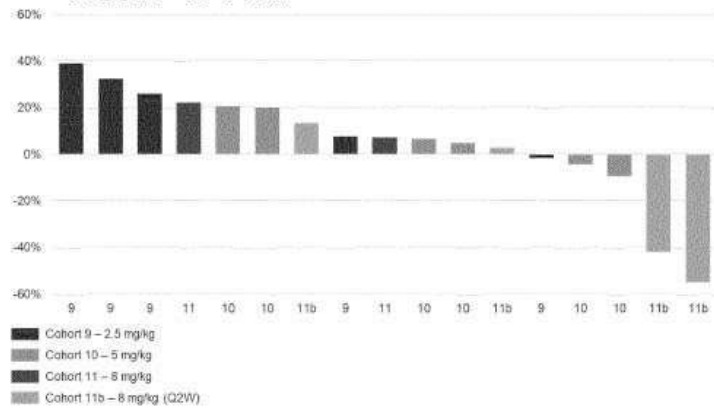


도면12

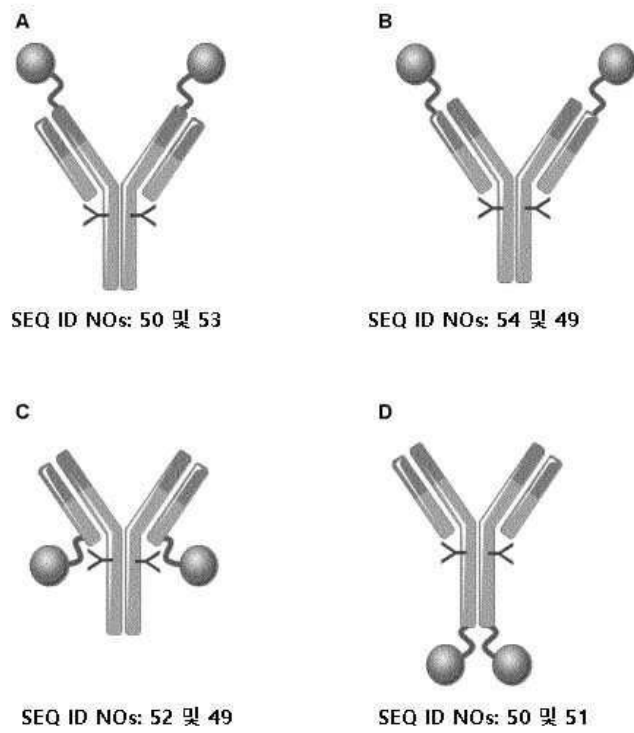
A. 표적 병변에서 최상의 관해, 코호트 1-11B



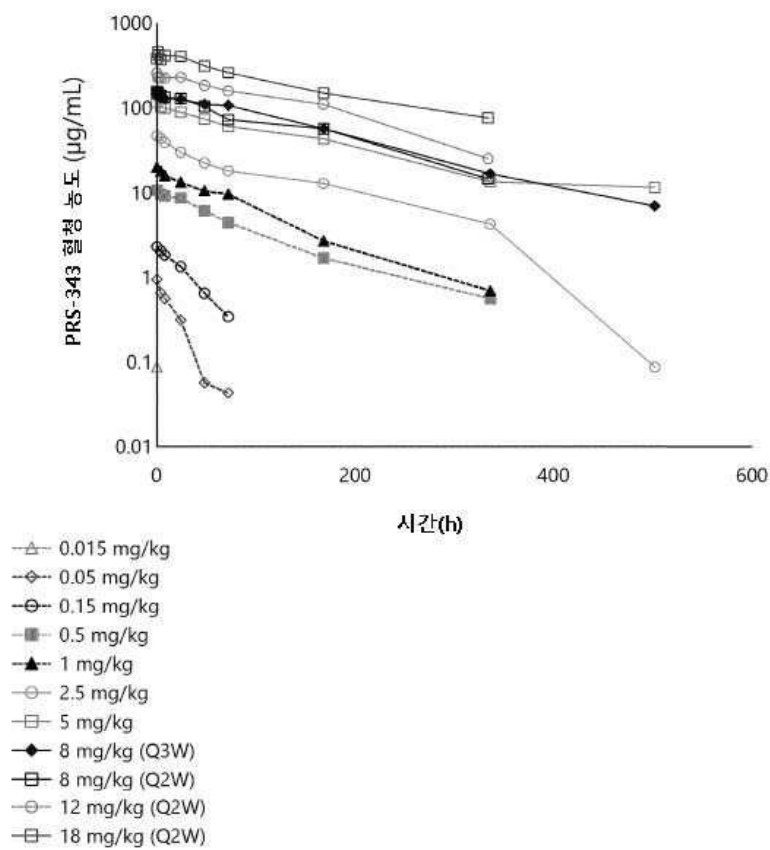
B. 표적 병변에서 최상의 관해, 코호트 9-11B



도면13

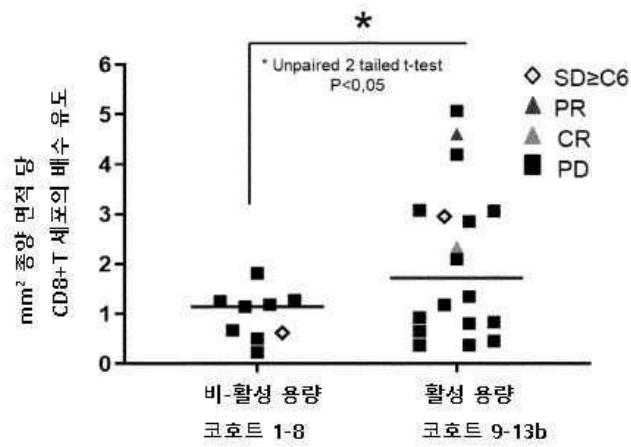


도면14

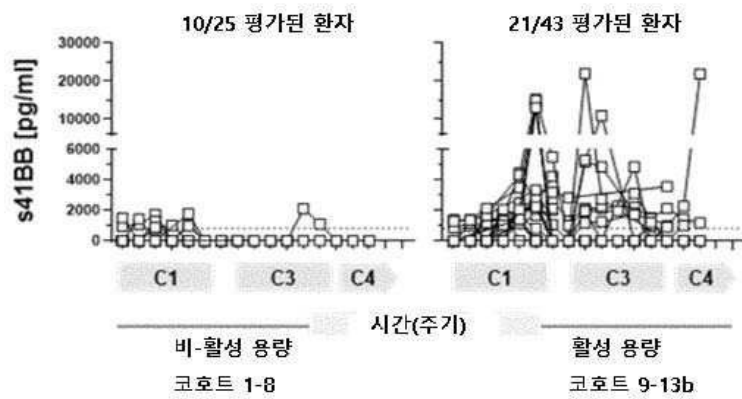


도면15

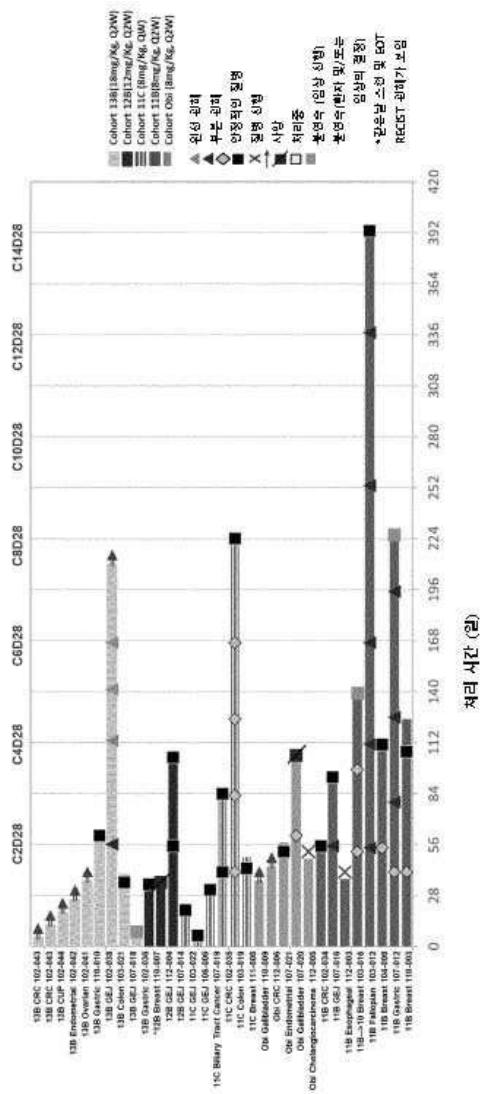
A 종양



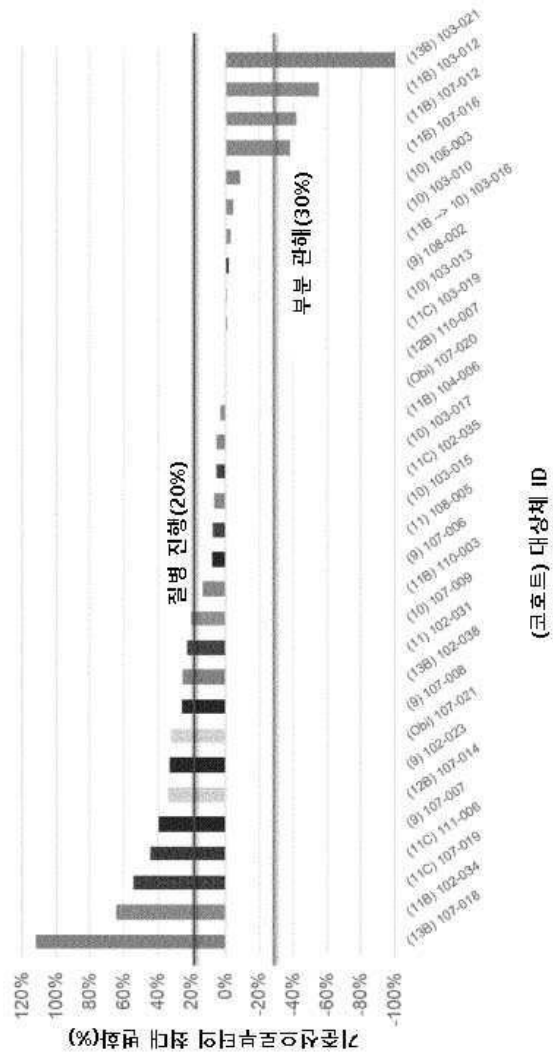
B 발청



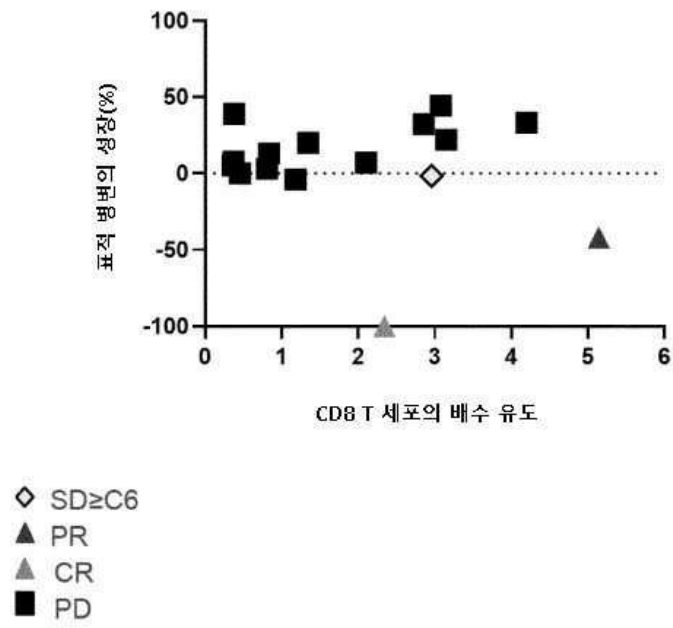
도면 16



도면17



도면18

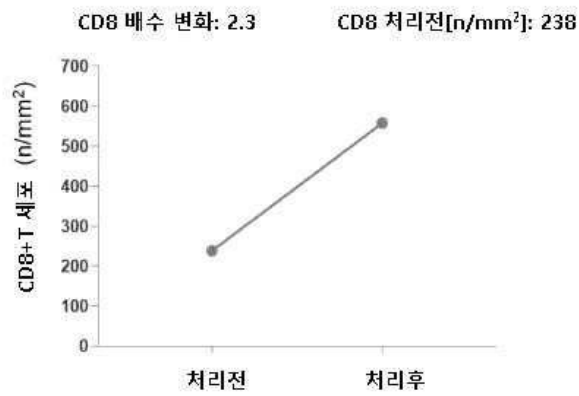


도면19

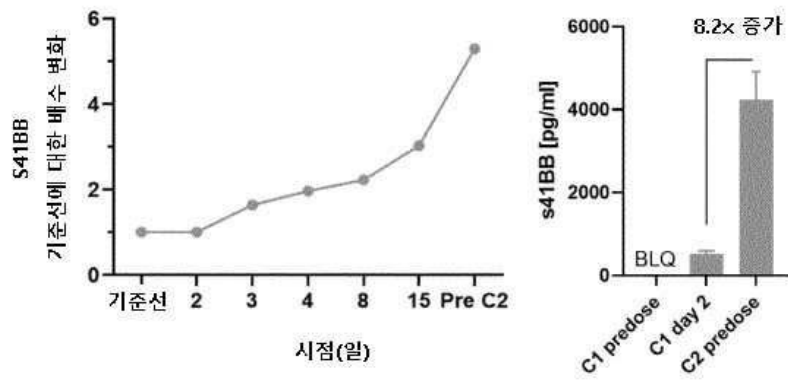


도면20

A 종양

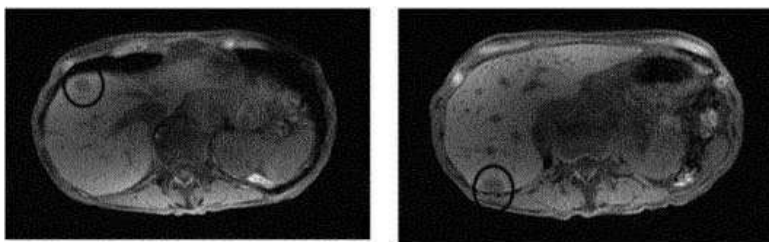


B 혈청

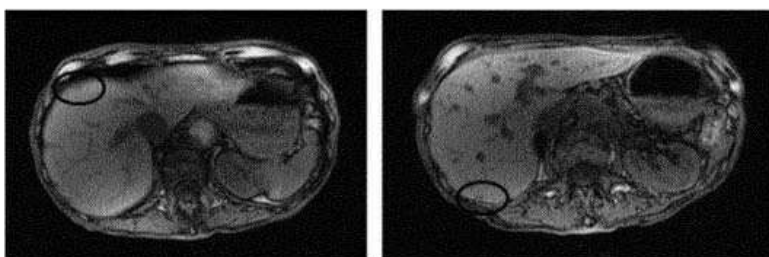


도면21

기준선

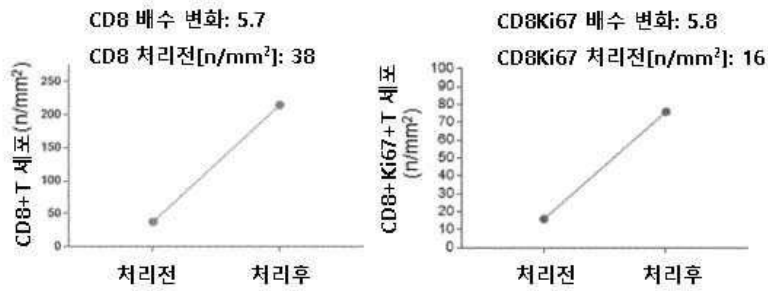


C4 처리후

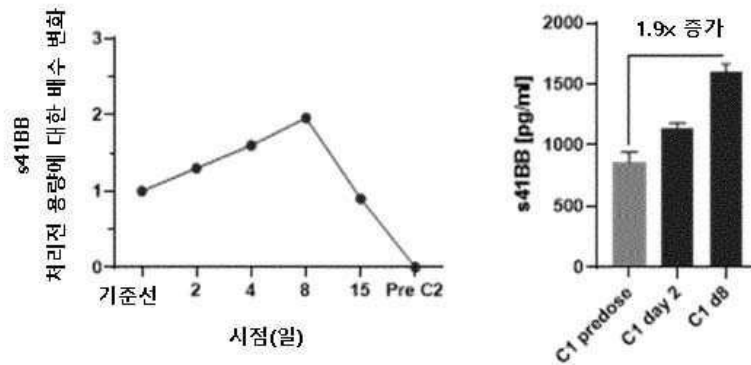


도면22

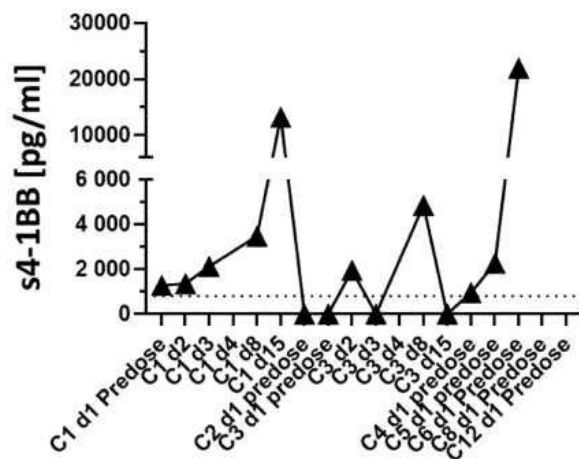
A 종양



B 혈청

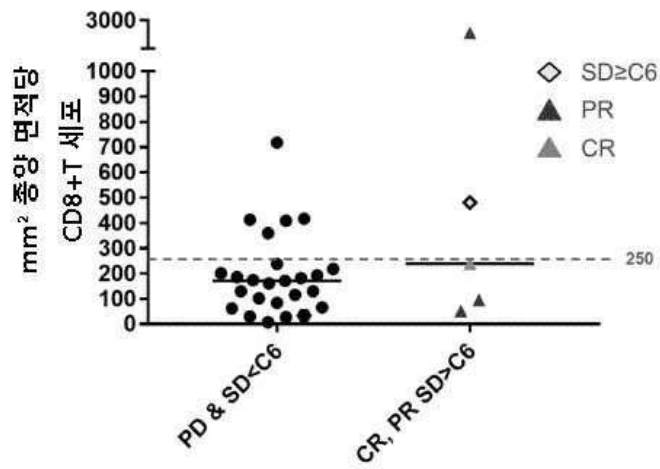


도면23

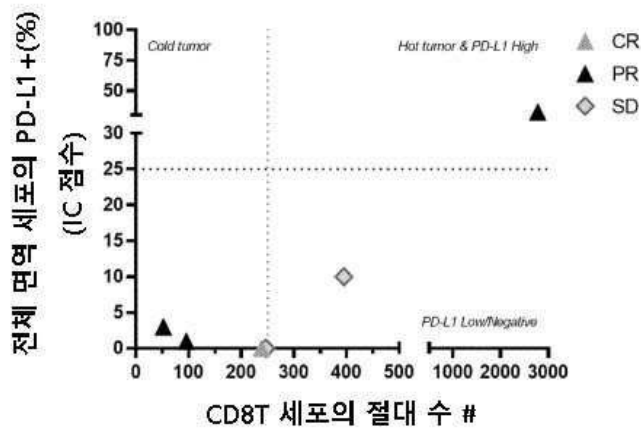


도면24

A



B



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pieris Pharmaceuticals GmbH

<120> HER2/4-1BB bispecific fusion protein for cancer treatment

<130> PIE16852PCT

<150> US 62/930,512

<151> 2019-11-04

<150> US 63/080,361

<151> 2020-09-18

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 2

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 2

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 272

<212> PRT

<213> human

<400> 3

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser

1 5 10 15
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30

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

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

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

 Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
 225 230 235 240
 Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
 245 250 255

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr

260

265

270

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 5

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Asn Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1

5

10

15

Pro Ser

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 6

Gly Gly Ser Gly Asn Ser Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Val

1

5

10

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 7

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala

20

<210> 8

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 8

Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Pro Val Pro Ser

1 5 10 15

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser

20

25

30

Gly Gly Ser Gly Asn Ser Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Val Pro Ser

35

40

45

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser

50

55

60

Ala Ser

65

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 9

Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser

1

5

10

15

Pro Ser Gly Gly Ser Gly Asn Ser Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Val

20

25

30

<210> 10

<211> 74

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 10

Ala Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Pro Val Pro Ser

1 5 10 15

Thr Pro Pro Thr Asn Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser

20 25 30

Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Asn Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr

35 40 45

Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Asn Ser Ser Ser

50 55 60

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Ala Ser

65 70

<210> 11

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 11

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala

20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

35 40

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 12

Val Asp Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Glu

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 13

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Arg Met Asp Glu

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody heavy chain

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65				70				75				80			
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
85				90				95							
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro
100				105				110							
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
115				120				125							
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
130				135				140							
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145				150				155				160			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
165				170				175							
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
180				185				190							
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
195				200				205							
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
210				215				220							
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225				230				235				240			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
245				250				255							
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
260				265				270							
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
275				280				285							
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
290				295				300							
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305				310				315				320			

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody light chain

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 17

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody Fc region

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

Leu Ser Leu Gly

225

<210> 18

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody Fc region

<400> 18

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

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

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly
225

<210> 19

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

antibody Fc region

<400> 19

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly
225

<210> 20

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody Fc region

<400> 20

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly

225

<210> 21

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 21

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

[illegible]

<210> 22

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 22

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

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

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly

<210> 23

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 23

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

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

 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly

 <210> 24
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lipocalin mutein
 <400> 24
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

 Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

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

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

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly

<210> 25

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 25

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

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

Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser
85 90 95

Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr
100 105 110

Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu
115 120 125

Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu
130 135 140

Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu
145 150 155 160

Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
165 170 175

<210> 26

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 26

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

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

165 170 175
 Asp Gly

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 27

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

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

100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

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

165 170 175
 Asp Gly

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 28

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

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

100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175
 Asp Gly

<210> 29

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 29

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

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

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

145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

 165 170 175
 Asp Gly

 <210> 30
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lipocalin mutein
 <400> 30
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

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

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

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 31

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 31

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Arg Ser Asp Leu Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 32

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 32

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Tyr Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Leu Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 33

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 33

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln His Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 34

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 34

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asp Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 35

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 35

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Ile Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 36

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 36

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Val Asp Lys Asp Pro

35 40 45

His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Tyr Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 37

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 37

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

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

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

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

 165 170 175
 Asp Gly

<210> 38

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 38

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30
Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45
His Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Asn Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60
Asn Val Thr Asp Val Met Phe Leu Asp Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Ile

65 70 75 80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95
Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125
Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175
Asp Gly

<210> 39

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 39

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

Val Val Gly Met Ala Gly Asn Asn Leu Leu Arg Asp Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Asp Val Met Leu Leu Asp Lys Lys Cys His Tyr Ile Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Thr Leu Gly Phe

85 90 95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly His Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ser Val Ile Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 40

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 41

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 42

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp

1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 44

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody CDR

<400> 45

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody heavy chain variable region

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody light chain variable region

<400> 47

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

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody heavy chain

<400> 48

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

1 5 10 15

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

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

85	90	95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
320		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 49

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody heavy chain

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 50

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody light chain

<400> 50

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 51

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100				105				110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				115				120				125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
				130				135				140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145				150				155				160			
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165				170				175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180				185				190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
				195				200				205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
210				215				220							
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225				230				235				240			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245				250				255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
				260				265				270			
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
275				280				285							
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
290				295				300							
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305				310				315				320			

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp
 450 455 460

Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu
 465 470 475 480

Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val
 485 490 495

Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys
 500 505 510

Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val
 515 520 525

Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr
 530 535 540

Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys
 545 550 555 560

Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn

565 570 575
Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg
580 585 590

Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser
595 600 605

Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro
610 615 620

Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
625 630 635 640

<210> 52

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 52

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

210

215

220

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

225

230

235

240

Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe

245

250

255

His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg

260

265

270

Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys

275

280

285

Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys

290

295

300

Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu

305

310

315

320

Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu

325

330

335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe

340

345

350

Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly

355

360

365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe

370 375 380
 Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro

385 390 395 400
 Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
 405

<210> 53
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> fusion protein
 <400> 53

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

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

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

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175
Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

180 185 190
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

195 200 205
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
210 215 220

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

225 230 235 240
Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser

245 250 255
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala

260 265 270
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

275 280 285
Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

290 295 300
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

305 310 315 320
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

325 330 335
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

340 345 350
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

355 360 365
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

370 375 380
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

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

405 410 415
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

420 425 430
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

435 440 445
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

450 455 460
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

465 470 475 480
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

485 490 495
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

500 505 510
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

515 520 525
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

530 535 540
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

545 550 555 560
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

565 570 575
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

580 585 590
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

595 600 605
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

610 615 620
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

625 630 635 640

<210> 54

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 54

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys

85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

180 185 190

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

195 200 205

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

210	215	220
Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu		
225	230	235
Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		
245	250	255
Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
260	265	270
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro		
275	280	285
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
290	295	300
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
305	310	315
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
325	330	335
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
340	345	350
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
355	360	365
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
370	375	380
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
385	390	395
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
405		
<210>	55	
<211>	449	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody heavy chain	
<400>	55	

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

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

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

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

245					250					255									
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
260					265					270									
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
275					280					285									
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
290					295					300									
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
305					310					315					320				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys				
325					330					335									
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
340					345					350									
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
355					360					365									
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
370					375					380									
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
385					390					395					400				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
405					410					415									
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
420					425					430									
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
435					440					445									

Lys

<210> 56

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody light chain

<400> 56

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215