(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0020679
(43) 공개일자 2025년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2878* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)
(21) 출원번호 10-2025-7001736(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년08월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7006394
원출원일자(국제) 2018년08월02일
심사청구일자 2021년08월02일
(85) 번역문제출일자 2025년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/071002
(87) 국제공개번호 WO 2019/025545
국제공개일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
PCT/EP2017/069839 2017년08월04일
유럽특허청(EPO)(EP)
PCT/EP2018/052946 2018년02월06일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
**젠맵 에이/에스**
덴마크 2500 발뷔 칼 야콥센 바이 30
**비온테크 에스이**
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12
(72) 발명자
**알틴타스, 이실**
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 윕살라란 15 젠맵 비.브이. 내
**사틴, 다비드**
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 윕살라란 15 젠맵 비.브이. 내
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 김영**

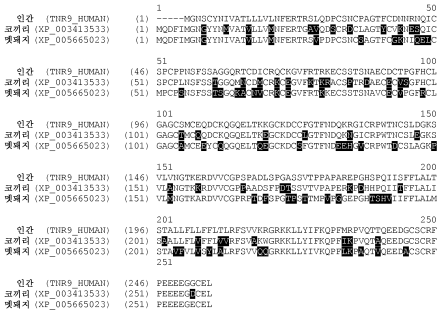
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **PD-L1 및 CD137에 결합하는 결합제 및 그의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 신규 결합제 및 의약에서의 그의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간 PD-L1에 결합하고 인간 CD137에 결합하는 이중특이적 항체와 같은 결합제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 항체의 용도, 및 본 발명의 항체를 생산하기 위한 방법, 핵산 구축물 및 숙주 세포에 관한 것이다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*C07K 16/2827* (2013.01)
*A61K 2039/505* (2013.01)
*C07K 2317/24* (2013.01)
*C07K 2317/31* (2013.01)
(72) 발명자
**라데마커, 릭**
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 윕살라란 15 젠맵 비.브이. 내
**파렌, 폴**
네덜란드 피알 오데이크 3984 베르도퍼바르트 17
**사힌, 우르**
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 아게 내
**기세케, 프리데리케**
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 아게 내
**무이크, 알렉산더**
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 아게 내
**그룬비츠, 크리스티안**
독일 55131 마인츠 안 데어 골트그루베 12 비온테크 아게 내
**판 데르 브링크, 에드바르트**
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 윕살라란 15 젠맵 비.브이. 내
**페르제일, 데니스**
네덜란드 씨티 유트레흐트 3584 윕살라란 15 젠맵 비.브이. 내

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

용도.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 결합제 및 의약에서의 그의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간 PD-L1에 결합하고 인간 CD137에 결합하는 결합제, 예컨대 이중특이적 항체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 결합제의 용도, 및 본 발명의 항체를 생산하기 위한 방법, 핵산 구축물 및 숙주 세포에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] CD137 (4-1BB, TNFRSF9)는 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 (TNFR) 패밀리의 구성원이다. CD137은 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포, 조절 T 세포 (Treg), 자연 킬러 (NK) 및 NKT 세포, B 세포 및 호중구 상의 공동-자극 분자이다. T 세포 상에서, CD137은 구성적으로 발현되는 것이 아니라 T-세포 수용체 (TCR)-활성화시에 유도된다. 그의 천연 리간드 4-1BBL 또는 효능제 항체를 통한 자극은 어댑터로서 TNFR-연관 인자 (TRAF)-2 및 TRAF-1을 사용하는 신호전달을 유도한다. CD137에 의한 초기 신호전달은 K-63 폴리-유비퀴틴화 반응을 수반하며 이는 궁극적으로 핵 인자(NF)-κB 및 미토겐-활성화 단백질(MAP)-키나제 경로의 활성화를 유발한다. 신호전달은 증가된 T 세포 공동-자극, 증식, 시토카인 생산, 성숙 및 연장된 $CD8^+$ T-세포 생존을 유도한다. CD137에 대한 효능작용 항체는 다양한 전임상 모델에서 T 세포에 의한 항종양 제어를 촉진하는 것으로 나타났다 (Murillo et al. 2008 Clin. Cancer Res. 14(21): 6895-6906). CD137을 자극하는 항체는 T 세포의 생존 및 증식을 유도하여, 항종양 면역 반응을 증진시킬 수 있다. CD137을 자극하는 항체는 선행 기술에 개시되었고, 인간 IgG4 항체인 우렐루맙 (WO2005035584) 및 인간 IgG2 항체인 우토밀루맙 (Fisher et al. 2012 Cancer Immunol. Immunother. 61: 1721-1733)을 포함한다.

[0003] 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1)은 33 kDa의 단일-통과 유형 I 막 단백질이다. 선택적 스플라이싱에 기초하여 PD-L1의 3종의 이소형이 기재되었다. PD-L1은 이뮤노글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리에 속하고, 하나의 Ig-유사 C2-형 도메인 및 하나의 Ig-유사 V-형 도메인을 함유한다. 새로 단리된 T 및 B 세포는 무시할만한 양의 PD-L1을 발현하고, 소정 분율 (약 16%)의 $CD14^+$ 단핵구는 PD-L1을 구성적으로 발현한다. 그러나, 인터페론-γ (IFNγ)가 종양 세포 상에서 PD-L1을 상향조절하는 것으로 공지되어 있다.

[0004] PD-L1은 1) 활성화된 T 세포 상의 그의 수용체인 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1) (CD279)에 결합하여 종양-반응성 T 세포를 관용화하고; 2) 종양 세포-발현된 PD-L1을 통한 PD-1 신호전달에 의해 종양 세포를 $CD8^+$ T 세포 및 Fas 리간드-매개된 용해에 대해 저항성을 갖도록 하고; 3) T 세포-발현된 CD80 (B7.1)을 통한 역 신호전달에 의해 T 세포를 관용화하고; 4) 유도된 T 조절 세포의 발생 및 유지를 촉진함으로써 항종양 면역을 방해한다. PD-L1은 흑색종, 난소암, 폐암 및 결장암을 포함한 많은 인간 암에서 발현된다 (Latchman et al., 2004 Proc Natl Acad Sci USA 101, 10691-6).

[0005] PD-L1 차단 항체는 PD-L1을 과다발현하는 것으로 공지된 여러 암 (흑색종, NSCLC 포함)에서 임상 활성을 나타냈다. 예를 들어, 아테졸리주맙은 PD-L1에 대한 인간화 IgG1 모노클로날 항체이다. 이는 현재 다양한 유형의 고형 종양을 포함한 여러 적응증에 대한 면역요법으로서 임상 시험 중이고 (예를 들어 문헌 [Rittmeyer et al., 2017 Lancet 389:255-265] 참조), 비소세포 폐암 및 방광암 적응증에 대해 승인되어 있다. PD-L1 항체인 아벨루맙 (Kaufman et al. Lancet Oncol. 2016;17(10):1374-1385)은 전이성 메르켈 세포 암종을 갖는 성인 및 12세 이상의 소아 환자의 치료에 대해 FDA에 의해 승인되었고, 현재 방광암, 위암, 두경부암, 중피종, NSCLC, 난소암 및 신암을 포함한 여러 암 적응증에 대해 임상 시험 중이다. PD-L1 항체인 두르발루맙은 국부 진행성 또는 전이성 요로상피 암종 적응증에 대해 승인되어 있고, 다수의 고형 종양 및 혈액 암에 대해 임상 개발 중이다 (예

를 들어 문헌 [Massard et al., 2016 J Clin Oncol. 34(26):3119-25] 참조). 추가의 항-PD-L1 항체는 WO2004004771, WO2007005874, WO2010036959, WO2010077634, WO2013079174, WO2013164694, WO2013173223 및 WO20140227758에 기재되었다.

[0006] 문헌 [Horton et al. (J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): O10)]은 효능작용 4-1BB 항체와 중화 PD-L1 항체의 조합을 개시한다.

[0007] 우토밀루맙과 아벨루맙의 조합 요법이 현재 임상 시험 중이다 (Chen et al., J Clin Oncol 35, 2017 suppl; abstr TPS7575, and clinical trial NCT02554812).

[0008] 그러나, 관련 기술분야의 진보에도 불구하고, PD-L1 및 CD137 둘 다에 결합할 수 있는 다중특이적 항체에 대한 필요성이 존재한다. 이들은 PD-L1-발현 항원-제시 세포 (APC) 또는 종양 세포 및 CD137-발현 T 세포에 동시에 결합하여, (세포독성) T 세포의 조건부 활성화를 유발할 것이다. 활성화된 T 세포 상에서 발현된 PD1에 대한 PD-L1 결합은 T 세포 억제를 유발할 것이다. 따라서, 본 발명의 목적은 PD-L1xCD137 이중특이적 결합제, 예컨대 PD1-(PD-L1) 억제 신호전달을 차단하고 동시에 활성화된 T 세포 상에서 발현된 CD137 분자에 대한 트랜스 결합을 통해 (여기서 활성화는 트랜스 결합을 통해 발생함) T 세포를 공동-자극하는 것인 이중특이적 항체를 제공하는 것이다. 이는 항종양 면역의 효율적인 유도를 일으킬 수 있다. 본 발명의 추가의 목적은 불활성 Fc 영역을 갖거나 또는 대안적으로 Fc 결합 영역을 갖지 않는 PD-L1xCD137 이중특이적 결합제를 제공하여, CD137에 결합하는 경우 T 세포 상의 보체-의존성 세포독성 (CDC) 또는 다른 Fc-매개된 이펙터 기능을 유도하지 않는 이중특이적 결합제를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 T 세포를 활성화시키기에 적합한 PD-L1xCD137 이중특이적 결합제를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 종양-특이적 T 세포, 예컨대 종양 침윤 T 세포를 활성화시키기에 적합한 PD-L1xCD137 이중특이적 결합제를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 본 분야에서의 현행 치료 옵션과 비교하여 개선된 독성학 프로파일을 갖는 이중특이적 결합제를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 본 분야에서의 현행 치료 옵션과 비교하여 개선된 효능 프로파일을 갖는 결합제를 제공하는 것이다.

## *발명의 내용*

[0009] 제1 측면에서, 본 발명은 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 제2 항원-결합 영역은 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 억제하는 것인 결합제를 제공한다. 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 이러한 결합제는 다음 이중 효과를 갖는다:

[0010] 첫번째로, 그의 PD-L1 결합 영역을 통해, 결합제는 PD-L1-발현 종양 세포 또는 항원-제시 세포 (APC)에 결합하고, 한편 그의 CD137-결합 영역을 통해, 결합제는 T 세포에 결합하고 이를 활성화시켜 T 세포의 조건부 활성화를 유발한다. 따라서, 이론에 얽매이지는 않지만, 본 발명에 따른 결합제는 결합제가 PD-L1 및 CD137에 동시에 결합하는 경우에 CD137의 클러스터링을 매개할 수 있다. 결합제에 의한 CD137의 클러스터링은 이러한 수용체의 충분한 활성화 및 T 세포의 CD137-매개된 공동-자극에 필요하다. 두번째로, 결합제는 이에 따라 T 세포를 종양 세포에 근접하게 가져가, T 세포에 의한 종양 세포 사멸을 용이하게 한다. 추가로, 임의의 특정 이론에 의해 제한되지는 않지만, PD-L1-발현 종양 세포와 이펙터 T 세포, 예컨대 $CD8^+$ T 세포를 서로에 근접하게 가져오는 것은 인터페론-γ의 방출을 개시할 수 있고, 이는 다시 종양 세포 상에서 PD-L1을 상향조절할 수 있고, 이에 따라 종양에 대한 보다 많은 결합제의 동원을 용이하게 하고, 그의 사멸을 추가로 증진시킬 수 있는 것으로 가정된다.

[0011] 마지막으로, 본 발명의 결합제는 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 억제하여, PD-L1이 PD-1을 통한 항종양 면역을 방해하는 것을 방지한다. 따라서, 결합제는 T 세포가 PD-1/PD-L1 상호작용을 통한 억제 신호를 받는 것을 방지하면서 CD137 분자에 대한 결합을 통해 활성화 신호를 받아 T 세포 증식, 활성화, 이펙터 및 기억 기능을 강화시키는 신호전달을 유발한다.

[0012] 본 발명의 PD-L1xCD137 결합제는 활성화 수용체, 예컨대 CD137의 자극 및 T 세포 상의 억제 신호, 예컨대 PD-1/PD-L1의 차단이 동시에 달성될 수 있는 치료 환경에서 특히 유용하다. 이는 개별적으로 CD137을 자극하고 PD-L1을 통해 PD-1/PD-L1을 차단하는 것보다 더 높은 규모의 T 세포 증식, 활성화 및 생존을 유발할 수 있다.

[0013] 본 발명의 한 실시양태에서, PD-L1xCD137 결합제는 이중특이적 항체이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 가지며, 여기서 제2 항원-결합 영역은 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 억제하

는 것인 이중특이적 항체이다.

[0015] 본 발명의 추가 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 a) 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호(SEQ ID NO): 9, 10, 11에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 각각 서열식별번호: 13, GAS, 14에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, b) 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19, 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0016] 대안적으로, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 a) 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 50, 51, 52에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 각각 서열식별번호: 54, SAS, 55에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, b) 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19, 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 결합제는 인간화 항체로부터 유래된, 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역, 및/또는 인간 항체로부터 유래된, 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함한다.

[0018] 추가 측면에서, 본 발명은 특히 암의 치료를 위한 의약에서의 본 발명의 결합제의 용도에 관한 것이다.

[0019] 이러한 결합제, 예를 들어 항체의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산; 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터; 이러한 핵산 또는 발현 벡터를 포함하는 세포; 이러한 결합제, 핵산, 발현 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물; 암 또는 다른 질환을 치료하는데 사용하기 위한 이러한 결합제, 핵산, 발현 벡터, 세포 또는 조성물; 이러한 결합제, 예를 들어 이중특이적 항체의 생산 방법; 및 이러한 결합제, 예를 들어 다중특이적, 특히 이중특이적 항체에 기초하는 진단 방법 및 키트를 포함한, 본 발명의 이들 및 다른 측면 및 실시양태가 하기에 추가로 상세히 기재되어 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0020] 도 1: 인간, 아프리카 코끼리 및 멧돼지 CD137에 대한 서열 정렬. 인간 서열에서의 아미노산과 상이한 아프리카 코끼리 및 멧돼지 CD137에서의 아미노산은 흑색으로 강조되어 있다.

도 2: 아프리카 코끼리 (서플 5) 또는 멧돼지 (서플 1-4, 6) CD137 도메인을 함유하는 CD137 서플 구축물.

도 3: HEK293-T17 세포 상의 CD137 서플 구축물의 발현. HEK293-T17 세포를 CD137 서플 구축물로 형질감염시켰다. 인간, 멧돼지 및 아프리카 코끼리 CD137을 인식하는 폴리클로날 항-CD137 항체를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 구축물의 세포 표면 발현을 측정하였다.

도 4: HEK293-T17 세포 상에서 발현된 CD137 서플 구축물에 대한 항체 CD137-009의 결합. HEK293-T17 세포를 CD137 서플 구축물, 및 인간 CD137 (hCD137 wt), 아프리카 코끼리 또는 멧돼지 CD137으로 형질감염시켰다. HEK293-T17 세포 상에서 발현된 이들 구축물에 대한 항체 CD137-009의 결합을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 폴리클로날 항-CD137 항체를 사용한 염색은 대조군으로서 제시된다.

도 5: PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 1가 항체 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 효과. PD-1/PD-L1 억제 생물검정에서 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 효과를 결정하였다. 제시된 데이터는 하나의 대표적인 실험에 대한 대조군 (첨가된 항체 부재) 대비 배수 유도였다.

도 6: CD137xPD-L1 이중특이적 항체의 예상되는 작용 방식의 개략적 표현. (A) PD-L1은 항원-제시 세포 (APC) 뿐만 아니라 종양 세포 상에서 발현된다. 음성 조절 분자 PD-1을 발현하는 T 세포에 대한 PD-L1 결합은 T 세포 활성화 신호를 효과적으로 중단시키고, 결국 T 세포 억제를 유도한다. (B) CD137xPD-L1 이중특이적 항체의 첨가시에, 억제 PD-1:PD-L1 상호작용은 PD-L1-특이적 아암을 통해 차단되고, 동시에 이중특이적 항체는 세포-세포 상호작용을 통해 T 세포 상에서 발현된 CD137에 효능작용 신호전달을 제공하여 강한 T 세포 공동자극을 유발한다.

도 7: 활성 PD-1/PD-L1 축을 갖는 항원-특이적 T 세포 검정에서 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR에 의한 PD-

1/PD-L1-매개된 T 세포 억제 및 $CD8^+$ T 세포 증식의 추가의 공동-자극의 공개. 클라우딘-6-특이적 TCR- 및 PD-1-시험관내 번역된 (IVT)-RNA가 전기천공으로 도입된 CFSE-표지된 T 세포를 5일 동안 0.1 μg/mL 및 0.02 μg/mL CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR, b12-FEALxPD-L1-547-FEAR 또는 b12 대조군 항체의 존재 하에 클라우딘-6-IVT-RNA-전기천공된 미성숙 수지상 세포와 함께 인큐베이션하였다. $CD8^+$ T 세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 제시된 데이터는 (A 및 C) 2종의 상이한 공여자로부터의 대표적인 CFSE 히스토그램 및 (B 및 D) 플로우조(FlowJo) 소프트웨어를 사용하여 계산된, 상응하는 분열 세포 백분율 및 증식 지수이다. (B)는 (A)에 대표적으로 제시된 공여자 1로부터의 데이터의 분석을 보여준다. (D)는 (C)에 대표적으로 제시된 공여자 2로부터의 데이터의 분석을 보여준다. 오차 막대 (SD)는 실험 (1종의 공여자로부터의 세포를 사용하는 3회의 반복실험) 내의 변동을 나타낸다.

도 8: 활성 PD1/PD-L1 축을 갖는 항원-특이적 T 세포 검정에서 이중특이적 항체 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR의 $EC_{50}$ 값의 분석. 클라우딘-6-특이적 TCR- 및 PD-1-IVT-RNA가 전기천공으로 도입된 CFSE-표지된 T 세포를 5일 동안 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR (1 내지 0.00015 μg/mL의 3배 연속 희석물)의 존재 하에 클라우딘-6-IVT-RNA-전기천공된 미성숙 수지상 세포와 함께 인큐베이션하였다. $CD8^+$ T 세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 제시된 데이터는 항체 농도의 함수로서의 분열 세포 백분율 (빈 다이아몬드) 및 증식 지수 (채워진 삼각형)이다. 오차 막대 (SD)는 실험 (1종의 공여자로부터의 세포를 사용하는 6회의 반복실험) 내의 변동을 나타낸다. 비선형 회귀에 의해 곡선을 피팅시키고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 $EC_{50}$ 값을 결정하였다.

도 9: 활성 PD1/PD-L1 축을 갖는 항원-특이적 T 세포 검정에서 2종의 1가 결합 CD137 항체의 조합 (CD137-009-FEALxb12-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) 또는 2종의 모 항체의 조합 (CD137-009 + PD-L1-547)과의 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR의 비교. 클라우딘-6-특이적 TCR- 및 PD1-IVT-RNA가 전기천공으로 도입된 CFSE-표지된 T 세포를 5일 동안 0.25 μg/mL (i) CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR, (ii) CD137-009-FEALxb12 + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, (iii) CD137-009-FEALxb12, (iv) b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, (v) CD137-009 + PD-L1-547, (vi) CD137-009, (vii) PD-L1-547, 또는 (viii) b12 대조군 항체의 존재 하에 클라우딘-6-IVT-RNA 전기천공된 미성숙 수지상 세포와 함께 인큐베이션하였다. $CD8^+$ T 세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 제시된 데이터는 (A) 대표적인 CFSE 히스토그램 및 (B 및 C) 플로우조 소프트웨어를 사용하여 계산된, 상응하는 분열 세포 퍼센트 및 증식 지수의 평균 값이다. 오차 막대 (SD)는 실험 (1종의 공여자로부터의 세포를 사용하는 3회의 반복실험) 내의 변동을 나타낸다.

도 10: CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR에 의한 인간 비소세포 폐암 조직 절제물로부터의 종양 침윤 림프구 (TIL)의 생체외 확장. 절제된 조직으로부터의 종양 조각을 10 U/mL IL-2 및 나타낸 농도의 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR과 함께 배양하였다. 10일의 배양 후, 세포를 수거하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. (A) 비처리 대조군과 비교한 배수 확장으로서의 TIL 수, (B) 비처리 대조군과 비교한 배수 확장으로서의 $CD3^+CD8^+$ T 세포 수, (C) 비처리 대조군과 비교한 배수 확장으로서의 $CD3^+CD4^+$ T 세포 수, (D) 비처리 대조군과 비교한 배수 확장으로서의 $CD3^-CD56^+$ NK 세포 수. 막대는 출발 물질로서 웰당 2개의 종양 조각을 갖는 n=5 개별 웰의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 11: OT-I 입양 세포 전달 설정에서 항원-특이적 T 세포 증식에 대한 mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A 마우스 대용 항체의 효과. 공여자 마우스로부터 단리된 오브알부민 (OVA) 특이적 $OT1^+Thy1.1^+$ 이중 양성 세포독성 T 세포를 나이브 C57BL/6 수용자 마우스 내에 안와후로 (r.o.) 주사하였다. 입양 세포 전달 다음 날, 수용자 마우스에게 항원 자극으로서 100 μg OVA를 r.o. 주사하고, 이어서 마우스당 100 μg 또는 20 μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 또는 mPD-L1-MPDL3280Axb12 항체를 r.o. 주사하였다. PBS의 주사 (도면에서 OVA 단독으로 나타냄)를 기준선 참조로서 사용하고, 비처리 동물을 음성 대조군으로서 사용하였다. 6일 후, 100 μL 혈액을 r.o. 경로를 통해 채취하고, $Thy1.1^+CD8^+$ T 세포에 대해 분석하였다. 제시된 데이터는 (A) OT-I 입양 세포 전달 실험 윤곽의 개략적 표현, 및 (B) 제6일에서 각각의 처리군에 대한 $Thy1.1^+CD8^+$ T 세포 빈도이다. 사각형은 개별 동물을 나타내고, 오차 막대 (SD)는 실험 내의 변동을 나타낸다 (군당 n=5 마우스). 일원 아노바와 터키 다중 비교 검정을 사용하여 통계적 분석을 수행하였다; ns = 군들 사이의 유의차 부재, *** = $P< 0.001$.

도 12: 피하 동계 CT26 마우스 종양 모델에서 mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A 마우스 대용 항체의 항종양 효능. 피하 CT26 종양을 보유하는 암컷 BALB/c 마우스를 종양이 부피 ≥ 30 $mm^3$에 도달한 후에 마우스당 20 μg (i) mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, (ii) mCD137-3H3xb12 또는 (iii) mPD-L1-MPDL3280Axb12 항체, 또는 (iv) PBS의 복강내 주사로 처리하였다. 투여 스케줄은 다음과 같았다: 처음 8회의 주사의 경우 2-3일마다, 이어서 실험 종료시까지 7일마다 주사. 제29일에, 100 μL 혈액을 r.o. 경로를 통해 채취하고, gp70-특이적 $CD8^+$ T 세포에 대해 분석하였다. 제시된 데이터는 (A) 각각의 선이 단일 마우스를 나타내는 종양 성장 곡선, (B) 생성된 카플란-마이어 생존 분석, 및 (C) 이식후 제29일에서 각각의 처리군에 대한 gp70-특이적 $CD8^+$ T-세포 빈도이다. PFS = 무진행 생존.

도 13: 종양 세포에 대한 단일특이적 2가 PD-L1 항체 및 1가 b12xPD-L1 항체의 결합. MDA-MB-231 (A), PC-3 (B) 및 SK-MES-1 (C) 세포에 대한 PD-L1-547 및 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 결합. 제시된 데이터는 유동 세포측정법에 의해 결정된 평균 형광 강도 (MFI)이다. 단일특이적 2가 b12 항체를 음성 대조군으로서 포함시켰다.

도 14: 위치 1 내지 163에서 알라닌 돌연변이를 갖는 CD137 변이체에 대한 CD137 항체의 결합. 결합은 대조군 항체와 비교한 결합의 변화에 대한 척도로서 z점수(배수 변화)로 표현하였다. z점수(배수 변화)는 (정규화된 $gMFI_{aa\ 위치}$ - μ)/σ로 정의되며, 여기서 μ 및 σ는 모든 돌연변이체에 걸친 정규화된 gMFI의 평균 및 표준 편차이다. 결합에 대한 z점수가 - 1.5 미만인 잔기 (점선으로 나타냄)는 '결합 돌연변이체의 상실'로 간주하였다. 결합에 대한 양의 z점수를 갖는 잔기는 비-교차 차단 CD137 특이적 대조군 항체에 대한 결합 잔기의 상실이다. x-축 상의 숫자는 아미노산 위치를 지칭한다. (A) 정규화를 위한 비-교차 차단 CD137-특이적 대조군 항체로서 CD137-005-FEAR-A488을 사용하여, 위치 1 내지 163에서 알라닌 또는 글리신 돌연변이를 갖는 CD137 변이체에의 b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488의 결합에 대한 z점수. (B) 정규화를 위한 비-교차 차단 CD137-특이적 대조군 항체로서 CD137-MOR7480-FEAR-A488을 사용하여, 위치 1 내지 163에서 알라닌 또는 글리신 돌연변이를 갖는 CD137 변이체에의 CD137-005-FEAR-A488의 결합에 대한 z점수. (C) 정규화를 위한 비-교차 차단 CD137-특이적 대조군 항체로서 CD137-005-FEAR-A488을 사용하여, 위치 1 내지 163에서 알라닌 또는 글리신 돌연변이를 갖는 CD137 변이체에의 CD137-MOR7480-FEAR-A488의 결합에 대한 z점수.

도 15: 비-항원-특이적 T-세포 증식 검정에서 2종의 1가 대조군의 조합 (b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) 또는 2종의 모 항체의 조합 (CD137-009-HC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR)과의 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 비교. CFSE-표지된 PBMC를 준최적 농도의 항-CD3 항체 (0.03 μg/mL 및 0.1 μg/mL)와 함께 또는 항-CD3 항체 없이 (T-세포 활성화에 대한 음성 대조군으로서) 인큐베이션하고, 4일 동안 0.2 μg/mL i) PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR, ii) b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR 각각, iii) b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR, iv) b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, v) CD137-009-HC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR 각각, vi) CD137-009-HC7LC2-FEAR, vii) PD-L1-547-FEAR, 또는 viii) b12-IgG-FEAL 대조군 항체의 존재 하에 배양하였다. $CD4^+$ (A) 및 $CD8^+$ (B) T-세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 플로우조 v10.4 소프트웨어를 사용하여 계산된 3회의 반복실험의 평균 확장 지수로서 3종의 공여자로부터의 데이터가 제시된다. 오차 막대 (SD)는 실험 (1종의 공여자로부터의 세포를 사용하는 3회의 반복실험) 내의 변동을 나타낸다.

도 16: 비-항원-특이적 T-세포 증식 검정에서 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEARx에 의한 T-세포 증식 유도에 대한 $EC_{50}$ 값의 결정. CFSE-표지된 PBMC를 4일 동안 준최적 농도의 항-CD3 항체 및 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 연속 희석물 (1 - 0.00015 μg/mL) 또는 대조군 항체로서의 1 μg/mL b12 IgG와 함께 인큐베이션하였다. 2종의 대표적인 공여자로부터의 데이터가 제시되며; 공여자 1로부터의 PBMC를 0.03 μg/mL 항-CD3으로 자극하고 (A, B) 및 공여자 2로부터의 PBMC를 0.09 μg/mL 항-CD3으로 자극하였다 (C, D). $CD4^+$ (A 및 C) 및 $CD8^+$ (B 및 D) T-세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 제시된 데이터는 플로우조 v10.4 소프트웨어를 사용하여 계산되고 4 파라미터 로그 피트로 피팅된, 3회의 반복실험의 평균 확장 지수 값이다. 오차 막대 (SD)는 실험 (1종의 공여자로부터의 세포를 사용하는 3회의 반복실험) 내의 변동을 나타낸다.

도 17: T 세포 내로의 PD-1 전기천공이 존재 또는 부재하는 항원-특이적 T-세포 검정에서 10종의 염증유발 시토카인의 분비에 대한 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 효과. CLDN6-특이적 TCR-IVT-RNA가 전기천공으로 도입되고, 2 μg PD1-IVT-RNA가 전기천공으로 도입되거나 또는 도입되지 않은 T 세포를 상이한 농도의

CD137-009-HC7LC2-FEALxPD-L1-547-FEAR (3배 연속 희석물; 1 μg/mL 내지 0.00015 μg/mL 범위) 또는 b12 대조군 항체 b12-IgG-FEAL의 존재 하에 CLDN6-IVT-RNA-전기천공된 iDC와 함께 인큐베이션하였다. MSD V-플렉스 인간 염증유발 패널 1 (10-플렉스) 키트를 사용하는 멀티플렉스 샌드위치 면역검정에 의해 항체 첨가 48시간 후 상청액의 시토카인 수준을 결정하였다. 각각의 데이터 포인트는 3개의 개별 웰의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 18: 항원-비특이적 T-세포 검정에서 10종의 염증유발 시토카인의 분비에 대한 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 효과. 인간 PBMC를 상이한 농도의 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR (3배 연속 희석물; 1 μg/mL 내지 0.00015 μg/mL 범위) 또는 b12 대조군 항체 b12-IgG-FEAL의 존재 하에 항-CD3 항체를 사용하여 준최적으로 자극하였다. MSD V-플렉스 인간 염증유발 패널 1 (10-플렉스) 키트를 사용하는 멀티플렉스 샌드위치 면역검정에 의해 항체 첨가 48시간 후 상청액 중 시토카인 수준을 결정하였다. 각각의 데이터 포인트는 3개의 개별 웰의 평균 ± SD를 나타낸다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0021] 정의

[0022] 용어 "이뮤노글로불린"은 1쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 1쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 쇄로 이루어지고, 4개 모두 디술피드 결합에 의해 상호연결된, 구조적으로 관련된 당단백질의 부류를 지칭한다. 이뮤노글로불린의 구조는 잘 특징화되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))]을 참조한다. 간략하게, 각각의 중쇄는 전형적으로, 중쇄 가변 영역 (본원에서 $V_H$ 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역 (본원에서 $C_H$ 또는 CH로 약칭됨)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 전형적으로 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 힌지 영역은 중쇄의 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역이고, 고도로 가요성이다. 힌지 영역 내의 디술피드 결합은 IgG 분자 내의 2개의 중쇄 사이의 상호작용의 일부이다. 각각의 경쇄는 전형적으로, 경쇄 가변 영역 (본원에서 $V_L$ 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역 (본원에서 $C_L$ 또는 CL로 약칭됨)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 전형적으로 1개의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역들 사이에 삽입된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 지칭되는 초가변성의 영역 (또는 구조적으로 규정된 루프의 서열 및/또는 형태가 초가변성일 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] 참조). 달리 언급되지 않거나 또는 문맥에 의해 모순되지 않는 한, 본원에서의 CDR 서열은 도메인갭얼라인(DomainGapAlign)을 사용하여 IMGT 규칙에 따라 확인된다 (문헌 [Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999;27:209-212 and Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010)]; 또한 인터넷 http 주소 www.imgt.org/ 참조). 달리 언급되지 않거나 또는 문맥에 의해 모순되지 않는 한, 본 발명에서 불변 영역 내의 아미노산 위치에 대한 언급은 EU-넘버링에 따른 것이다 (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). 예를 들어, 본원의 서열식별번호: 93은 IgG1m(f) 중쇄 불변 영역의 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 118-447을 제시한다.

[0023] 본원에 사용된 용어 "위치...에 상응하는 아미노산"은 인간 IgG1 중쇄 내의 아미노산 위치 번호를 지칭한다. 다른 이뮤노글로불린 내의 상응하는 아미노산 위치는 인간 IgG1과의 정렬에 의해 발견될 수 있다. 따라서, 또 다른 서열 내의 아미노산 또는 절편"에 상응하는"은 하나의 서열 내의 아미노산 또는 절편은 표준 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ALIGN, 클러스탈W 또는 유사한 것을 사용하여, 전형적으로 디폴트 세팅에서 다른 아미노산 또는 절편과 정렬되고 인간 IgG1 중쇄에 대해 적어도 50%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 것이다. 서열 또는 서열 내의 절편을 정렬하고 이에 의해 본 발명에 따른 아미노산 위치에 대해 서열 내의 상응하는 위치를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 주지된 것으로 간주된다.

[0024] 본 발명의 문맥에서 용어 "결합제"는 목적하는 항원에 결합할 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 결합제는 항체, 항체 단편 또는 그의 구축물이다. 결합제는 또한 합성, 변형 또는 비-자연 발생 모이어티, 특히 비-펩티드 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 모이어티는, 예를 들어 목적하는 항원-결합 관능기 또는 영역, 예컨대 항체 또는 항체 단편을 연결할 수 있다. 한 실시양태에서, 결합제는 항원-결합 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 합성 구축물이다.

[0025] 본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들 중 어느 하나의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에서 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1

시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 유의한 기간, 또는 임의의 다른 관련된 기능적으로 정의된 기간 (예컨대 항원에 대한 항체 결합과 연관된 생리학적 반응을 유도, 촉진, 증진 및/또는 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는데 충분한 시간)의 반감기로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 본원에 사용된 용어 "항원-결합 영역"은 항원과 상호작용하고 VH 영역 및 VL 영역 둘 다를 포함하는 영역을 지칭한다. 본원에 사용된 경우의 용어 항체는 단일특이적 항체, 뿐만 아니라 다수의, 예컨대 2개 이상, 예를 들어 3개 이상의 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 다중특이적 항체를 포함한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체계의 성분, 예컨대 보체 활성화의 전형적 경로에서의 제1 성분인 C1q를 포함한 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 본원의 용어 항체는 달리 언급되지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 모순되지 않는 한, 항원-결합 단편인, 즉 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "항체" 내에 포괄되는 항원-결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편 또는 WO2007059782 (젠맙(Genmab))에 기재된 바와 같은 1가 항체인 Fab' 또는 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 본질적으로 이루어지고 또한 도메인 항체 (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90)로 불리는 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) 낙타류 또는 나노바디 분자 (Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인 VL 및 VH가 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 VL 및 VH 영역이 쌍형성하여 1가 분자 (단일 쇄 항체 또는 단일 쇄 Fv (scFv)로 공지됨, 예를 들어 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) 및 Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다. 이러한 단일 쇄 항체는 달리 언급되지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 나타내지 않는 한 용어 항체 내에 포괄된다. 이러한 단편은 일반적으로 항체의 의미 내에 포함되지만, 이들은 집합적으로 및 각각 독립적으로 상이한 생물학적 특성 및 유용성을 나타내는 본 발명의 고유한 특색이다. 본 발명의 문맥에서 이들 및 다른 유용한 항체 단편, 뿐만 아니라 이러한 단편의 이중특이적 포맷이 본원에 추가로 논의된다. 또한, 달리 명시되지 않는 한, 용어 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 공지된 기술, 예컨대 효소적 절단, 펩티드 합성 및 재조합 기술에 의해 제공되는, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편 (항원-결합 단편)을 또한 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 생성된 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다. 본원에 사용된 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 부류 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE 또는 IgM)를 지칭한다. 특정한 이소형, 예를 들어 IgG1이 본원에서 언급되는 경우, 용어는 특정 이소형 서열, 예를 들어 특정한 IgG1 서열에 제한되는 것이 아니라, 항체가 다른 이소형보다 그 이소형, 예를 들어 IgG1에 대해 서열상 더 밀접하다는 것을 나타내는데 사용된다. 따라서, 예를 들어 본 발명의 IgG1 항체는 불변 영역의 변이를 포함한, 자연 발생 IgG1 항체의 서열 변이체일 수 있다.

[0026] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 인간 모노클로날 항체는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모솜 비-인간 동물, 예컨대 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포가 불멸화 세포에 융합된 것을 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0027] 본 발명의 문맥에서 용어 "이중특이적 항체" 또는 "bs"는 상이한 항체 서열에 의해 규정된 2개의 상이한 항원-결합 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 상기 상이한 항원-결합 영역은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, 상기 상이한 항원-결합 영역은 상이한 표적 항원에 결합한다. 이중특이적 항체는 하기 본원에 기재된 임의의 이중특이적 항체 포맷을 포함한 임의의 포맷일 수 있다.

[0028] 본원에 사용된 경우에, 문맥상 모순되지 않는 한, 용어 "Fab-아암" 또는 "아암"은 1개의 중쇄-경쇄 쌍을 포함하고, 본원에서 "절반-분자"와 상호교환가능하게 사용된다.

[0029] 이중특이적 항체가 제1 항체"로부터 유래된" 절반-분자 항체 및 제2 항체"로부터 유래된" 절반-분자 항체를 포함하는 것으로 기재된 경우, 용어 "로부터 유래된"은 이중특이적 항체가 임의의 공지된 방법에 의해 상기 제1 및 제2 항체 각각으로부터의 상기 절반-분자를 이중특이적 항체로 재조합함으로써 생성되었다는 것을 나타낸다. 이와 관련하여, "재조합"은 임의의 특정한 재조합 방법에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않고, 따라서 예를 들어 절반-분자 교환에 의한 재조합뿐만 아니라 핵산 수준에서의 재조합에 의해 및/또는 동일한 세포 내의 2종의 절반-분자의 공동-발현을 통해서를 비롯하여, 하기 본원에 기재된 이중특이적 항체의 생산 방법 모두를 포함한다.

[0030] 용어 "1가 항체"는 본 발명의 문맥에서 항체 분자가 단일 항원 분자에 결합할 수 있고, 이에 따라 항원 또는 세포를 가교할 수 없는 것을 의미한다.

[0031] 항체와 관련하여 사용된 경우에 용어 "전장"은 항체가 단편이 아니라, 자연에서 특정한 이소형에 대해 통상적으로 발견되는 그러한 이소형의 모든 도메인, 예를 들어 IgG1 항체의 경우 VH, CH1, CH2, CH3, 힌지, VL 및 CL 도메인을 함유하는 것을 나타낸다.

[0032] 본원에 사용된 경우에, 문맥상 모순되지 않는 한, 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린의 중쇄의 2개의 Fc 서열로 이루어진 항체 영역을 지칭하며, 여기서 상기 Fc 서열은 적어도 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0033] 본원에 사용된 경우에, 용어 "제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용"은 제1-CH3/제2-CH3 이종이량체 단백질에서 제1 CH3 영역과 제2 CH3 영역 사이의 상호작용을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 경우에, 용어 "제1 및 제2 CH3 영역의 동종이량체 상호작용"은 제1-CH3/제1-CH3 동종이량체 단백질에서 제1 CH3 영역과 또 다른 제1 CH3 영역 사이의 상호작용 및 제2-CH3/제2-CH3 동종이량체 단백질에서 제2 CH3 영역과 또 다른 제2 CH3 영역 사이의 상호작용을 지칭한다.

[0035] 미리 결정된 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합과 관련하여 본원에 사용된 용어 "결합" 또는 "결합할 수 있는"은 전형적으로 생물층 간섭측정법 (BLI)을 사용하여 결정하였을 때 또는 예를 들어 리간드로서 항원 및 분석물로서 항체를 사용하여 비아코어 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술을 사용하여 결정하였을 때 약 $10^{-7}$ M 이하, 예컨대 약 $10^{-8}$ M 이하, 예컨대 약 $10^{-9}$ M 이하, 약 $10^{-10}$ M 이하, 또는 약 $10^{-11}$ M 또는 심지어 그 미만의 $K_D$에 상응하는 친화도로 결합하는 것이다. 항체는 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카세인)에의 결합에 대한 그의 $K_D$보다 적어도 10배 더 낮은, 예컨대 적어도 100배 더 낮은, 예를 들어 적어도 1,000배 더 낮은, 예컨대 적어도 10,000배 더 낮은, 예를 들어 적어도 100,000배 더 낮은 $K_D$에 상응하는 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다. 친화도가 더 높은 양은 항체의 $K_D$에 의존성이고, 따라서 항체의 $K_D$가 매우 낮은 경우 (즉, 항체가 고도로 특이적인 경우), 이때 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 정도는 적어도 10,000배일 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 용어 "$k_d$" ($sec^{-1}$)는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 또한 $k_{off}$ 값으로 지칭된다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "$K_D$" (M)는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

[0038] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단리된다. 본원에 사용된 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 바람직한 실시양태에서, PD-L1 및 CD137에 특이적으로 결합하는 단리된 이중특이적 항체는 PD-L1 또는 CD137에 특이적으로 결합하는 단일특이적 항체가 실질적으로 없다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체, 또는 항체를 포함하는 제약 조성물은 PD-L1에 결합할 수 없는 자연 발생 항체가 실질적으로 없다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 자연 발생 항-PD-L1 항체의 구조에 비해 그의 아미노산 서열에 있어서 구조적 변화를 보유하며, 여기서 상기 구조적 변화는 상기 항체가 상기 자연 발생 항-PD-L1 항체에 의해 나타난 기능에 비해 변경된 기능을 나타내도록 하고, 상기 기능은 (i) PD-L1 결합 친화도, (ii) PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 억제하는 능력, (iii) Fc-매개된 이펙터 기능을 유도하는 능력 및 (iv) Fc-매개된 이펙터 기능을 유도하지 않는 능력으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 본원에 사용된 경우 용어 "PD-L1"은 프로그램화된 사멸-리간드 1 단백질을 지칭한다. PD-L1은 인간 및 다른 종에서 발견되고, 따라서 용어 "PD-L1"은 문맥상 모순되지 않는 한 인간 PD-L1에 제한되지 않는다. 인간, 마카크

(시노몰구스 원숭이), 아프리카 코끼리, 멧돼지 및 마우스 PD-L1 서열은 각각 진뱅크(Genbank) 수탁 번호 NP_054862.1, XP_005581836, XP_003413533, XP_005665023 및 NP_068693을 통해 확인할 수 있다. 인간 PD-L1의 서열은 또한 서열식별번호: 28에 제시되며, 여기서 아미노산 1-18은 신호 펩티드일 것으로 예측된다. 마카크 (시노몰구스 원숭이) PD-L1의 서열은 또한 서열식별번호: 29에 제시되며, 여기서 아미노산 1-18은 신호 펩티드일 것으로 예측된다.

[0040] 본원에 사용된 경우 용어 "PD-L2"는 인간 프로그램화된 사멸 1-리간드 2 단백질 (진뱅크 수탁 번호 NP_079515)을 지칭한다.

[0041] 본원에 사용된 경우 용어 "PD-1"은 CD279로도 공지된 인간 프로그램화된 사멸-1 단백질을 지칭한다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "CD137"은 인간 분화 클러스터 137 단백질을 지칭한다. TNFRSF9로도 지칭되는 CD137 (4-1BB)은 리간드 TNFSF9/4-1BBL에 대한 수용체이다. CD137은 T 세포 활성화에 관여하는 것으로 여겨진다. 한 실시양태에서, CD137은 유니프롯(UniProt) 수탁 번호 Q07011을 갖는 인간 CD137이다. 인간 CD137의 서열은 또한 서열식별번호: 30에 제시되며, 여기서 아미노산 1-23은 신호 펩티드일 것으로 예측된다. 한 실시양태에서, CD137은 유니프롯 수탁 번호 A9YYE7-1을 갖는 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)) CD137이다. 시노몰구스 원숭이 CD137의 서열은 서열식별번호: 31에 제시되며, 여기서 아미노산 1-23은 aa 신호 펩티드일 것으로 예측된다. 멧돼지 (수스 스크로파(*Sus scrofa*)) CD137은 서열식별번호: 38에 제시되며, 여기서 아미노산 1-23은 aa 신호 펩티드일 것으로 예측된다. 아프리카 코끼리 (록소돈타 아프리카나(*Loxodonta africana*)) CD137은 서열식별번호: 39에 제시되며, 여기서 아미노산 1-23은 aa 신호 펩티드일 것으로 예측된다.

[0043] "PD-L1 항체" 또는 "항-PD-L1 항체"는 항원 PD-L1, 특히 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 상기 기재된 바와 같은 항체이다.

[0044] "CD137 항체" 또는 "항-CD137 항체"는 항원 CD137에 특이적으로 결합하는 상기 기재된 바와 같은 항체이다.

[0045] "CD137xPD-L1 항체", "항-CD137xPD-L1 항체", "PD-L1xCD137 항체" 또는 "항-PD-L1xCD137 항체"는 2개의 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체이며, 이 중 하나는 항원 PD-L1에 특이적으로 결합하고 이 중 하나는 CD137에 특이적으로 결합한다.

[0046] 본 발명은 또한 실시예의 항체의 VL 영역, VH 영역 또는 1개 이상의 CDR의 기능적 변이체를 포함하는 항체를 제공한다. 항체와 관련하여 사용되는 VL, VH 또는 CDR의 기능적 변이체는 또한 항체가 "참조" 또는 "모" 항체의 친화도 및/또는 특이성/선택성의 적어도 실질적인 비율 (적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과)을 보유하도록 하고, 일부 경우에 이러한 항체는 모 항체보다 더 큰 친화도, 선택성 및/또는 특이성과 연관될 수 있다.

[0047] 이러한 기능적 변이체는 전형적으로 모 항체에 대한 유의한 서열 동일성을 보유한다. 2개의 서열 사이의 퍼센트 동일성은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려한, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 # x 100). 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은, 예를 들어 PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 패널티 12 및 갭 패널티 4를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된 문헌 [E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 추가로, 2개의 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)] 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.

[0048] 예시적인 변이체는 주로 보존적 치환에 의해 모 항체 서열의 VH 및/또는 VL 및/또는 CDR 영역과 상이한 것들을 포함하고; 예를 들어, 변이체 내의 치환 중 10개, 예컨대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개는 보존적 아미노산 잔기 대체이다.

[0049] 본 발명의 문맥에서, 보존적 치환은 하기 표에 반영된 아미노산의 부류 내에서의 치환에 의해 정의될 수 있다:

[0050] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 부류

| | |
|---|---|
| 산성 잔기 | Asp (D) 및 Glu (E) |
| 염기성 잔기 | Lys (K), Arg (R), 및 His (H) |
| 친수성 비하전 잔기 | Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q) |
| 지방족 비하전 잔기 | Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I) |
| 비-극성 비하전 잔기 | Cys (C), Met (M), 및 Pro (P) |
| 방향족 잔기 | Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W) |

[0051]

[0052] 본 발명의 문맥에서, 달리 나타내지 않는 한, 하기 표기법이 돌연변이를 기재하는데 사용된다: i) 주어진 위치에서의 아미노산의 치환은, 예를 들어 K409R로서 기재되며, 이는 단백질의 위치 409에서의 리신이 아르기닌으로 치환된 것을 의미하고; ii) 특정 변이체의 경우 특정 3 또는 1 문자 코드가 사용되며, 이는 임의의 아미노산 잔기를 나타내는 코드 Xaa 및 X를 포함한다. 따라서, 위치 409에서의 리신을 아르기닌으로 치환한 것은 K409R로 표시되고, 위치 409에서의 리신을 임의의 아미노산 잔기로 치환한 것은 K409X로 표시된다. 위치 409에서의 리신의 결실의 경우, 이는 K409*로 표시된다.

[0053] 본 발명의 문맥에서, "PD-1에 대한 PD-L1 결합의 억제"는 PD-L1에 결합할 수 있는 항체의 존재 하에 PD-1에 대한 PD-L1의 결합의 임의의 검출가능하게 유의한 감소를 지칭한다. 전형적으로, 억제는 항-PD-L1 항체의 존재에 의해 야기되는 PD-L1과 PD-1 사이의 결합의 적어도 약 10% 감소, 예컨대 적어도 약 15%, 예를 들어 적어도 약 20%, 예컨대 적어도 40% 감소를 의미한다. PD-1에 대한 PD-L1 결합의 억제는 임의의 적합한 기술에 의해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 억제는 본원 실시예 6에 기재된 바와 같이 결정된다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "특이성"은 문맥상 모순되지 않는 한 하기 의미를 갖는 것으로 의도된다. 2종의 항체는 동일한 항원 및 동일한 에피토프에 결합하는 경우에 "동일한 특이성"을 갖는다.

[0055] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 의미한다. 에피토프는 통상적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 표면 집단으로 이루어지고, 통상적으로 특이적 3차원 구조적 특징뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 입체형태적 및 비-입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에 전자에 대한 결합은 상실되지만 후자에 대한 결합은 상실되지 않는다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관여하는 아미노산 잔기 및 결합에 직접 관여하지 않는 다른 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합 펩티드에 의해 효과적으로 차단되거나 커버되는 아미노산 잔기 (즉, 아미노산 잔기가 특이적 항원 결합 펩티드의 풋프린트 내에 있음)를 포함할 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "키메라 항체"는 가변 영역이 비-인간 종으로부터 유래되고 (예를 들어 설치류로부터 유래되고) 불변 영역이 상이한 종, 예컨대 인간으로부터 유래된 것인 항체를 지칭한다. 치료 용도를 위한 키메라 모노클로날 항체는 항체 면역원성을 감소시키도록 개발된다. 키메라 항체와 관련하여 사용된 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 이뮤노글로불린의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 CDR 및 프레임워크 영역을 포함하는 영역을 지칭한다. 키메라 항체는 문헌 [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15]에 기재된 바와 같은 표준 DNA 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 키메라 항체는 유전자 또는 효소 조작된 재조합 항체일 수 있다. 키메라 항체를 생성하는 것은 통상의 기술자의 지식 내에 있고, 따라서 본 발명에 따른 키메라 항체의 생성은 본원에 기재된 것 이외의 다른 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는 인간 항체 불변 도메인, 및 인간 가변 도메인에 대한 높은 수준의 서열 상동성을 함유하도록 변형된 비-인간 가변 도메인을 함유하는 유전자 조작된 비-인간 항체를 지칭한다. 이는, 함께 항원 결합 부위를 형성하는 6개의 비-인간 항체 상보성 결정 영역 (CDR)을 상동 인간 수용체 프레임워크 영역 (FR) 상으로 그라프팅함으로써 달성될 수 있다 (WO92/22653 및 EP0629240 참조). 모 항체의 결합 친화도 및 특이성을 완전히 재구성하기 위해, 모 항체 (즉, 비-인간 항체)로부터의 프레임워크 잔기의 인간 프레임워크 영역 내로의 치환 (복귀-돌연변이)이 필요할 수 있다. 구조적 상동성 모델링은 항체의 결합 특성에 중요한 프레임워크 영역 내의 아미노산 잔기를 확인하는 것을 도울 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열, 주

로 비-인간 아미노산 서열로의 하나 이상의 아미노산 복귀-돌연변이를 임의로 포함하는 인간 프레임워크 영역, 및 완전 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 임의로, 바람직한 특징, 예컨대 친화도 및 생물화학적 특성을 갖는 인간화 항체를 수득하기 위해, 반드시 복귀-돌연변이일 필요는 없는 추가의 아미노산 변형이 적용될 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스 또는 래트의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프팅된 항체는 포함하지 않는 것으로 의도된다. 인간 모노클로날 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)]의 표준 체세포 혼성화 기술을 포함한 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 바람직하긴 하지만, 원칙적으로, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스 또는 종양원성 형질전환, 또는 인간 항체 유전자의 라이브러리를 사용한 파지 디스플레이 기술이 사용될 수 있다. 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는데 적합한 동물 시스템은 뮤린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생산은 매우 널리 확립된 절차이다. 면역화 프로토콜, 및 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리 기술이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예를 들어, 뮤린 골수종 세포) 및 융합 절차가 또한 공지되어 있다. 따라서 인간 모노클로날 항체는 마우스 또는 래트 시스템보다는, 예를 들어 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말 마우스 또는 래트를 사용하여 생성될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 인간 항체는 동물 이뮤노글로불린 서열 대신 인간 배선 이뮤노글로불린 서열을 보유하는 트랜스제닉 동물, 예컨대 마우스 또는 래트로부터 수득된다. 이러한 실시양태에서, 항체는 동물에 도입된 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되지만, 최종 항체 서열은 상기 인간 배선 이뮤노글로불린 서열이 내인성 동물 항체 기구에 의한 체세포 과다돌연변이 및 친화도 성숙에 의해 추가로 변형된 결과이다 (예를 들어 문헌 [Mendez et al. 1997 Nat Genet. 15(2):146-56] 참조). 용어 "환원 조건" 또는 "환원 환경"은 기질, 본원에서는 항체의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기가 산화되기보다는 환원될 가능성이 더 높은 상태 또는 환경을 지칭한다.

[0059] 본원에 사용된 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 그 내부로 발현 벡터, 예를 들어 본 발명의 항체를 코딩하는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어 트랜스펙토마, 예컨대 CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 또는 NS0 세포, 및 림프구성 세포를 포함한다.

[0060] 용어 "치료"는 증상 또는 질환 상태를 경감, 호전, 정지 또는 근절 (치유)시킬 목적으로 유효량의 본 발명의 치료상 활성 항체를 투여하는 것을 지칭한다.

[0061] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과를 달성하기 위한, 필요한 투여량 및 기간 동안의 유효한 양을 지칭한다. 항체의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 도출할 수 있는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료상 유익한 효과가 더 큰 양이다.

[0062] 용어 "항-이디오타입 항체"는 일반적으로 항체의 항원-결합 부위와 연관된 고유 결정기를 인식하는 항체를 지칭한다.

[0063] 용어 "경쟁하다" 및 "경쟁"은 동일한 항원에 대한 제1 항체와 제2 항체 사이의 경쟁을 지칭한다. 대안적으로, "경쟁하다" 및 "경쟁"은 또한 내인성 리간드의 상응하는 수용체에의 결합에 대한 항체와 내인성 리간드 사이의 경쟁을 지칭할 수 있다. 항체가 내인성 리간드의 그의 수용체에 대한 결합을 방지하는 경우, 이러한 항체는 리간드와 그의 수용체와의 내인성 상호작용을 차단하고 따라서 내인성 리간드와 경쟁하는 것으로 언급된다. 표적 항원에의 결합에 대한 항체들의 경쟁을 시험하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 방법의 예는 소위 교차-경쟁 검정이며, 이는 예를 들어 ELISA로서 또는 유동 세포측정법에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 경쟁은 생물층 간섭측정법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0064] 본 발명의 추가 측면 및 실시양태

[0065] 상기 기재된 바와 같이, 제1 측면에서, 본 발명은 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 제2 항원-결합 영역은 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 억제하는 것인 결합제에 관한 것이다.

[0066] 따라서 이러한 결합제는 하나가 PD-L1에 결합할 수 있고 하나가 CD137에 결합할 수 있는 2개의 상이한 항원-결합 영역을 포함한다.

[0067] 본 발명의 발명자에 의해 제시된 바와 같이, 본 발명에 따른 결합제는 하나의 세포에서 CD137에 결합하고 동시에 또 다른 세포 상에서 PD-L1에 결합함으로써 증식을 활성화 및/또는 유도할 수 있다. 인간에서, CD137은 활성화된 T 세포, 예컨대 $CD8^+$ T 세포 및 $CD4^+$ T 세포 상에서 발현되고, 반면 PD-L1은 항원-제시 세포 (APC), 예컨대 수지상 세포 또는 종양 세포 상에서 우세하게 발현된다. 따라서, CD137 및 PD-L1 둘 다에 결합할 수 있는 본 발명에 따른 결합제, 예컨대 이중특이적 항체는 T 세포 및 APC 또는 T 세포 및 종양 세포에 동시에 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 결합제, 예컨대 이중특이적 항체는 세포 상의 PD-L1 및 CD137의 동시 결합에 의해 APC와 T 세포 사이의 세포-대-세포 상호작용을 매개할 수 있다. 따라서, 이는 항원-특이적 T 세포의 증식을 유도할 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 결합제, 예컨대 이중특이적 항체는 종양 세포 상의 PD-L1 및 T 세포 상의 CD137의 동시 결합에 의해 종양 세포와 T 세포 사이의 세포-대-세포 상호작용을 매개할 수 있다. 따라서, 이는 T 세포 상의 CD137의 결합에 의해 종양 세포의 존재 하의 T 세포의 추가 활성화를 유도할 수 있고, 한편 종양 세포 상의 PD-L1의 결합은 T 세포와 종양 세포를 근접하게 가져온다. 따라서, 종양 세포의 존재 하의 T 세포의 활성화는 T 세포에 의한 종양 세포의 증진된 사멸을 유도할 수 있다. 추가로, 본 발명에 따른 결합제의 PD-L1 항원-결합 영역이 종양 세포 상의 PD-L1과 T 세포 상의 PD-1과의 결합을 억제하는 능력은, 종양 세포가 T 세포 억제를 유도하여 활성화된 T 세포의 항종양 효과에서 벗어날 수 있는 것을 방지한다.

[0068] 따라서, 본 발명의 결합제, 예컨대 이중특이적 항체는 T 세포의 재활성화로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예컨대 암의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0069] 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 인간 PD-L1 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다.

[0070] 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 29에 제시된 바와 같은 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스) PD-L1 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다. 따라서, 인간 및 시노몰구스 원숭이 PD-L1 둘 다에 대해 교차-특이적인 항원-결합 영역을 갖는 결합제가 시노몰구스 원숭이에서의 전임상 시험에 적합하다.

[0071] 동일한 항원, 예컨대 PD-L1에 결합할 수 있는 상이한 결합제, 예컨대 항체는 상기 항원의 상이한 영역에 결합할 수 있다. 일부 경우에, PD-L1에 대한 하나의 PD-L1 항체의 결합은 PD-L1에 대한 상이한 PD-L1 항체의 결합을 여전히 허용할 수 있다. 그러나, 다른 경우에, PD-L1에 대한 하나의 PD-L1 항체의 결합은 PD-L1에 대한 상이한 PD-L1 항체의 결합과 경쟁할 수 있다 (이를 차단할 수 있다). 따라서, 경쟁 실험은 항체 결합의 기능적 효과에 영향을 미칠 수 있는, 항체가 결합하는 표적 항원에 대한 정보를 제공한다.

[0072] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역은 인간 PD-L2에 결합하지 않는다.

[0073] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 PD-L1 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0074] a. 서열식별번호: 20에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 20에서 1개 이하의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0075] b. 서열식별번호: 23에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 23에서 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0076] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 변형된 아미노산은 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 20에서 1개 이하의 아미노산이 변형되고, 예컨대 서열식별번호: 20에서 1개 이하의 보존적 아미노산 치환이 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 23에서 2개 이하의 아미노산이 변형되고, 예컨대 서열식별번호: 23에서 1개, 예컨대 2개의 보존적 아미노산 치환이 존재한다.

[0077] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 PD-L1 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0078] a. 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0079] b. 각각 서열식별번호: 22, DDN 및 23에 제시된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (LCDR1, LCDR2

및 LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0080] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항원-결합 영역과 인간 PD-L1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 표적 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 항체는 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있으며, 여기서 에피토프는 하나의 에피토프에 결합하는 제1 항체가 다른 에피토프에 대한 제2 항체의 결합을 방지하도록 서로에 대해 매우 근접하다. 그러나, 다른 상황에서, 2종의 상이한 항체는 항원 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있고 경쟁 결합 검정에서 결합에 대해 경쟁할 것이다.

[0081] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 20에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 20에서 1개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 23에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 23에서 2개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 PD-L1에 대한 특이성을 갖는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0082] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 서열을 갖는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하거나 또는 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 HCDR 서열에 걸쳐 총 1개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열식별번호: 22, DDN 및 23에 제시된 서열을 갖는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하거나 또는 서열식별번호: 22, DDN 및 23에 제시된 LCDR 서열에 걸쳐 총 2개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 PD-L1 상의 에피토프에 결합하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 이에 의해, VH의 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 1개 이하의 아미노산의 변형 및 VL의 3개의 LCDR 서열에 걸쳐 2개 이하의 아미노산 변형을 가능하게 하는 실시양태가 기재된다.

[0083] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VH 및 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체와 동일한 인간 PD-L1의 에피토프에 결합한다. 따라서, 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 항원-결합 영역이 특정 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 것은 본 발명의 결합제 및 상기 항체가 PD-L1 분자 상의 동일한 아미노산에 결합하는 것으로 이해되어야 한다. 결합제 및 항체 또는 항체들이 표적 항원 상의 동일한 에피토프에 결합하는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 알라닌 스캐닝 실험 또는 항체-항원 결정화 실험에 의해 결정될 수 있다.

[0084] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 20에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 20에서 1개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0085] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 19에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 19에서 1개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0086] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 18에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 18에서 1개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0087] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 3개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, 동일한 HCDR 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, 상이한 HCDR 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, 동일한 HCDR 서열에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, 상이한 HCDR 서열에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미

노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다.

[0088] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0089] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 23에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 23에서 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0090] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 DDN의 서열 또는 DDN에서 1개 이하의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0091] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 22에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 22에서 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0092] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 LCDR 서열에 걸쳐 총 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다.

[0093] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0094] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 바와 같은 서열이고, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 서열이다.

[0095] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 (VH) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH를 포함한다.

[0096] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역 (VL) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0097] 따라서, 예를 들어, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 상기 항원-결합 영역은 하기를 포함한다:

[0098] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0099] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 75% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 75% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0100] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0101] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0102] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0103] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0104] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호:

21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0105] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0106] 서열식별번호: 17에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 21에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열.

[0107] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0108] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0109] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합하는 상기 제2 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VH는 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고 VL은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0110] 추가 실시양태에서, 상기 VH 및 VL 서열은 각각 3개의 CDR 서열, 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 4개의 프레임워크 서열, 각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함하고, VH의 각각의 조합된 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열은 상기 VH 서열의 각각의 조합된 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖고, 여기서 VH CDR 서열은 돌연변이되지 않고, VL의 각각의 조합된 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열은 상기 VL 서열의 각각의 조합된 FR1, FR2, FR3 및 FR4 프레임워크 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖고, 여기서 VL CDR 서열은 돌연변이되지 않는다. 본 실시양태의 문맥에서, % 동일성은 프레임워크 서열이 중간 CDR 서열 없이 하나의 연속적인 서열로서 함께 취해질 때 수득된 동일성 백분율을 지칭한다.

[0111] CD137

[0112] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 상기 언급된 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 가지며, 여기서 제2 항원-결합 영역은 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 억제하는 것인 이중특이적 항체일 수 있다.

[0113] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다.

[0114] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 31에 제시된 바와 같은 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스) CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다. 따라서, 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD137 둘 다에 대해 교차-특이적인 항원-결합 영역을 갖는 결합제가 시노몰구스 원숭이에서의 전임상 시험에 적합하다.

[0115] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 하기 구축물로 형질감염된 세포에 대한 세포 결합에 의해 측정시, 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합하는 것보다 더 높은 정도로 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다. 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 (셔플 5/코끼리)은 아미노산 48-88이 코끼리 CD137로부터의 상응하는 아미노산에 의해 대체된 인간 CD137의 아미노산 서열에 상응한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드와 비교하여, 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 (셔플 5/코끼리) 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 33에 대해 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드 (셔플 5/코끼리)에 결합하지 않는다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은, 서열식별번호: 41의 위치 25-65에 상응하는 서열식별번호: 30의 위치 48-88에 의해 규정된 아미노산 서열 내에 위치하는 인간 CD137의 에피토프, 예컨대 서열식별번호: 41의 위치 25-65에 상응하는 서열식별번호: 30의 위치 48-88에서의 아미노산 C, P, P, N, S, F, S, S, A, G, G, Q, R, T, C, D, I, C, R, Q, C, K, G, V, F, R, T, R, K, E, C, S, S, T, S, N, A, E, C, D, C 중 하나 이상을 포함하거나 이를 필요로 하는 에피토프에 결합한다. 인간 CD137에 대한 제1 항원-결합 영역의 결합은 서열식별번호: 41의 위치 25-65에 상응하는 서열식별번호: 30의 위치 48-88에

의해 규정된 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기 중 임의의 것, 예컨대 서열식별번호: 41의 위치 25-65에 상응하는 서열식별번호: 30의 위치 48-88에서의 아미노산 C, P, P, N, S, F, S, S, A, G, G, Q, R, T, C, D, I, C, R, Q, C, K, G, V, F, R, T, R, K, E, C, S, S, T, S, N, A, E, C, D, C 중 하나 이상에 좌우될 수 있다.

[0116] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 아미노산 서열 내의 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 아미노산에 결합한다. 특히, 및 예컨대 알라닌 스캐닝에 의해; 예를 들어 하기 및 실시예 13에 기재된 바와 같이 결정하였을 때, 인간 CD137에 대한 본 발명에 따른 항체의 결합은 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상에 좌우될 수 있다: 서열식별번호: 30 내의 각각 F36, F53, T61, D63 및 N83에 상응하는, 서열식별번호: 41 내의 위치 13에서의 Phe (F), 위치 30에서의 Phe (F), 위치 38에서의 Thr (T), 위치 40에서의 Asp (D) 및 위치 60에서의 Asn (N).

[0117] 이러한 실시양태에 따르면, 서열식별번호: 41 내의 위치 13, 30, 38, 40 및 60에 상응하는 위치에서의 아미노산 잔기 중 임의의 1개 이상이 알라닌으로 치환된 돌연변이체 CD137에 대한 항체의 결합은 서열식별번호: 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 야생형 CD137의 경우와 비교하여 감소된다. 바람직하게는, 감소된 결합은 상기 항체의 z점수(배수 변화)가 - 1.5 미만인 것으로 결정되며, 여기서 돌연변이체 CD137에의 항체의 결합에 대한 z점수(배수 변화)는 실시예 13에 제시된 바와 같이 계산된다.

[0118] 위치 13에서의 Phe (F) 및/또는 위치 30에서의 Phe (F)는 항체의 결합에 직접 관여하지 않으면서 에피토프에 대해 구조적 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 항체는 인간 CD137 상의 에피토프에 결합할 수 있으며, 여기서 서열식별번호: 41 내의 위치 38에서의 Thr (T), 위치 40에서의 Asp (D) 및/또는 위치 60에서의 Asn (N)은 항체의 결합에 직접 관여한다.

[0119] 또 다른 실시양태에서, 인간 CD137에 대한 본 발명에 따른 항체의 결합은 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상에 좌우될 수 있다: 서열식별번호: 30의 위치에 상응하는, 각각 서열식별번호: 30의 L24, Q25, P27, G34, T35, D38 및 Q43에 상응하는, 서열식별번호: 41 내의 위치 1에서의 Leu (L), 위치 2에서의 Gln (Q), 위치 4에서의 Pro (P), 위치 11에서의 Gly (G), 위치 12에서의 Thr (T), 위치 15에서의 Asp (D) 및 위치 20에서의 Gln (Q).

[0120] 이러한 실시양태에 따르면, 서열식별번호: 41 내의 위치 1, 2, 4, 11, 12, 15 및 20에 상응하는 위치에서의 아미노산 잔기 중 임의의 1개 이상이 알라닌으로 치환된 돌연변이체 CD137에 대한 항체의 결합은 서열식별번호: 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 야생형 CD137의 경우와 비교하여 감소된다. 바람직하게는, 감소된 결합은 상기 항체의 z점수(배수 변화)가 - 1.5 미만인 것으로 결정되며, 여기서 돌연변이체 CD137에의 항체의 결합에 대한 z점수(배수 변화)는 실시예 13에 제시된 바와 같이 계산된다.

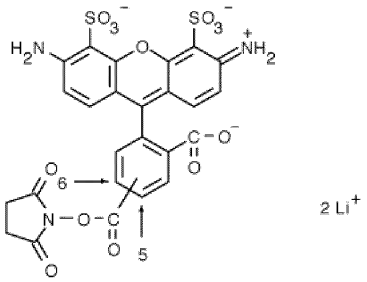
[0121] 야생형 및 알라닌 치환된 CD137에 대한 결합을 비교하기 위한 절차는 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0122] i) 적합한 세포주, 예컨대 HEK293 세포에서 야생형 및 알라닌 치환된 CD137을 발현시키는 단계;

[0123] ii) 형질감염 1일 후에 세포를 수거하고, 각각의 데이터 포인트에 대해, 예컨대 화학식 I에 따른 화합물 (A488)로 표지된 본 발명에 따른 항체와 함께 100.000개 세포의 샘플을 FACS 완충제 (포스페이트-완충 염수 (PBS), 1% 소 혈청 알부민, 0.02% 아지드화나트륨) 중에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하는 단계;

[0124] iii) 각각의 샘플을 FACS 완충제로 세척하고, 샘플을 유동 세포측정법에 의한 분석에 적용하고, 항체의 결합에 대해 형광 강도의 기하 평균 (gMFI)을 결정하는 단계; 및

[0125] iv) 데이터를 비-교차차단 CD137-특이적 항체의 결합 강도에 대해 정규화하고, 실시예 13에 기재된 바와 같이 z점수(배수 변화)를 계산하는 단계.

[0126] 

[0127] 화학식 I

[0128] 실시예 13에 기재된 바와 같이, 데이터는 하기 방정식을 사용하여 비-교차 차단 CD137 특이적 대조군 항체의 결합 강도에 대해 정규화될 수 있다:

[0129] $$정규화된\ gMFI_{aa\,위치} = Log_{10}\left(\frac{gMFI_{시험\,Ab}}{gMFI_{대조군\,Ab}}\right)$$

[0130] 여기서 'aa 위치'는 알라닌 또는 글리신으로 돌연변이된 위치를 지칭한다.

[0131] z점수는 하기 계산식에 따라 계산될 수 있다:

[0132] $$z점수(배수\ 변화) = \frac{정규화된\ gMFI_{aa\,위치} - \mu}{\sigma}$$

[0133] 여기서 μ 및 σ는 모든 돌연변이체로부터 계산된 정규화된 gMFI의 평균 및 표준 편차이다.

[0134] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 34 및 서열식별번호: 30에 제시된 구축물로 형질감염된 세포에 대한 세포 결합에 의해 측정하였을 때, 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 인간 CD137 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합하는 것과 동일한 정도로 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 (셔플 4/멧돼지) 또는 그의 성숙 폴리펩티드에 결합한다. 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 돌연변이체 인간 CD137 (셔플 4/멧돼지)은 아미노산 89-114가 멧돼지 CD137로부터의 상응하는 아미노산에 의해 대체된 인간 CD137의 아미노산 서열에 상응한다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 30의 위치 89-114에서의 아미노산 중 하나 이상을 포함하거나 이를 필요로 하는 인간 CD137의 에피토프에 결합하지 않는다.

[0135] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항원-결합 영역과 인간 CD137에의 결합에 대해 경쟁한다.

[0136] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항원-결합 영역과 인간 CD137에의 결합에 대해 경쟁한다.

[0137] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항원-결합 영역과 인간 CD137에의 결합에 대해 경쟁한다.

[0138] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 CD137 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0139] a. 서열식별번호: 11에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 11에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

[0140] b. 서열식별번호: 14에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 14에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0141] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 CD137 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0142] a. 서열식별번호: 52에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 52에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

[0143] b. 서열식별번호: 55에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 55에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0144] 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 1개 이하의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, LCDR3 서열에서 1개 이하의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, LCDR3 서열에서 2개 이하의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, LCDR3 서열에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, LCDR3 서열에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다.

[0145] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 CD137 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0146] a. 각각 서열식별번호: 9, 10 및 11에 제시된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0147] b. 각각 서열식별번호: 13, GAS 및 14에 제시된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0148] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 하기를 포함하는 항체와 인간 CD137 결합에 대해 경쟁하는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0149] a. 각각 서열식별번호: 50, 51 및 52에 제시된 서열을 갖는 중쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0150] b. 각각 서열식별번호: 54, SAS 및 55에 제시된 서열을 갖는 경쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0151] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하는 항체와 동일한 인간 CD137의 에피토프에 결합한다.

[0152] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 VH 서열 및 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 VL 서열을 포함하는 항체와 동일한 인간 CD137의 에피토프에 결합한다.

[0153] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 11에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 11에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 14에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 14에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 CD137에 대한 특이성을 갖는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0154] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 52에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 52에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 55에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 55에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 CD137에 대한 특이성을 갖는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0155] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 11에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 11에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0156] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 52에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 52에서 3개 이하의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1

개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR3 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0157] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 10에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 10에서 3개 이하, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0158] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 51에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 51에서 3개 이하, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR2 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0159] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 9에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 9에서 3개 이하, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0160] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 50에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 50에서 3개 이하, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 HCDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다. 본 발명의 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된다. 한 실시양태에서, HCDR1 서열에서 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0161] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 9, 10 및 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0162] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 50, 51 및 52에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 HCDR 서열에 걸쳐 총 3개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0163] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 9, 10 및 11에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0164] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 50, 51 및 52에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0165] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 14에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 14에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0166] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 55에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 55에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0167] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열 GAS 또는 GAS 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 본 발명의 한

실시양태에서, GAS 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0168] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열 SAS 또는 SAS 서열에서 2개 이하의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, SAS 서열에서 1개 이하의 아미노산이 변형된다.

[0169] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 13에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 13에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0170] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 54에 제시된 서열 또는 서열식별번호: 54에서 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된 서열을 갖는 LCDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0171] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 13, GAS, 14에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 LCDR 서열에 걸쳐 총 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다.

[0172] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 54, SAS, 55에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, 여기서 3개의 LCDR 서열에 걸쳐 총 4개 이하의 아미노산, 예컨대 4개의 아미노산, 예컨대 3개의 아미노산, 예컨대 2개의 아미노산, 예컨대 1개의 아미노산이 변형된다.

[0173] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 13, GAS, 14에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0174] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 54, SAS, 55에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0175] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 9, 10, 11에 제시된 바와 같은 서열이고, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 13, GAS, 14에 제시된 바와 같은 서열이다.

[0176] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 50, 51 및 52에 제시된 바와 같은 서열이고, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 각각 서열식별번호: 54, SAS, 55에 제시된 바와 같은 서열이다.

[0177] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 (VH) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 (VH) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH를 포함한다.

[0178] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 (VH) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VH를 포함한다.

[0179] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역 (VL) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%,

적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0180] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역 (VL) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0181] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역 (VL) 서열의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0182] 따라서, 예를 들어, 인간 CD137에 결합할 수 있는 상기 제1 항원-결합 영역은 하기를 포함한다:

[0183] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0184] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 75% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 75% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0185] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0186] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0187] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0188] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0189] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 97% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0190] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열, 또는

[0191] 서열식별번호: 15에 제시된 VH 서열에 대해 적어도 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VH 서열 및 서열식별번호: 16에 제시된 VL 서열에 대해 적어도 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VL 서열.

[0192] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0193] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0194] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VH 서열은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, VL 서열은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0195] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0196] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0197] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VH 서열은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, VL 서열은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0198] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서 VH는 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0199] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VL은 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0200] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 CD137에 결합하는 상기 제1 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 VH 서열은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 서열을 포함하고, VL 서열은 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.

[0201] 이중특이적 결합제

[0202] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 결합제는 다중특이적 결합제, 예를 들어 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체일 수 있다.

[0203] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0204] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0205] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 20에 제시된 바와 같은 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0206] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0207] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 HCDR2 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0208] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 19에 제시된 바와 같은 HCDR2 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0209] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0210] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 HCDR1 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0211] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 HCDR1 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0212] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0213] c. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 52에 제시된 바와 같은 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0214] d. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 20에 제시된 바와 같은 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0215] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0216] c. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 51에 제시된 바와 같은 HCDR2 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0217] d. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 19에 제시된 바와 같은 HCDR2 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0218] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0219] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 50에 제시된 바와 같은 HCDR1 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을

포함하고,

[0220] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 HCDR1 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0221] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0222] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 9, 10, 11에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0223] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19, 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0224] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0225] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 50, 51, 52에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0226] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19, 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0227] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0228] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 14에 제시된 바와 같은 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0229] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0230] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0231] a. 제1 항원-결합 영역은 서열 GAS를 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0232] b. 제2 항원-결합 영역은 서열 DDN을 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0233] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0234] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 13에 제시된 바와 같은 LCDR1 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0235] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 LCDR1 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0236] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0237] c. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 55에 제시된 바와 같은 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0238] d. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0239] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0240] c. 제1 항원-결합 영역은 서열 SAS를 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0241] d. 제2 항원-결합 영역은 서열 DDN을 갖는 LCDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0242] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0243] c. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 54에 제시된 바와 같은 LCDR1 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0244] d. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 LCDR1 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0245] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0246] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 13, GAS 및 14에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0247] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0248] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0249] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 54, SAS 및 55에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0250] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 22, DDN, 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0251] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0252] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 9, 10 및 11에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 각각 서열식별번호: 13, GAS 및 14에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0253] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 각각 서열식별번호: 22, DDN 및 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0254] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0255] a. 제1 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 50, 51 및 52에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 각각 서열식별번호: 54, SAS 및 55에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0256] b. 제2 항원-결합 영역은 각각 서열식별번호: 18, 19 및 20에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 각각 서열식별번호: 22, DDN 및 23에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0257] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0258] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0259] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0260] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0261] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함

하고,

[0262] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0263] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0264] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고,

[0265] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0266] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0267] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0268] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0269] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0270] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0271] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0272] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0273] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 53에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0274] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0275] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0276] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0277] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0278] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0279] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0280] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0281] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역 및 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서

[0282] a. 제1 항원-결합 영역은 서열식별번호: 49에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열

식별번호: 53에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고,

[0283] b. 제2 항원-결합 영역은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0284] 본 발명의 추가 실시양태에서, 결합제는 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체이다.

[0285] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 결합제는 이중특이적 항체이다.

[0286] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 전장 항체 또는 항체 단편의 포맷이다.

[0287] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서 각각의 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 바람직하게는 상기 가변 영역은 각각 3개의 CDR 서열, 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 4개의 프레임워크 서열, 각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한다. 따라서, 중쇄 가변 영역 내의 CDR은 각각 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로서 표시될 수 있고, 경쇄 가변 영역 내의 CDR은 각각 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로 표시될 수 있다. 추가로, 중쇄 가변 영역 내의 프레임워크 서열은 각각 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4로 표시될 수 있고, 경쇄 가변 영역 내의 프레임워크 서열은 각각 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4로 표시될 수 있다.

[0288] 따라서, 본 발명의 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체의 한 실시양태에서, 각각의 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 상기 가변 영역은 각각 3개의 CDR 서열, 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 4개의 프레임워크 서열, 각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한다. 본 발명의 이중특이적 항체의 추가의 바람직한 실시양태에서, 항체는 2개의 중쇄 불변 영역 (CH) 및 2개의 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함한다.

[0289] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 제1 중쇄 가변 영역 (VH) 및 제1 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 상기 제1 항원-결합 영역 및 제2 중쇄 가변 영역 (VH) 및 제2 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 상기 제2 항원-결합 영역을 포함한다.

[0290] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 각각의 가변 영역은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함한다.

[0291] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 상기 상보성 결정 영역 및 상기 프레임워크 영역을 포함하고, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0292] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상보성 결정 영역 및 프레임워크 영역은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된다: HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3, HFR4.

[0293] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상보성 결정 영역 및 프레임워크 영역은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된다: LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3, LFR4.

[0294] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 폴리펩티드는 중쇄 (HC)이다. 본 발명의 한 실시양태에서 중쇄 (HC)는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함한다.

[0295] 본 발명의 한 실시양태에서, 중쇄 불변 영역 (CH)은 불변 영역 도메인 1 영역 (CH1), 힌지 영역, 불변 영역 도메인 2 영역 (CH2) 및 불변 영역 도메인 3 영역 (CH3)을 포함한다.

[0296] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 (i) 상기 제1 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고 제1 중쇄 불변 영역 (CH)을 추가로 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) 상기 제2 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고 제2 중쇄 불변 영역 (CH)을 추가로 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0297] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 (i) 상기 제1 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고 제1 경쇄 불변 영역 (CL)을 추가로 포함하는 폴리펩티드 및 (ii) 상기 제2 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고 제2 경쇄 불변 영역 (CL)을 추가로 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0298] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 항체, 예컨대 다중특이적, 바람직하게는 제1 결합 아암 및 제2 결합 아암

을 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서

[0299] a. 제1 결합 아암은 i) 상기 제1 중쇄 가변 영역 (VH) 및 상기 제1 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함하는 폴리펩티드 및 ii) 상기 제1 경쇄 가변 영역 (VL) 및 상기 제1 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고;

[0300] b. 제2 결합 아암은 iii) 상기 제2 중쇄 가변 영역 (VH) 및 상기 제2 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함하는 폴리펩티드 및 iv) 상기 제2 경쇄 가변 영역 (VL) 및 상기 제2 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0301] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 불변 영역 도메인 1 영역 (CH1 영역), 힌지 영역, CH2 영역 및 CH3 영역 중 하나 이상, 바람직하게는 적어도 힌지 영역, CH2 영역 및 CH3 영역을 포함하는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함한다.

[0302] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된 이소형의 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이소형은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3 및 인간 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0303] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 토끼 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 결합 아암은 전장 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 결합 아암은 모노클로날 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 결합 아암은 전장 IgG1, λ (람다) 또는 IgG1, κ (카파) 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 래트 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 인간이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 결합 아암은 전장 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 결합 아암은 모노클로날 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 결합 아암은 전장 IgG1, λ (람다) 또는 IgG1, κ (카파) 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및 제2 항원-결합 영역은 인간 항체이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및 제2 결합 아암은 전장 항체, 예컨대 전장 IgG1, λ (람다) 또는 IgG1, κ (카파) 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 및 제2 결합 아암은 모노클로날 항체로부터 유래된다.

[0304] 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원 결합 영역은 IgG1 람다로부터 유래되고, 제2 항원 결합 영역은 IgG1 카파로부터 유래된다.

[0305] 본원에 기재된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 항체 및 그의 조합을 포함하고, 여기서 중쇄는 상이한 이소형 및/또는 하위부류의 것이다. 다양한 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체, 보다 특히 IgG1, 카파 또는 IgG1, 람다 이소형 (즉, IgG1, κ, λ), IgG2a 항체 (예를 들어 IgG2a, κ, λ), IgG2b 항체 (예를 들어 IgG2b, κ, λ), IgG3 항체 (예를 들어 IgG3, κ, λ) 또는 IgG4 항체 (예를 들어 IgG4, κ, λ)이다.

[0306] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 다중특이적, 예컨대 이중특이적 결합제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 항체 (특히 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체), 예컨대 키메라 또는 인간화 또는 인간 항체이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 전장 항체 또는 항체 단편의 포맷이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 모노클로날 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 항원-결합 영역은 모노클로날 항체로부터 유래된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1 항원-결합 영역은 모노클로날 항체로부터 유래되고, 제2 항원-결합 영역은 모노클로날 항체로부터 유래된다.

[0307] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 전장 IgG1 항체이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 전장 인간 IgG1 항체이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 불변 영역에 1개 이상의 돌연변이를 갖는 전장 인간 IgG1 항체이다.

[0308] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다. 결합제가 이중특이적 항체인 본 발명의 실시양태에서, 두 절반-분자는 인간, 인간화 또는 키메라일 수 있거나, 또는 절반-분자는 서열 기원에 대해 특징이 상이할 수 있다.

[0309] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서

[0310] a. CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 키메라 항체로부터 유래되고/거나,

[0311] b. 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역은 키메라 항체로부터 유래된다.

[0312] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서

[0313] a. CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래되고/거나,

[0314] b. 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래된다.

[0315] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서

[0316] a. 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 인간 항체로부터 유래되고/거나,

[0317] b. 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역은 인간 항체로부터 유래된다.

[0318] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 항원-결합 영역을 포함하고, 여기서

[0319] a. 인간 CD137에 결합하는 제1 항원-결합 영역은 인간화 항체로부터 유래되고/거나,

[0320] b. 인간 PD-L1에 결합하는 제2 항원-결합 영역은 인간 항체로부터 유래된다.

[0321] 본 발명의 한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 CH3 영역을 포함하는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함하고, 여기서 2개의 CH3 영역은 비대칭 돌연변이를 포함한다.

[0322] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 특히 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체 형태의 결합제는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함하고, 여기서 각각의 상기 제1 및 제2 중쇄는 적어도 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역을 포함하고, 여기서 상기 제1 중쇄 불변 영역 (CH)에서, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되었고, 상기 제2 중쇄에서, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 T366, L368, K370, D399, F405, Y407 및 K409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 상응하는 위치에서의 아미노산 중 적어도 하나가 치환되었고, 여기서 상기 제1 및 상기 제2 중쇄는 동일한 위치에서 치환되지 않는다.

[0323] 가장 바람직하게는, (i) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제1 중쇄 불변 영역 (CH)에서 L이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제2 중쇄 불변 영역 (CH)에서 R이거나, 또는 (ii) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제1 중쇄에서 R이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제2 중쇄에서 L이다.

[0324] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 항체, 예컨대 다중특이적, 바람직하게는 이중특이적 항체이고, 여기서 상기 항체는 동일한 제1 및 제2 항원 결합 영역 및 인간 IgG1 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 2개의 중쇄 불변 영역 (CH)을 포함하는 또 다른 항체와 비교하여 더 적은 정도로 Fc-매개된 이펙터 기능을 유도한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 불변 영역은 변형되고 이에 따라 상기 항체가 비-변형 제1 및 제2 중쇄를 포함하는 것을 제외하고는 동일한 항체와 비교하여 더 적은 정도로 Fc-매개된 이펙터 기능을 유도한다.

[0325] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 Fc-매개된 이펙터 기능은 IgG Fc (Fcγ) 수용체에 대한 결합, C1q에 대한 결합, 또는 FcR의 Fc-매개된 가교의 유도에 의해 측정된다.

[0326] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 Fc-매개된 이펙터 기능은 C1q에 대한 결합에 의해 측정된다.

[0327] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 불변 영역은 변형되었고 이에 따라 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 야생형 항체와 비교하여 감소되며, 바람직하게는 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 100% 감소되며, 여기서 C1q 결합은 바람직하게는 ELISA에 의해 결정된다.

[0328] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 불변 영역 중 적어도 하나에서, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297 및 P331에 상응하는 위치에서의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L, D, N 및 P가 아니다. 본 발명의 한 실시양태에서, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치는 상기 제1 및 제2 중쇄 불변 영역에서 각각 F 및 E이다. 본 발명의 한 실시양태에서, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및 D265에 상응하는 위치는 상기 제1 및 제2 중쇄에서 각각 F, E 및 A이다.

[0329] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역을 포함하는 PD-L1xCD137 이중특이적 항체이고, 여기서 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및 D265에 상응하는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역 둘 다의 위치는 각각 F, E 및 A이고, 여기서 (i) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응

하는 제1 중쇄의 위치는 L이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 R이거나, 또는 (ii) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제1 중쇄의 위치는 R이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 L이다.

[0330] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 T 세포의 증식을 유도 및/또는 증진시킨다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 T 세포는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포이다.

[0331] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 제2 항원-결합 영역이 PD-L1에 결합할 때에만 CD137 신호전달을 활성화시킨다.

[0332] 본 발명의 한 실시양태에서, T 세포의 증식은 특이적 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 T-세포를 TCR에 의해 인식되는 주요 조직적합성 복합체 상의 상응하는 항원을 제시하는 수지상 세포 (DC)와 공동-배양함으로써 측정된다.

[0333] 한 실시양태에서, T 세포의 증식의 상기 유도 또는 증진은 항원-특이적 검정에 의해 결정되고, 여기서 DC는 클라우딘-6 항원으로 형질감염되고, T 세포는 DC 상의 HLA-A2에 제시된 클라우딘-6-유래 에피토프를 인식하는 TCR로 형질감염된다. 이 검정은 실시예 7에 기재되어 있다.

[0334] 본 발명의 이중특이적 결합제는 인간 종양 조직의 생체외 배양에서 종양-침윤 림프구 (TIL)의 확장을 매개할 수 있다. TIL의 확장은 1.5배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상 또는 10배 이상일 수 있다. $CD3^-CD56^+$ 자연 킬러 (NK) 세포의 확장은 적어도 10배, 예컨대 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배 또는 예컨대 적어도 50배일 수 있다. $CD3^+CD8^+$ 세포독성 T-림프구 (CTL)의 확장은 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배 또는 예컨대 적어도 7배일 수 있다. 바람직하게는, TIL의 확장은 0.01, 0.1 및 1 μg/mL에 상응하는 농도의 이중특이적 결합제와의 인큐베이션에 반응한, 예컨대 0.1 μg/mL에 상응하는 농도의 이중특이적 결합제와의 인큐베이션에 반응한 인간 비소세포 폐 암종 조직 시편으로부터의 TIL 확장으로서 결정된다.

[0335] TIL의 확장은 하기 단계를 포함하는 검정에서 결정될 수 있다:

[0336] i) 종양 조직의 절제 시편, 예컨대 신선한 절제 시편을 제공하고, 시편을 조혈 세포 배지에서 세척하는 단계,

[0337] ii) 종양 조직을 1-2 mm의 직경을 갖는 조각으로 절단하고, 2개의 종양 조직 조각을 함유하는 샘플을 제공하는 단계,

[0338] iii) 샘플을 조직 배양 플레이트의 웰에서 10% 인간 혈청 알부민, 항생제 및 프로류킨(Proleukin)®S (재조합 인간 IL-2 유사체; 서열식별번호: 56)이 존재하는 조혈 세포 배지, 예컨대 론자(Lonza)™ X-VIVO™ 15 중 0.1 μg/ml의 농도의 본 발명의 이중특이적 결합제와 함께 37℃, 5% $CO_2$에서 72시간 동안 인큐베이션하는 단계이며; 여기서 25개 초과의 TIL 마이크로클러스터가 샘플에서 관찰되는 경우에는, 상기 샘플 내의 세포를 6개의 샘플 또는 조직 배양 플레이트 내의 6개의 웰로 분할하여 옮기는 것인 단계,

[0339] iv) 10-14일의 총 인큐베이션 기간 후에 TIL을 수거하고, 이들을 인간 CD3, 인간 CD4, 인간 CD56 및 인간 CD8에 대한 표지된 항체를 사용한 염색 및 비-생존 세포를 염색하는 염료, 예컨대 아미노악티노마이신 D를 사용한 염색에 적용하는 단계; 및

[0340] v) 각각의 샘플을 유동 세포측정법에 의해 분석하는 단계.

[0341] 본 발명의 이중특이적 결합제는 특히 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 집단에서 $CD40^+$ 및 $CD8^+$ T-세포의 확장을 유도할 수 있고, 여기서 T-세포는 바람직하게는 0.03 내지 0.1 μg/mL 농도의 항-CD3 항체, 예컨대 클론 UCHT1과의 인큐베이션에 의해 활성화, 예컨대 준최적으로 활성화되고, 바람직하게는 0.2 μg/mL에 상응하는 농도의 본 발명에 따른 이중특이적 결합제와 함께 인큐베이션된다. 특히, T-세포 확장을 결정하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0342] i) 건강한 공여자의 백혈구 연층으로부터, 예컨대 피콜 구배의 단리에 의해 PBMC를 수득하는 단계,

[0343] ii) PBS 중 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 PBMC를 표지하는 단계,

[0344] iii) 75000 CFSE-표지된 PBMC를 포함하는 샘플을 제공하고, 샘플을 글루타민이 존재하고 인간 AB 혈청이 보충된 이스코브 변형 둘베코 배지에서, 바람직하게는 각각의 공여자에 대해 준최적 T-세포 증식을 유도하는 농도인 것

으로 미리 결정된 0.03 내지 0.1 μg/mL 농도의 항-CD3 항체와 함께 및 0.2 μg/mL 농도의 본 발명의 이중특이적 결합제와 함께 37℃, 5% $CO_2$에서 4일 동안 인큐베이션하는 단계,

[0345] iv) PBMC를 인간 CD4, 인간 CD8, 인간 CD56에 대한 표지된 항체를 사용한 염색 및 비-생존 세포를 염색하는 염료, 예컨대 7-아미노악티노마이신 D를 사용한 염색에 적용하는 단계; 및

[0346] v) 샘플 내 상이한 하위집단 ($CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포)에서의 CSFE를 유동 세포측정법에 의해 분석하는 단계.

[0347] 항체 포맷

[0348] 상기 기재된 바와 같이, 다양한 포맷의 항체가 관련 기술분야에 기재되었다. 본 발명의 결합제는 원칙적으로 임의의 이소형의 항체일 수 있다. 이소형의 선택은 전형적으로 목적하는 Fc-매개된 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 유도, 또는 Fc-매개된 이펙터 기능이 없는 항체 ("불활성" 항체)에 대한 요건에 의해 안내될 것이다. 예시적인 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 영역, 카파 또는 람다 중 어느 하나가 사용될 수 있다. 본 발명의 항체의 이펙터 기능은 다양한 치료 용도를 위해, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE 또는 IgM 항체로의 이소형 전환에 의해 변화될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 두 중쇄는 IgG1 이소형, 예를 들어 IgG1, κ의 것이다. 임의로, 중쇄는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 힌지 및/또는 CH3 영역에서 변형될 수 있다.

[0349] 바람직하게는, 각각의 항원-결합 영역은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서 상기 가변 영역은 각각 3개의 CDR 서열, 각각 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 4개의 프레임워크 서열, 각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함한다. 추가로, 바람직하게는, 항체는 2개의 중쇄 불변 영역 (CH) 및 2개의 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함한다.

[0350] 본 발명의 한 실시양태에서, 결합제는 전장 항체, 예컨대 전장 IgG1 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 바람직하게는 안정화된 힌지 영역을 갖는 전장 IgG4 항체이다. IgG4 힌지 영역을 안정화시키는 변형, 예컨대 코어 힌지 내의 S228P 돌연변이는 관련 기술분야에 기재되었다 (예를 들어 문헌 [Labrijn et al., 2009 Nat Biotechnol. 27(8):767-71] 참조).

[0351] 본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합제는 항체 단편, 예컨대 Fab' 또는 Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편, WO2007059782 (젠맙(Genmab))에 기재된 바와 같은 1가 항체, $F(ab')_2$ 단편, Fd 단편, Fv 단편, dAb 단편, 낙타류 또는 나노바디, 또는 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다.

[0352] 본 발명의 결합제는 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 항체가 이중특이적 항체인 실시양태에서, 두 절반-분자는 인간, 인간화 또는 키메라일 수 있거나, 또는 절반-분자는 서열 기원에 대해 특징이 상이할 수 있다.

[0353] 예를 들어, 한 실시양태에서, 결합제, 예를 들어 이중특이적 항체는 각각 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 절반-분자를 포함하고, 여기서

[0354] (i) 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자(들)는 키메라이고/거나,

[0355] (ii) 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 존재하는 경우에 키메라이다.

[0356] 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 이중특이적 항체는 각각 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 절반-분자를 포함하고, 여기서

[0357] (i) 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자(들)는 인간화이고/거나,

[0358] (ii) 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 존재하는 경우 인간화이다.

[0359] 예를 들어, 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체는 각각 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 절반-분자를 포함하고, 여기서

[0360] (i) 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자(들)는 인간이고/거나,

[0361] (ii) 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 존재하는 경우 인간이다.

[0362] 따라서, 예를 들어, 한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역(들)은 인간화이고, 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역은 존재하는 경우 인간화이다.

[0363] 본 발명의 상이한 실시양태에서, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역(들)은 인간이고, 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역은 존재하는 경우 인간이다.

[0364] 추가 실시양태에서, 결합제는 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역 및 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 인간, 인간화 또는 키메라이고, 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 인간화이다.

[0365] 바람직하게는, 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 인간이고, 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 절반-분자는 인간화이다.

[0366] 이중특이적 항체 포맷

[0367] 이중특이적 항체의 많은 상이한 포맷 및 용도가 관련 기술분야에 공지되어 있고, 문헌 [Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul;20(7):838-47 and; MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97]에서 검토되었다.

[0368] 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 임의의 특정한 이중특이적 포맷 또는 이의 생산 방법에 제한되지는 않는다.

[0369] 본 발명에 사용될 수 있는 이중특이적 항체 분자의 예는 (i) 상이한 항원-결합 영역을 포함하는 2개의 아암을 갖는 단일 항체; (ii) 예를 들어 여분의 펩티드 링커에 의해 탠덤으로 연결된 2개의 scFv를 통해 2개의 상이한 에피토프에 대한 특이성을 갖는 단일 쇄 항체; (iii) 각각의 경쇄 및 중쇄가 짧은 펩티드 연결을 통해 탠덤으로 2개의 가변 도메인을 함유하는 것인 이중-가변-도메인 항체 (DVD-Ig) (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) 화학적으로-연결된 이중특이적 (Fab')2 단편; (v) 각각의 표적 항원에 대한 2개의 결합 부위를 갖는 4가 이중특이적 항체를 생성하는 2개의 단일 쇄 디아바디의 융합체인 탠드Ab; (vi) 다가 분자를 생성하는 디아바디와 scFv의 조합인 플렉시바디; (vii) Fab에 적용될 때 상이한 Fab 단편에 연결된 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어진 3가 이중특이적 결합 단백질을 생성할 수 있는, 단백질 키나제 A에서의 "이량체화 및 도킹 도메인"에 기초한 소위 "독 앤 락" 분자; (viii) 예를 들어 인간 Fab-아암의 두 말단에 융합된 2개의 scFv를 포함하는 소위 스콜피온 분자; 및 (ix) 디아바디를 포함한다.

[0370] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 결합제는 디아바디 또는 크로스-바디이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 결합제는 제어된 Fab-아암 교환을 통해 수득된 이중특이적 항체이다 (예컨대 WO2011131746 (젠맙)에 기재된 바와 같음).

[0371] 본 발명에 따른 결합제의 상이한 부류의 예는 (i) 강제로 이종이량체화하기 위해 상보적 CH3 도메인을 갖는 IgG-유사 분자; (ii) 분자의 2개 측면이 각각 적어도 2종의 상이한 항체의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부를 함유하는 것인 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자; (iii) 전장 IgG 항체가 여분의 Fab 단편 또는 Fab 단편의 일부와 융합된 것인 IgG 융합 분자; (iv) 단일 쇄 Fv 분자 또는 안정화된 디아바디가 중쇄 불변 도메인, Fc-영역 또는 그의 일부와 융합된 것인 Fc 융합 분자; (v) 상이한 Fab-단편들이 함께 융합되거나, 중쇄 불변 도메인, Fc-영역 또는 그의 일부와 융합된 것인 Fab 융합 분자; 및 (vi) 상이한 단일 쇄 Fv 분자 또는 상이한 디아바디 또는 상이한 중쇄 항체 (예를 들어 도메인 항체, 나노바디)가 서로에 대해 융합되거나 또는 중쇄 불면 도메인, Fc 영역 또는 그의 일부에 융합된 또 다른 단백질 또는 담체 분자에 융합된 것인 ScFv- 및 디아바디-기반 및 중쇄 항체 (예를 들어, 도메인 항체, 나노바디)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0372] 상보적 CH3 도메인 분자를 갖는 IgG-유사 분자의 예는 트리오맙/퀴드로마 분자 (트리온 파마/프레제니우스 바이오테크(Trion Pharma/Fresenius Biotech); 로슈(Roche), WO2011069104), 소위 노브-인투-홀 분자 (제넨테크(Genentech), WO9850431), 크로스맙 (로슈, WO2011117329) 및 정전기적으로-매칭된 분자 (암젠(Amgen), EP1870459 및 WO2009089004; 츄가이(Chugai), US201000155133; 온코메드(Oncomed), WO2010129304), LUZ-Y 분자 (제넨테크, 문헌 [Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1]), DIG-바디 및 PIG-바디 분자 (파맙신(Pharmabcine), WO2010134666, WO2014081202), 가닥 교환 조작된 도메인 바디 (시드바디) 분자 (이엠디 세로노(EMD Serono), WO2007110205), 비클로닉스 분자 (메루스(Merus), WO2013157953), FcΔAdp 분자 (레게네론(Regeneron), WO201015792), 이중특이적 IgG1 및 IgG2 분자 (화이자/리나트(Pfizer/Rinat), WO11143545), 아지메트릭 스캐폴드 분자 (자임웍스/머크(Zymeworks/Merck), WO2012058768), mAb-Fv 분자 (젠코르(Xencor), WO2011028952), 2가 이중특이적 항체 (WO2009080254) 및 듀오바디(DuoBody)® 분자 (젠맙, WO2011131746)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0373] 재조합 IgG-유사 이중 표적화 분자의 예는 이중 표적화 (DT)-Ig 분자 (WO2009058383), 투-인-원 항체 (제넨테크; 문헌 [Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614.]), 가교된 Mab (카르마노스 캔서 센터 (Karmanos Cancer Center)), mAb2 (에프-스타(F-Star), WO2008003116), 지바디 분자 (진제니아(Zyngenia); 문헌 [LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18]), 공통 경쇄를 사용한 접근법 (크루셀/메루스 (Crucell/Merus), US7,262,028), κλ바디 (노브이뮨(NovImmune), WO2012023053) 및 CovX-바디 (CovX/화이자; 문헌 [Doppalapudi, V.R., et al. 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501-506.])를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0374] IgG 융합 분자의 예는 이중 가변 도메인 (DVD)-Ig 분자 (애보트(Abbott), US7,612,181), 이중 도메인 이중 머리 항체 (유니레버(Unilever); 사노피 아벤티스(Sanofi Aventis), WO20100226923), IgG-유사 이중특이적 분자 (임클론/일라이 릴리(ImClone/Eli Lilly), 문헌 [Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8]), Ts2Ab (메드이뮨(MedImmune)/AZ; 문헌 [Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92]) 및 BsAb 분자 (지모제네틱스(Zymogenetics), WO2010111625), 허큘레스 분자 (비오젠 아이덱(Biogen Idec), US007951918), scFv 융합 분자 (노파르티스(Novartis)), scFv 융합 분자 (창저우 아담 바이오테크 인크(Changzhou Adam Biotech Inc), CN 102250246) 및 TvAb 분자 (로슈, WO2012025525, WO2012025530)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0375] Fc 융합 분자의 예는 ScFv/Fc 융합체 (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179-88), 스콜피온 분자 (에멀전트 바이오솔루션즈/트루비온(Emergent BioSolutions/Trubion), 문헌 [Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465)]; 지모제네틱스/BMS, WO2010111625), 이중 친화도 재표적화 기술 (Fc-DART) 분자 (마크로제닉스(MacroGenics), WO2008157379, WO2010080538) 및 이중(ScFv)2-Fab 분자 (국립 항체 의약 연구 센터 - 중국)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0376] Fab 융합 이중특이적 항체의 예는 F(ab)2 분자 (메다렉스(Medarex)/암젠; 문헌 [Deo et al. J Immunol. 1998 Feb 15;160(4):1677-86.]), 이중-작용 또는 비스-Fab 분자 (제넨테크, 문헌 [Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614.]), 독-앤-락 (DNL) 분자 (이뮤노메딕스(ImmunoMedics), WO2003074569, WO2005004809), 2가 이중특이적 분자 (바이오테크놀(Biotecnol), 문헌 [Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7050-7.]) 및 Fab-Fv 분자 (유씨비-셀테크(UCB-Celltech), WO 2009040562 A1)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0377] ScFv-, 디아바디-기반 및 도메인 항체의 예는 이중특이적 T 세포 연관체 (BiTE) 분자 (마이크로메트(Micromet), WO2005061547), 탠덤 디아바디 분자 (탠드Ab) (아피메드(Affimed), Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):357-66.), 이중 친화도 재표적화 기술 (DART) 분자 (마크로제닉스, WO2008157379, WO2010080538), 단일쇄 디아바디 분자 (로렌스(Lawrence), FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-유사 항체 (AIT, 리셉터로직스(ReceptorLogics)), 인간 혈청 알부민 ScFv 융합체 (메리맥(Merrimack), WO2010059315) 및 콤바디(COMBODY) 분자 (에피겐 바이오테크(Epigen Biotech), Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75.), 이중 표적화 나노바디 (아블링스(Ablynx), Hmila et al., FASEB J. 2010), 및 이중 표적화 중쇄 단독 도메인 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0378] 한 측면에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 제1 CH3 영역을 포함하는 제1 Fc 서열, 및 제2 CH3 영역을 포함하는 제2 Fc 서열을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하는 것이다. 이들 상호작용 및 이를 달성할 수 있는 방법에 관한 보다 세부사항은 본원에 참조로 포함되는 WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맙)에 제공된다.

[0379] 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 안정한 이중특이적 PD-L1xCD137 항체는 CH3 영역 내에 단지 소수의 보존적인 비대칭 돌연변이를 함유하는 하나의 동종이량체 출발 PD-L1 항체와 하나의 동종이량체 출발 CD137 항체를 기초로 한 특정한 방법을 사용하여 고수율로 수득될 수 있다. 비대칭 돌연변이는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 동일하지 않은 위치에서의 아미노산 치환을 함유하는 것을 의미한다.

[0380] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 CH3 영역은 동일한 위치에서 치환되지 않는다.

[0381] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 366에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 368, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 366에서의 아미노산은 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val 또는 Gln으로부터 선택된다.

[0382] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 368에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 370, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0383] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 370에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 399, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0384] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 399에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 405, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0385] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 405에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 399, 407 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0386] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 407에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 399, 405 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0387] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 409에서의 아미노산 치환을 갖는 제1 CH3 영역, 및 인간 IgG1 중쇄 내의 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 아미노산 치환을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0388] 따라서, 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 비대칭 돌연변이, 즉 2개의 CH3 영역 내의 상이한 위치에서의 돌연변이, 예를 들어 CH3 영역 중 하나 내의 위치 405에서의 돌연변이 및 다른 CH3 영역 내의 위치 409에서의 돌연변이를 함유하는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열을 포함한다.

[0389] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 갖는다. 이러한 한 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys 또는 Leu을 갖는다. 그의 추가 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖는다.

[0390] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met 또는 Cys 및 위치 409에서 Lys를 포함한다. 그의 추가 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu,

Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys 및 위치 409에서 Lys를 포함한다.

[0391] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Leu 및 위치 409에서 Lys를 포함한다. 그의 추가 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys 및 위치 409에서 Lys를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Leu 및 위치 409에서 Lys를 포함한다.

[0392] 추가 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, 위치 370에서 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다. 추가 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, 위치 370에 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다.

[0393] 추가 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 370에서 Lys, 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, 위치 370에서 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다.

[0394] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys 및 a) 위치 350에서 Ile 및 위치 405에서 Leu 또는 b) 위치 370에서 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다.

[0395] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys 및 a) 위치 350에서 Ile 및 위치 405에서 Leu 또는 b) 위치 370에서 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다.

[0396] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 350에서 Thr, 위치 370에서 Lys, 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 409에서 Lys 및 a) 위치 350에서 Ile 및 위치 405에서 Leu 또는 b) 위치 370에서 Thr 및 위치 405에서 Leu를 포함한다.

[0397] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 350에서 Thr, 위치 370에서 Lys, 위치 405에서 Phe 및 위치 409에서 Arg를 포함하고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 350에서 Ile, 위치 370에서 Thr, 위치 405에서 Leu 및 위치 409에서 Lys를 포함한다.

[0398] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 405에서 Phe 이외의 다른 아미노산, 예컨대 위치 405에서 Phe, Arg 또는 Gly 이외의 다른 아미노산을 갖거나; 또는 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는다.

[0399] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖는 제1 CH3 영역 및 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산을 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0400] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체는 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖는 제1 CH3 영역 및 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에서 Lys를 갖는 제2 CH3 영역

을 포함한다.

[0401] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 이중특이적 항체는 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Arg를 갖는 제1 CH3 영역 및 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산 및 위치 409에서 Lys를 갖는 제2 CH3 영역을 포함한다.

[0402] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp 또는 Cys를 갖는다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp를 갖는다.

[0403] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp를 갖는다.

[0404] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp 또는 Cys 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0405] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0406] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0407] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Arg를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp 또는 Cys 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0408] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Arg를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val 또는 Trp 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0409] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 상기 제1 CH3 영역은 위치 407에서 Tyr 및 위치 409에서 Arg를 갖고, 상기 제2 CH3 영역은 위치 407에서 Gly, Leu, Met, Asn 또는 Trp 및 위치 409에서 Lys를 갖는다.

[0410] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 정의된 바와 같은 본 발명의 이중특이적 항체에서, 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys를 갖고, 제2 CH3 영역은 하기를 갖는다:

[0411] (i) 위치 368에서 Phe, Leu 및 Met 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr 또는 Cys, 또는

[0412] (ii) 위치 370에서 Trp, 또는

[0413] (iii) 위치 399에서 Asp, Cys, Pro, Glu 또는 Gln 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr 또는 Cys, 또는

[0414] (iv) 위치 366에서 Lys, Arg, Ser, Thr 또는 Trp 이외의 다른 아미노산, 예를 들어 Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr 또는 Cys.

[0415] 한 실시양태에서, 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Arg, Ala, His 또는 Gly를 갖고, 제2 CH3 영역은 하기를 갖는다:

[0416] (i) 위치 368에서 Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp, 또는

[0417] (ii) 위치 370에서 Trp, 또는

[0418] (iii) 위치 399에서 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr, 또는

[0419] (iv) 위치 366에서 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met 또는 Tyr.

[0420] 한 실시양태에서, 제1 CH3 영역은 위치 409에서 Arg를 갖고, 제2 CH3 영역은 하기를 갖는다:

[0421] (i) 위치 368에서 Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp, 또는

[0422] (ii) 위치 370에서 Trp, 또는

[0423] (iii) 위치 399에서 Phe, His, Lys, Arg 또는 Tyr, 또는

[0424] (iv) 위치 366에서 Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln.

[0425] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 제1 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 각각의 상기 제1 및 제2 중쇄는 적어도 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역을 포함하고, 여기서 (i) 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제1 중쇄에서 L이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제2 중쇄에서 R이거나, 또는 (ii) 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제1 중쇄에서 R이고, 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 위치에서의 아미노산은 상기 제2 중쇄에서 L이다.

[0426] 상기 명시된 아미노산 치환 이외에, 상기 제1 및 제2 중쇄는 야생형 중쇄 서열에 비해 추가의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다.

[0427] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 Fc 서열은 둘 다 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Ser-Cys 서열을 포함하지 않는다.

[0428] 본 발명의 추가 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 Fc 서열은 둘 다 (코어) 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다.

[0429] 이중특이적 항체의 제조 방법

[0430] 전통적인 방법, 예컨대 하이브리드 하이브리도마 및 화학적 접합 방법 (Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649)이 본 발명의 이중특이적 항체의 제조에 사용될 수 있다. 상이한 중쇄 및 경쇄로 이루어진 2종의 항체의 숙주 세포에서의 공동-발현은 목적하는 이중특이적 항체 이외에 가능한 항체 생성물의 혼합물을 생성하고, 이는 이어서, 예를 들어 친화도 크로마토그래피 또는 유사한 방법에 의해 단리될 수 있다.

[0431] 상이한 항체 구축물의 공동-발현시 기능적 이중특이적 생성물의 형성을 촉진하는 전략, 예를 들어 문헌 [Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219]에 기재된 방법이 또한 사용될 수 있다. 상이한 항체를 생산하는 래트 및 마우스 하이브리도마의 융합은 우선적 종-제한 중쇄/경쇄 쌍형성 때문에 제한된 개수의 이종이량체 단백질을 생성한다. 동종이량체에 비해 이종이량체의 형성을 촉진하는 또 다른 전략은 제1 중쇄 폴리펩티드 상에는 돌기를 도입하고 제2 중쇄 폴리펩티드 내에는 상응하는 공동을 도입하여, 이들 2개의 중쇄의 계면에서 돌기가 공동 내에 위치하여 이종이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 방해하도록 할 수 있도록 한 "노브-인투-홀" 전략이다. "돌기"는 제1 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄로 대체함으로써 구축된다. 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "공동"은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄로 대체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에 생성된다 (미국 특허 5,731,168). EP1870459 (츄가이) 및 WO2009089004 (암젠)는 숙주 세포에서 상이한 항체 도메인의 공동-발현시 이종이량체 형성을 촉진하기 위한 다른 전략을 기재한다. 이들 방법에서, 둘 다의 CH3 도메인 내 CH3-CH3 계면을 구성하는 1개 이상의 잔기는 하전된 아미노산으로 대체되어 동종이량체 형성이 정전기적으로 불리하고 이종이량체화가 정전기적으로 유리하게 된다. WO2007110205 (머

크)는 IgA 및 IgG CH3 도메인들 사이의 차이를 이종이량체화 촉진에 이용하는 또 다른 전략을 기재한다.

[0432] 이중특이적 항체를 생산하는 또 다른 시험관내 방법이 WO2008119353 (젠맙)에 기재되었으며, 여기서 이중특이적 항체는 환원 조건 하에서의 인큐베이션시 2종의 단일특이적 IgG4- 또는 IgG4-유사 항체 사이의 "Fab-아암" 또는 "절반-분자" 교환 (중쇄와 부착된 경쇄의 스와핑)에 의해 형성된다. 생성된 생성물은 상이한 서열을 포함할 수 있는 2개의 Fab 아암을 갖는 이중특이적 항체이다.

[0433] 본 발명의 이중특이적 PD-L1xCD137 항체의 제조를 위한 바람직한 방법은 하기 단계를 포함하는, WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맙)에 기재된 방법을 포함한다:

[0434] a) 제1 CH3 영역을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 제1 항체를 제공하는 단계;

[0435] b) 제2 CH3 영역을 포함하는 제2 Fc 영역을 포함하는 제2 항체를 제공하는 단계,

[0436] 여기서 제1 항체는 CD137 항체이고 제2 항체는 PD-L1 항체이거나, 또는 그 반대의 경우이고,

[0437] 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 함;

[0438] c) 환원 조건 하에 상기 제1 항체를 상기 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0439] d) 상기 이중특이적 PD-L1xCD137 항체를 수득하는 단계.

[0440] 유사하게, 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체의 생산 방법이 제공된다:

[0441] a) 본원에 정의된 바와 같은 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 제1 항체를 생산하는 숙주 세포를 배양하고, 배양물로부터 상기 제1 항체를 정제하는 단계;

[0442] b) 본원에 정의된 바와 같은 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 제2 항체를 생산하는 숙주 세포를 배양하고, 배양물로부터 상기 제2 항체를 정제하는 단계;

[0443] c) 힌지 영역 내의 시스테인이 디술피드-결합 이성질화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 항체를 상기 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및

[0444] d) 상기 이중특이적 항체를 수득하는 단계.

[0445] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 항체는 상기 제2 항체와 함께, 힌지 영역 내의 시스테인이 디술피드 결합 이성질화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 인큐베이션되고, 여기서 생성된 이종이량체 항체에서의 상기 제1 및 제2 항체들 사이의 이종이량체 상호작용은 37℃에서 24시간 후 0.5 mM GSH에서 어떠한 Fab-아암 교환도 일어나지 않도록 이루어진다.

[0446] 이론에 제한되는 것은 아니지만, 단계 c)에서, 모 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 디술피드 결합이 환원되고, 이어서 생성된 시스테인이 또 다른 모 항체 분자 (원래 상이한 특이성을 수반함)의 시스테인 잔기와 중쇄간 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 상기 방법의 한 실시양태에서, 단계 c)에서의 환원 조건은 환원제, 예를 들어 2-메르캅토에틸아민 (2-MEA), 디티오트레이톨 (DTT), 디티오에리트리톨 (DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토-에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된 환원제, 바람직하게는 2-메르캅토에틸아민, 디티오트레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된 환원제의 첨가를 포함한다. 추가 실시양태에서, 단계 c)는, 예를 들어 환원제의 제거에 의해, 예를 들어 탈염에 의해 상기 조건을 비-환원성 또는 덜 환원성이 되도록 회복시키는 것을 포함한다.

[0447] 이러한 방법을 위해, 제1 및/또는 제2 Fc 영역을 포함하는, 각각 제1 및 제2 CD137 및 PD-L1 항체를 포함한 상기 기재된 임의의 CD137 및 PD-L1 항체가 사용될 수 있다. 이러한 제1 및 제2 Fc 영역의 조합을 포함한 이러한 제1 및 제2 Fc 영역의 예는 상기 기재된 임의의 것을 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 각각 제1 및 제2 CD137 및 PD-L1 항체는 본원에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체를 수득하도록 선택될 수 있다.

[0448] 상기 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 항체는 전장 항체이다.

[0449] 제1 및 제2 항체의 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 이소형일 수 있다. 상기 방법의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 상기 제2 항체 둘 다의 Fc 영역은 IgG1 이소형의 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체의 Fc 영역 중 하나는 IgG1 이소형의 것이고 다른 것은 IgG4 이소형의 것이다. 후자의 실시양태에서, 생성된 이중특이적 항체는 IgG1의 Fc 서열 및 IgG4의 Fc 서열을 포함하므로, 이펙터 기능

의 활성화와 관련하여 흥미로운 중간 특성을 가질 수 있다.

[0450] 추가 실시양태에서, 항체 출발 단백질 중 하나는 단백질 A와 결합하지 않도록 조작되어, 생성물을 단백질 A 칼럼 상에 통과시킴으로써 이종이량체 단백질을 상기 동종이량체 출발 단백질로부터 분리되도록 하였다.

[0451] 상기 기재된 바와 같이, 동종이량체 출발 항체의 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하는 것이다. 이들 상호작용 및 이를 달성할 수 있는 방법에 관한 보다 세부사항은 본원에 그 전문이 참조로 포함되는 WO2011131746 및 WO2013060867 (젠맙)에 제공된다.

[0452] 특히, 안정한 이중특이적 PD-L1xCD137 항체는 각각 CD137 및 PD-L1에 결합하고 CH3 영역에 단지 소수의 보존적인 비대칭 돌연변이를 함유하는 2종의 동종이량체 출발 항체를 기초로 하여 상기 본 발명의 방법을 사용하여 고수율로 수득될 수 있다. 비대칭 돌연변이는 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열이 동일하지 않은 위치에서 아미노산 치환을 함유한다는 것을 의미한다.

[0453] 본 발명의 이중특이적 항체는 또한 단세포에서 제1 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 구축물의 공동-발현에 의해 수득될 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 이중특이적 항체의 생산 방법에 관한 것이다:

[0454] a) 제1 항체 중쇄의 제1 Fc 서열 및 제1 항원-결합 영역을 포함하는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 구축물을 제공하며, 상기 제1 Fc 서열은 제1 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,

[0455] b) 제2 항체 중쇄의 제2 Fc 서열 및 제2 항원-결합 영역을 포함하는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 구축물을 제공하며, 상기 제2 Fc 서열은 제2 CH3 영역을 포함하는 것인 단계,

[0456] 여기서 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 서열은 상이하고 상기 제1 및 제2 CH3 영역 사이의 이종이량체 상호작용이 상기 제1 및 제2 CH3 영역의 각각의 동종이량체 상호작용보다 더 강하도록 하고, 여기서 상기 제1 동종이량체 단백질은 위치 409에서 Lys, Leu 또는 Met 이외의 다른 아미노산을 갖고, 상기 제2 동종이량체 단백질은 366, 368, 370, 399, 405 및 407로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 아미노산 치환을 갖고,

[0457] 임의로 여기서 상기 제1 및 제2 핵산 구축물은 상기 제1 및 제2 항체의 경쇄 서열을 코딩함,

[0458] c) 상기 제1 및 제2 핵산 구축물을 숙주 세포에서 공동-발현시키는 단계, 및

[0459] d) 상기 이종이량체 단백질을 세포 배양물로부터 수득하는 단계.

[0460] 본 발명의 항체의 생산을 위한 물질 및 방법

[0461] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체의 재조합 생산을 위한 물질 및 방법에 관한 것이다. 항체의 생산을 위한 프로모터, 인핸서 등을 포함한 적합한 발현 벡터 및 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.

[0462] 따라서, 한 측면에서, 하기를 포함하는 핵산 구축물이 제공된다:

[0463] (i) 본원에 정의된 바와 같은 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 항체의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및/또는

[0464] (ii) 본원에 정의된 바와 같은 인간 PD-L1에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 항체의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열.

[0465] 한 실시양태에서, 핵산 구축물은 추가로 하기를 포함한다:

[0466] (i) 본원에 정의된 바와 같은 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 항체의 중쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열, 및

[0467] (ii) 본원에 정의된 바와 같은 인간 CD137에 결합할 수 있는 항원-결합 영역을 포함하는 항체의 경쇄 서열을 코딩하는 핵산 서열.

[0468] 추가 측면에서, 본 발명은 상기 본원에 정의된 바와 같은 핵산 구축물을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0469] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 측면 또는 실시양태에 따른 결합제 또는 그의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0470] 발현 벡터는 본 발명의 문맥에서 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터 (적합한 세트의 발현 제어 요소를 포함하는 핵산 서열)를 포함한 임의의 적합한 벡터일 수 있다. 이러한 벡터의 예는 SV40의 유도체, 박테리아 플라스미드, 파지 DNA, 바큘로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드 및 파지 DNA의 조합으로부터 유래된 벡터, 및 바이러스 핵산 (RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L1 또는 CD137 항체-코딩 핵산은 네이키드 DNA 또는 RNA 벡터, 예를 들어 선형 발현 요소 (예를 들어, 문헌 [Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)]에 기재된 바와 같음), 압축형 핵산 벡터 (예를 들어, US 6,077,835 및/또는 WO 00/70087에 기재된 바와 같음), 플라스미드 벡터, 예컨대 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, "깔다구" 최소 크기의 핵산 벡터 (예를 들어 문헌 [Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)]에 기재된 바와 같음), 또는 침전된 핵산 벡터 구축물, 예컨대 $Ca_3(PO_4)_2$-침전된 구축물 (예를 들어 WO200046147, 문헌 [Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), 및 Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)]에 기재된 바와 같음)에 포함된다. 이러한 핵산 벡터 및 그의 용법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, US 5,589,466 및 US 5,973,972 참조).

[0471] 한 실시양태에서, 벡터는 박테리아 세포에서의 PD-L1 항체 및/또는 CD137 항체의 발현에 적합하다. 이러한 벡터의 예는 발현 벡터, 예컨대 블루스크립트 (스트라타진(Stratagene)), pIN 벡터 (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)), pET 벡터 (노바겐(Novagen), 위스콘신주 매디슨) 등을 포함한다.

[0472] 발현 벡터는 또한 또는 대안적으로 효모 시스템에서의 발현에 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템에서의 발현에 적합한 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터는, 예를 들어 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터를 포함하는 벡터를 포함한다 (문헌 [F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), 및 Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)]에서 검토됨).

[0473] 발현 벡터는 또한 또는 대안적으로 포유동물 세포에서의 발현에 적합한 벡터, 예를 들어 글루타민 신테타제를 선택 마커로서 포함하는 벡터, 예컨대 문헌 [Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175]에 기재된 벡터일 수 있다.

[0474] 핵산 및/또는 벡터는 또한 폴리펩티드, 예컨대 신생 폴리펩티드 쇄를 주변세포질 공간에 또는 세포 배양 배지 내로 표적화할 수 있는 분비/국재화 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 분비 리더 또는 신호 펩티드를 포함한다.

[0475] 발현 벡터는 임의의 적합한 프로모터, 인핸서 및 다른 발현-촉진 요소를 포함하거나 그와 연관될 수 있다. 이러한 요소의 예는 강한 발현 프로모터 (예를 들어, 인간 CMV IE 프로모터/인핸서, 뿐만 아니라 RSV, SV40, SL3-3, MMTV 및 HIV LTR 프로모터), 효과적인 폴리 (A) 종결 서열, 이. 콜라이에서의 플라스미드 생성물에 대한 복제 기점, 선택 마커로서의 항생제 내성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위 (예를 들어, 폴리링커)를 포함한다. 핵산은 또한 CMV IE와 같은 구성적 프로모터와 대조적으로 유도성 프로모터를 포함할 수 있다.

[0476] 한 실시양태에서, PD-L1 및/또는 CD137 항체-코딩 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통해 숙주 세포 또는 숙주 동물 내에 위치되고/거나 전달될 수 있다.

[0477] 추가 측면에서, 본 발명은 본원 상기에 명시된 핵산 구축물 또는 발현 벡터 중 하나 이상을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0478] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예컨대 트랜스펙토마에 관한 것이다.

[0479] 숙주 세포의 예는 효모, 박테리아, 식물 및 포유동물 세포, 예컨대 CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 또는 NS0 세포 또는 림프구성 세포를 포함한다. 바람직한 숙주 세포는 CHO-K1 세포이다.

[0480] 본 발명의 한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 세포이다.

[0481] 예를 들어, 한 실시양태에서, 숙주 세포는 세포 게놈 내로 안정하게 통합된 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 명시된 바와 같은 제1 및 제2 핵산 구축물을 포함하는, 비-통합 핵산, 예컨대 플라스미드, 코스미드, 파지미드 또는 선형 발현 요소를 포함하는 세포를 제공한다.

[0482] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같은 PD-L1 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다.

[0483] Fc 영역

[0484] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 결합제는, 항원-결합 영역 이외에, 2개의 중쇄의 Fc 서열로 이루어진 Fc 영역을 포함한다.

[0485] 제1 및 제2 Fc 서열은 각각 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 이소형의 것일 수 있고, 1개 이상의 돌연변이 또는 변형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 제1 및 제2 Fc 서열은 IgG4 이소형의 것이거나, 또는 그로부터 유래되고 임의로 1개 이상의 돌연변이 또는 변형을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 제1 및 제2 Fc 서열은 IgG1 이소형의 것이거나, 또는 그로부터 유래되고 임의로 1개 이상의 돌연변이 또는 변형을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, Fc 서열 중 하나는 IgG1 이소형의 것이고 다른 하나는 IgG4 이소형의 것이거나, 또는 이러한 각각의 이소형으로부터 유래되고 임의로 1개 이상의 돌연변이 또는 변형을 갖는다.

[0486] 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 서열 중 하나 또는 둘 다는 이펙터-기능-결핍이다. 예를 들어, Fc 서열(들)은 이펙터 기능, 예컨대 ADCC를 매개하는 능력이 감소되거나 심지어 제거되도록 돌연변이된 IgG4 이소형 또는 비-IgG4 유형, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG3의 것일 수 있다. 이러한 돌연변이는, 예를 들어 문헌 [Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) and Hezareh M, J Virol.; 75(24):12161-12168 (2001)]에 기재되었다. 또 다른 실시양태에서, 하나 또는 둘 다의 Fc 서열은 IgG1 야생형 서열을 포함한다.

[0487] 본 발명에 따른 항체는 Fc 영역에 변형을 포함할 수 있다. 항체가 이러한 변형을 포함하는 경우, 이는 불활성 또는 비-활성화 항체가 될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "불활성화", "불활성" 또는 "비-활성화"는 적어도 임의의 Fcɣ 수용체에 결합할 수 없거나, FcR의 Fc-매개된 가교를 유도할 수 없거나, 또는 개별 항체의 2개의 Fc 영역을 통해 표적 항원의 FcR-매개된 가교를 유도할 수 없거나, 또는 C1q에 결합할 수 없는 Fc 영역을 지칭한다. 인간화 또는 키메라 CD137 또는 PD-L1 항체의 Fc 영역의 불활성화는 단일특이적 포맷의 항체를 사용하여 유리하게 시험된다.

[0488] 치료 항체 개발을 위해 항체의 Fc 영역을 Fcɣ (감마) 수용체 및 C1q와의 상호작용에 대해 불활성으로 만들기 위한 여러 변이체가 구축될 수 있다. 이러한 변이체의 예가 본원에 기재된다.

[0489] 따라서, 본 발명의 항체의 한 실시양태에서, 상기 항체는 제1 및 제2 중쇄를 포함하고, 여기서 하나 또는 둘 다의 중쇄는 변형되고 이에 따라 상기 항체가 비-변형 제1 및 제2 중쇄를 포함하는 것을 제외하고는 동일한 항체에 비해 더 적은 정도로 Fc-매개된 이펙터 기능을 유도한다. 상기 Fc-매개된 이펙터 기능은 결정에 의해, Fcɣ 수용체에 대한 결합에 의해, C1q에 대한 결합에 의해, 또는 FcR의 Fc-매개된 가교의 유도에 의해 측정될 수 있다.

[0490] 또 다른 이러한 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 불변 서열은 변형되었고 이에 따라 상기 항체에 대한 C1q의 결합이 비변형 항체와 비교하여 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 100% 감소되며, 여기서 C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0491] 따라서, C1q 및 Fcɣ 수용체와의 상호작용에서 우세한 역할을 하는 Fc 영역 내의 아미노산이 변형될 수 있다.

[0492] 예를 들어 IgG1 이소형 항체에서 변형될 수 있는 아미노산 위치의 예는 위치 L234, L235 및 P331을 포함한다. 그의 조합, 예컨대 L234F/L235E/P331S는 인간 CD64, CD32, CD16 및 C1q에 대한 결합의 현저한 감소를 유발할 수 있다.

[0493] 따라서, 한 실시양태에서, L234, L235 및 P331에 상응하는 적어도 1개의 위치에서의 아미노산은 각각 A, A 및 S일 수 있다 (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26; Oganesyan et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4). 또한, L234F 및 L235E 아미노산 치환은 Fcɣ 수용체 및 C1q와의 상호작용이 제거되는 Fc 영역을 생성할 수 있다 (Canfield et al., 1991, J. Exp. Med. (173):1483-91; Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40). 따라서, 한 실시양태에서, L234 및 L235에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 F 및 E일 수 있다. D265A 아미노산 치환은 모든 Fcɣ 수용체에 대한 결합을 감소시킬 수 있고, ADCC를 방지할 수 있다 (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604). 따라서, 한 실시양태에서, D265에 상응하는 위치에서의 아미노산은 A일 수 있다. C1q에 대한 결합은 위치 D270, K322, P329 및 P331을 돌연변이시킴으로써 제거될 수 있다. 이들 위치를 D270A 또는 K322A 또는 P329A 또는 P331A로 돌연변이시키는 것은 항체가 CDC 활성이 결핍되도록 만들 수 있다 (Idusogie EE, et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84). 따라서, 한 실시양태에서, D270, K322, P329 및 P331에 상응하는 적어도 1개의 위치에서의 아미노산은 각각 A, A, A 및 A일 수 있다.

[0494] Fc 영역과 Fcɣ 수용체 및 C1q와의 상호작용을 최소화하기 위한 대안적 접근법은 항체의 글리코실화 부위를 제

거하는 것이다. 위치 N297를, 예를 들어 Q, A 또는 E로 돌연변이시키는 것은 IgG-Fc 감마 수용체 상호작용에 중요한 글리코실화 부위를 제거한다. 따라서, 한 실시양태에서, N297에 상응하는 위치에서의 아미노산은 G, Q, A 또는 E일 수 있다 (Leabman et al., 2013, MAbs; 5(6):896-903). Fc 영역과 Fcγ 수용체와의 상호작용을 최소화하는 또 다른 대안적 접근법은 하기 돌연변이에 의해 얻어질 수 있다: P238A, A327Q, P329A 또는 E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604).

[0495] 대안적으로, 인간 IgG2 및 IgG4 하위부류는 Fcγ 수용체와의 상호작용이 보고되어 있긴 하지만 (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725) C1q 및 Fc 감마 수용체와의 상호작용이 자연적으로 손상되어 있는 것으로 고려된다. 둘 다의 이소형에서 이들 잔기 상호작용을 제거하는 돌연변이를 만들어 FcR 결합과 연관된 원치않는 부작용을 감소시킬 수 있다. IgG2의 경우, 이들은 L234A 및 G237A를 포함하고, IgG4의 경우, L235E를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 인간 IgG2 중쇄 내의 L234 및 G237에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 A 및 A일 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 IgG4 중쇄 내의 L235에 상응하는 위치에서의 아미노산은 E일 수 있다.

[0496] IgG2 항체에서 Fcγ 수용체 및 C1q와의 상호작용을 추가로 최소화하기 위한 다른 접근법은 WO2011066501 및 문헌 [Lightle, S., et al., 2010, Protein Science (19):753-62]에 기재된 것을 포함한다.

[0497] 항체의 힌지 영역은 또한 Fcγ 수용체 및 보체와의 상호작용에 대하여 중요할 수 있다 (Brekke et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138; Dall'Acqua WF, et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138). 따라서, 힌지 영역 내의 돌연변이 또는 그의 결실은 항체의 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다.

[0498] 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄를 포함하고, 여기서 상기 제1 및 제2 이뮤노글로불린 중쇄 중 적어도 하나에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297 및 P331에 상응하는 위치에서의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L, D, N 및 P가 아니다.

[0499] 한 실시양태에서, 제1 및 제2 중쇄 둘 다에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235, D265, N297 및 P331에 상응하는 위치에서의 하나 이상의 아미노산은 각각 L, L, D, N 및 P가 아니다.

[0500] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 다에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치에서의 아미노산은 D가 아니다.

[0501] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 다에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 D265에 상응하는 위치에서의 아미노산은 A 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0502] 본 발명의 추가 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 L 및 L이 아니다.

[0503] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 F 및 E이다.

[0504] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 다에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 F 및 E이다.

[0505] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 중 적어도 하나에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및 D265에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 F, E 및 A이다.

[0506] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 중쇄 둘 다에서, 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및 D265에 상응하는 위치에서의 아미노산은 각각 F, E 및 A이다.

[0507] 본 발명의 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역을 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234 및 L235에 상응하는 제1 중쇄 및 제2 중쇄 둘 다의 위치는 각각 F 및 E이고, 여기서 (i) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 제1 중쇄의 위치는 L이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 R이거나, 또는 (ii) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제1 중쇄의 위치는 R이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 L이다.

[0508] 본 발명의 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 결합제는 제1 및 제2 중쇄 불변 영역을 포함하는 이중특이적 항체이고, 여기서 EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 위치 L234, L235 및 D265에 상응하는 제1 중쇄 및 제2 중쇄 둘 다의 위치는 각각 F, E 및 A이고, 여기서 (i) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는

제1 중쇄의 위치는 L이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 R이거나, 또는 (ii) EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 K409에 상응하는 제1 중쇄의 위치는 R이고, EU 넘버링에 따른 인간 IgG1 중쇄 내의 F405에 상응하는 제2 중쇄의 위치는 L이다.

[0509] 3개의 아미노산 치환 L234F, L235E 및 D265A 및 추가로 K409R 또는 F405L 돌연변이의 조합을 갖는 항체 변이체는 본원에서 각각 접미사 "FEAR" 또는 "FEAL"로 명명된다.

[0510] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:

[0511] (i) IgG1-CD137-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체 및 IgG1-PDL1-547-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체, 또는

[0512] (ii) IgG1-CD137-FEAR로부터 유래된 절반-분자 항체 및 IgG1-PD-L1-547-FEAL로부터 유래된 절반-분자 항체.

[0513] 본 발명의 추가 실시양태에서, 이중특이적 항체의 일부를 형성하는 하나 또는 둘 다의 항체는 이중특이적 항체의 혈청 반감기를 조작하기 위해 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합을 감소 또는 증가시키도록 조작되었다. 혈청 반감기를 증가 또는 감소시키는 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어 문헌 [Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24; Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176:346-56; 및 Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28:157-9]을 참조한다.

[0514] 접합체

[0515] 추가 측면에서, 본 발명은 1종 이상의 치료 모이어티, 예컨대 시토카인, 면역-억제제, 면역-자극 분자 및/또는 방사성동위원소에 연결되거나 접합된 항체를 제공한다. 이러한 접합체는 본원에서 "면역접합체" 또는 "약물 접합체"로 지칭된다. 1종 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 지칭된다.

[0516] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 Fc 서열은 약물 또는 전구약물에 접합되거나 또는 이를 위한 수용자 기를 함유한다. 이러한 수용자 기는, 예를 들어 비천연 아미노산일 수 있다.

[0517] 조성물

[0518] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 또는 측면 중 어느 하나에 따른 결합제 (예컨대 이중특이적 항체), 핵산, 발현 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제약 조성물이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제를 추가로 포함한다.

[0519] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 (예컨대 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체), 핵산, 발현 벡터 또는 숙주 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0520] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 하나의 결합제 (예컨대 하나의 다중특이적, 바람직하게는 이중특이적 항체) 또는 본 발명의 상이한 결합제들 (예컨대 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체들)의 조합을 함유할 수 있다.

[0521] 제약 조성물은 통상적인 기술, 예컨대 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은, 예를 들어 희석제, 충전제, 염, 완충제, 세제 (예를 들어 비이온성 세제, 예컨대 트윈-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어 당 또는 단백질-무함유 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제 및/또는 제약 조성물에 포함시키기에 적합한 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0522] 제약상 허용되는 담체는 본 발명의 결합제 (예를 들어 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체), 핵산, 발현 벡터 또는 숙주 세포와 생리학상 상용성인 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 덱스트로스, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 카르복시메틸 셀룰로스 콜로이드성 용액, 트라가칸트 검 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 및/또는 다양한 완충제를 포함한다. 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴을 사용함하여, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기를 유지하여, 및 계면활성제를 사용하여 유지될 수 있다.

[0523] 본 발명의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브

산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 유용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함할 수 있다.

[0524] 본 발명의 제약 조성물은 또한 조성물 내에 등장화제, 예컨대 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 포함할 수 있다.

[0525] 본 발명의 제약 조성물은 또한 선택된 투여 경로에 적절한, 제약 조성물의 보관 수명 또는 유효성을 증진시킬 수 있는 1종 이상의 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 완충제를 함유할 수 있다. 본 발명의 결합제 (예컨대 다중특이적, 예컨대 이중특이적 항체)는 결합제가 급속 방출되지 않게 해줄 담체와 함께 제조될 수 있으며, 예컨대 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제제로 제조될 수 있다. 이러한 담체는 젤라틴, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 단독으로 또는 왁스 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 물질과 함께 포함할 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 공지되어 있다.

[0526] 멸균 주사가능한 용액은 활성 화합물을 적절한 용매 중에 필요한 양으로, 예를 들어 상기 열거된 바와 같은 성분 중 하나 또는 조합과 함께 혼입시킨 후, 필요에 따라 멸균 마이크로여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 예를 들어 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법의 예는 이전에 멸균-여과된 그의 용액으로부터 활성 성분 플러스 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.

[0527] 제약 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이지 않으면서, 특정한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 목적하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 달라질 수 있다. 선택되는 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정한 조성물 또는 그의 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용될 특정한 화합물의 배출 속도, 치료의 지속기간, 사용되는 특정한 조성물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적 건강 및 과거 병력, 및 의학 기술분야에 널리 공지된 기타 인자를 포함한 다양한 약동학적 인자에 좌우될 것이다.

[0528] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식에 의해 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 "비경구로 투여되는"은 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 각피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0529] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.

[0530] 용도

[0531] 한 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0532] 추가 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0533] 추가 측면에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0534] 특히, 본 발명에 따른 결합제는 PD-L1을 발현하는 세포의 특이적 표적화 및 T 세포-매개된 사멸이 요망되는 치료 환경에서 유용할 수 있고, 이들은 특정의 이러한 적응증 및 환경에서 정규 항-PD-L1 항체와 비교하여 더 효율적일 수 있다.

[0535] 본 발명의 결합제는 또한 다양한 PD-L1-관련 질환의 요법 및 진단에서 추가의 유용성을 갖는다. 예를 들어, 결합제 (특히 항체)는 생체내 또는 시험관내에서 하기 생물학적 활성 중 하나 이상을 도출하는데 사용될 수 있다: PD-L1을 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제함; PD-L1을 발현하는 세포를 사멸시킴; 인간 이펙터 세포의

존재 하에 PD-L1을 발현하는 세포의 식세포작용 또는 ADCC를 매개함; 보체의 존재 하에 PD-L1을 발현하는 세포의 CDC를 매개함; PD-L1을 발현하는 세포의 아폽토시스를 매개함; 및/또는 PD-L1에 결합시 지질 래프트로의 전위를 유도함. 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 임의의 실시양태에 따른 결합제, 핵산, 발현 벡터, 세포 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 암인 질환의 치료에 관한 것이다.

[0536] 한 측면에서, 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0537] 추가 측면에서, 본 발명은 고형 종양의 존재를 특징으로 하는 암 질환의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0538] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 결합제, 핵산, 발현 벡터, 세포 또는 조성물은 암의 치료 또는 암의 치료 방법에 사용하기 위한 것이며, 여기서 암은 고형 종양의 존재를 특징으로 하거나 또는 흑색종, 난소암, 폐암, 결장암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0539] 추가 측면에서, 본 발명은 흑색종, 난소암, 폐암, 결장직장암, 두경부암, 위암, 유방암, 신암, 방광암, 식도암, 췌장암, 간암, 흉선종 및 흉선 암종, 뇌암, 신경교종, 부신피질 암종, 갑상선암, 다른 피부암, 육종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종, 골수이형성 증후군, 난소암, 자궁내막증 암, 전립선암, 음경암, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 메르켈 세포 암종 및 중피종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암 질환의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0540] 특정한 실시양태에서, 폐암은 비소세포 폐암 (NSCLC)이다.

[0541] 추가 측면에서, 본 발명은 의약, 예컨대 암, 예를 들어 고형 종양의 존재를 특징으로 하는 암 질환 또는 흑색종, 난소암, 폐암, 결장암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암 질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 따른 결합제 또는 본원에 개시된 바와 같은 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포 또는 제약 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0542] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 따른 방법 또는 용도는 1종 이상의 추가의 치료제, 예컨대 화학요법제와의 조합을 포함한다.

[0543] 한 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 개시된 임의의 실시양태에 따른 이중특이적 항체의 생산 방법에 관한 것이다:

[0544] a. 인간 CD137에 결합하는 항원-결합 영역을 포함하는 제1 항체를 생산하는 숙주 세포를 배양하고, 임의로 배양물로부터 상기 제1 항체를 정제하는 단계;

[0545] b. 인간 PD-L1에 결합하는 항원-결합 영역을 포함하는 제2 항체를 생산하는 숙주 세포를 배양하고, 임의로 배양물로부터 상기 제2 항체를 정제하는 단계;

[0546] c. 힌지 영역 내의 시스테인이 디술피드-결합 이성질화를 겪도록 하기에 충분한 환원 조건 하에 상기 제1 항체를 상기 제2 항체와 함께 인큐베이션하는 단계, 및

[0547] d. 상기 CD137xPD-L1 이중특이적 항체를 수득하는 단계.

[0548] 본 발명은 또한 PD-L1을 발현하는 1개 이상의 종양 세포의 성장 및/또는 증식의 억제 및/또는 PD-L1을 발현하는 1개 이상의 종양 세포의 사멸 및/또는 제거의 유도를 필요로 하는 개체에게 본 발명의 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체) 또는 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 종양 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하고/거나 그의 사멸 및/또는 제거를 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0549] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법에 관한 것이다:

[0550] a) PD-L1을 발현하는 종양 세포를 포함하는 암을 앓고 있는 대상체를 선택하는 단계, 및

[0551] b) 대상체에게 본 발명의 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체) 또는 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계.

[0552] 상기 치료 방법 및 용도에서의 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량

이 치료 상황의 위급성에 의해 나타나는 바와 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화될 수 있다.

[0553] 결합제에 대한 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료될 질환 또는 상태에 좌우되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 화합물의 치료 유효량에 대한 예시적인 비제한적 범위는 약 0.001-10 mg/kg, 예컨대 약 0.001-5 mg/kg, 예를 들어 약 0.001-2 mg/kg, 예컨대 약 0.001-1 mg/kg, 예를 들어 약 0.001, 약 0.01, 약 0.1, 약 1 또는 약 10 mg/kg이다. 본 발명의 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)의 치료 유효량에 대한 또 다른 예시적인 비제한적 범위는 약 0.1-100 mg/kg, 예컨대 약 0.1-50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1-20 mg/kg, 예컨대 약 0.1-10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 약 예컨대 0.3, 약 1, 약 3, 약 5 또는 약 8 mg/kg이다.

[0554] 관련 기술분야의 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 필요한 제약 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에 사용된 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)의 용량을, 목적하는 치료 효과를 달성하는데 필요한 수준보다 더 낮은 수준으로 시작하고, 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 생성하는데 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 투여는, 예를 들어 비경구, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 피하 투여일 수 있다. 한 실시양태에서, 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)는 $mg/m^2$로 계산된 매주 투여량으로의 주입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 투여량은, 예를 들어 용량 (mg/kg) x 70: 1.8에 따라 상기 제공된 mg/kg 투여량을 기준으로 할 수 있다. 이러한 투여는, 예를 들어 1 내지 8회, 예컨대 3 내지 5회 반복될 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예컨대 2 내지 12시간의 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)는 독성 부작용을 감소시키기 위해 장기간에 걸쳐, 예컨대 24시간을 초과하여 느린 연속 주입에 의해 투여될 수 있다.

[0555] 한 실시양태에서, 결합제는 1주 1회 주어지는 경우에 8회 이하, 예컨대 4 내지 6회의 고정 용량으로 계산된 매주 투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 요법은, 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에 필요에 따라 1회 이상 반복될 수 있다. 이러한 고정 투여량은, 예를 들어 체중 추정치를 70 kg으로 하여 상기 제공된 mg/kg 투여량을 기준으로 할 수 있다. 투여량은, 예를 들어 생물학적 샘플을 채취하고 본 발명의 항체의 PD-L1 항원-결합 영역을 표적화하는 항-이디오타입 항체를 사용함으로써 투여시 혈액 중 본 발명의 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)의 양을 측정함으로써 결정 또는 조정될 수 있다.

[0556] 한 실시양태에서, 결합제는 유지 요법으로서, 예컨대, 예를 들어 6개월 이상의 기간 동안 1주 1회 투여될 수 있다.

[0557] 결합제는 또한 암 발생의 위험을 감소시키고/거나, 암 진행에서 사건 발생의 개시를 지연시키고/거나, 암이 완화 상태인 경우 재발의 위험을 감소시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다.

[0558] 본 발명의 결합제는 또한 조합 요법으로, 즉 치료할 질환 또는 상태에 적절한 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합제 (예를 들어 이중특이적 항체)-함유 의약은 1종 이상의 추가의 치료제, 예컨대 세포독성제, 화학요법제 또는 항혈관신생제와 조합하기 위한 것이다.

[0559] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 제1 및/또는 제2 항원-결합 영역에 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

[0560] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 CD137-결합 영역에 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

[0561] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 PD-L1-결합 영역에 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

[0562] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되서는 안된다.

[0563] 서열

[0564] 표 1

| SEQ ID | 명칭 | 서열 |
|---|---|---|
| 1 | VH_b12 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQ RFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSL RSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS |
| 2 | VH_b12-CDR1 | GYRFSNFV |
| 3 | VH_b12-CDR2 | INPYNGNK |
| 4 | VH_b12-CDR3 | ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV |
| 5 | VL_b12 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQA PRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSYTFGQGTKLERK |
| 6 | VL_b12-CDR1 | HSIRSRR |
|  | VL_b12-CDR2 | GVS |
| 7 | VL_b12-CDR3 | QVYGASSYT |
| 8 | VH_CD137-009 | QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVRQAPGKG LEWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTA TYFCARGGLTYGFDLWGPGTLVTVSS |
| 9 | VH_CD137-009_CDR1 | GFSLNDYW |
| 10 | VH_CD137-009_CDR2 | IDVGGSL |
| 11 | VH_CD137-009_CDR3 | ARGGLTYGFDL |
| 12 | VL_CD137-009 | DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQKPGQRP KRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISDLESADAATYYCH YYATISGLGVAFGGGTEVVVK |
| 13 | VL_CD137-009_CDR1 | EDISSY |
|  | VL_CD137-009_CDR2 | GAS |
| 14 | VL_CD137-009_CDR3 | HYYATISGLGVA |
| 15 | VH_CD137-009-H7 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPG KGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLK TEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS |
| 9 | VH_CD137-009-H7_CDR1 | GFSLNDYW |
| 10 | VH_CD137-009-H7_CDR2 | IDVGGSL |
| 11 | VH_CD137-009-H7_CDR3 | ARGGLTYGFDL |

[0565]

| | | |
|---|---|---|
| 16 | VL_CD137-009-L2 | DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAP KRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCH YYATISGLGVAFGGGTKVEIK |
| 13 | VL_CD137-009-L2_CDR1 | EDISSY |
| | VL_CD137-009-L2_CDR2 | GAS |
| 14 | VL_CD137-009-L2_CDR3 | HYYATISGLGVA |
| 17 | VH-PD-L1-547 | EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGK GLEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSSLR AEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQGTLVTVSS |
| 18 | VH- PD-L1-547-CDR1 | GSTFSTYA |
| 19 | VH- PD-L1-547-CDR2 | FSGSGGFT |
| 20 | VH- PD-L1-547-CDR3 | AIPARGYNYGSFQH |
| 21 | VL- PD-L1-547 | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL |
| 22 | VL- PD-L1-547-CDR1 | NIGSKS |
| | VL- PD-L1-547-CDR2 | DDN |
| 23 | VL- PD-L1-547-CDR3 | QVWDSSSDHVV |
| 24 | IgG1-FEAR-Fc | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 25 | IgG1-FEAL-Fc | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0566]

| | | |
|---|---|---|
| 26 | 카파-C | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD<br>NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 27 | 람다-C | GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD<br>SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV<br>THEGSTVEKTVAPTECS |
| 28 | 인간 PD-L1 | MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVE<br>KQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLK<br>DQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAP<br>YNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG<br>KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE<br>LVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVK<br>KCGIQDTNSKKQSDTHLEET |
| 29 | 시노몰구스 원숭이 PD-L1 | MRIFAVFIFTIYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEK<br>QLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKD<br>QLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY<br>NKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGK<br>TTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELV<br>IPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRMMDMKKC<br>GIRVTNSKKQRDTQLEET |
| 30 | 인간 CD137 | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI<br>CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC<br>TPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKR<br>GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP<br>PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLL<br>YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 31 | 시노몰구스 원숭이 CD137 | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDLCSNCPAGTFCDNNRSQI<br>CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDC<br>ISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG<br>ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPP<br>APAREPGHSPQIIFFLALTSTVVLFLLFFLVLRFSVVKRSRKKLLYIF<br>KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 32 | 인간 CD137 셔플 6 (멧돼지 CD137의 아미노산 24-47) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCGKNIQELC<br>MPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC<br>TPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKR<br>GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP<br>PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLGGCEL |

[0567]

| | | |
|---|---|---|
| 33 | 인간 CD137 서플 5 (아프리카 코끼리 CD137의 아미노산 48-88) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI CSPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVFKTKRACSPTRDAECE CTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSV TPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 34 | 인간 CD137 서플 4 (멧돼지 CD137의 아미노산 89-114) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC VPGFRCLGAGCAMCEEYCQQGQELTQKGCKDCCFGTFNDQKR GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 35 | 인간 CD137 서플 3 (멧돼지 CD137의 아미노산 115-138) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC TPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKEGCKDCSFGTFNDEEHG VCRPWTDCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 36 | 인간 CD137 서플 2 (멧돼지 CD137의 아미노산 139-161) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC TPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKR GICRPWTNCSLAGKPVLMNGTKARDVVCGPRPADLSPGASSVT PPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 37 | 인간 CD137 서플 1 (멧돼지 CD137의 아미노산 162-186) | MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQI CSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC TPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKR GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPTDFSPGTPSTTM PVPGGEPGHTSHIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL |
| 38 | 멧돼지 CD137 | MGNGYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCGKNIQEL CMPCPSNSFSSTSGQKACNVCRKCEGVFRTKKECSSTSNAVCE CVPGFRCLGAGCAMCEEYCQQGQELTQEGCKDCSFGTFNDEEH GVCRPWTDCSLAGKPVLMNGTKARDVVCGPRPTDFSPGTPSTT MPVPGGEPGHTSHVIIFFLALMSTAVFVLVSYLALRFSVVQQGRK KLLYIVKQPFLKPAQTVQEEDACSCRFPEEEEGECEL |

[0568]

| | | |
|---|---|---|
| 39 | 아프리카 코끼리 CD137 | MGNGYYNMVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGTYCVKNESQ ICSPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVFKTKRACSPTRDAECE CVSGFHCLGAGCTMCQQDCKQGQELTKEGCKDCCLGTFNDQK NGICRPWTNCSLEGKSVLANGTKKRDVVCGPPAADSFPDTSSVT VPAPERKPDHHPQIITFFLALISAALLFLVFFLVVRFSVAKWGRKK LLYIFKQPFIKPVQTAQEEDGCSCRFPEEEEGDCEL |
| 40 | 인간 CD137<br>아미노산 48-88 | CPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDC |
| 41 | 인간 CD137 (성숙 단백질) | LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQG QELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTK ERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTA LLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL |
| 42 | VH-CD137-MOR7480-FEAR | EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGK GLEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLVTVSS |
| 43 | VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR1 | GYSFSTYW |
| 44 | VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR2 | IYPGDSYT |
| 45 | VH-CD137-MOR7480-FEAR_CDR3 | ARGYGIFDY |
| 46 | VL-CD137-MOR7480 (람다) | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC ATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL |
| 47 | VL-CD137-MOR7480_CDR1 | NIGDQY |
| | VL-CD137-MOR7480_CDR2 | QDK |
| 48 | VL-CD137-MOR7480_CDR3 | ATYTGFGSLAV |
| 49 | VH-CD137-005-FEAR | QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTISDFHVTWVRQAPGKGL EWIGTIITSASTTAYATWARGRFTISKSSTTVNLKIVSPTTEDTAT YFCARSTYTDTSGYYFDFWGQGTLVTVSS |
| 50 | VH-CD137-005-FEAR_CDR1 | GFTISDFH |

[0569]

| | | |
|---|---|---|
| 51 | VH-CD137-005-FEAR_CDR2 | IITSASTT |
| 52 | VH-CD137-005-FEAR_CDR3 | ARSTYTDTSGYYFDF |
| 53 | VL-CD137-005 (카파) | AQVLTQTASPVSAAVGGTVIINCQSSQSIYNGNRLSWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKGSGSGTQFTLAISDVQSDDAATYYCLGSYDCDSADCFAFGGGTEVVVE |
| 54 | VL-CD137-005_CDR1 | QSIYNGNR |
| | VL-CD137-005_CDR2 | SAS |
| 55 | VL-CD137-005_CDR3 | LGSYDCDSADCFA |
| 56 | 재조합 인간 인터류킨 유사체 (프로류킨® (알데스류킨)) | MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMSEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT |
| 57 | MPDL3280A VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWYRQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS |
| 58 | MPDL3280A VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK |

[0570]

[0571] 실시예

[0572] 실시예 1: CD137 항체의 생성

[0573] WO2016/110584의 실시예 1에 기재된 바와 같이 항체 CD137-005 및 CD137-009를 생성하였다. 간략하게, 인간 CD137-Fc 융합 단백질을 함유하는 단백질의 혼합물로 토끼를 면역화시켰다. 혈액으로부터의 단일 B 세포를 분류하고, ELISA 및 유동 세포측정법에 의해 CD137 특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝하였다. 스크리닝-양성 B 세포로부터, RNA를 추출하고, 서열분석을 수행하였다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 유전자 합성하고, 하기 아미노산 돌연변이: L234F, L235E, D265A 및 F405L (FEAL) 또는 F405L (FEAL) (여기서 아미노산 위치 번호는 EU 넘버링에 따름 (서열식별번호: 25에 상응함))을 함유하는 인간 IgG1 중쇄를 포함하는 인간 IgG1 카파 발현 벡터 또는 인간 IgG1 람다 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 키메라 CD137 항체 (CD137-009)의 가변 영역 서열은 본원 서열 목록 서열식별번호: 8 및 서열식별번호: 12에 제시된다.

[0574] 실시예 2: 토끼 (키메라) CD137 항체의 인간화

[0575] 안티토프(Antitope) (영국 캠브리지)에서 토끼 항-CD137-009로부터의 인간화 항체 서열을 생성하였다. 배선 인간화 (CDR-그라프팅) 기술을 사용하여 인간화 항체 서열을 생성하였다. 토끼 항체의 VH 및 Vκ 아미노산 서열에 대해 가장 근접한 상동성을 갖는 인간 배선 서열에 기초하여 인간화 V 영역 유전자를 설계하였다. 일련의 7개의 VH 및 3개의 Vκ (VL) 배선 인간화 V-영역 유전자를 설계하였다. 항체의 결합 특성에 중요할 수 있는 V 영역 프레임워크 내의 아미노산을 확인하기 위해 스위스 PDB를 사용하여 비-인간 모 항체 V 영역의 구조 모델을 제조하고 분석하였다. 이들 아미노산을 1종 이상의 변이체 CDR-그라프팅된 항체 내로의 혼입에 대해 주목하였다. 인간화 설계에 대한 기초로서 사용된 배선 서열은 표 2에 제시된다.

[0576] 표 2: 가장 근접하게 매칭되는 인간 배선 V 절편 및 J 절편 서열.

| 항체 | 중쇄 | | 경쇄 (κ) | |
|---|---|---|---|---|
| | 인간 V 영역 배선 절편 | 인간 J 영역 배선 절편 | 인간 V 영역 배선 절편 | 인간 J 영역 배선 절편 |
| 토끼 항-CD137-009 | hIGHV3-49*04 | hIGHJ4 | hIGKV1-33*01 | IGKJ4 |

[0577]

[0578] 이어서, 안티토프의 독점적 인실리코 기술인 iTope™ 및 TCED™ (T 세포 에피토프 데이터베이스)를 사용하여 최저 발생률의 잠재적 T 세포 에피토프를 갖는 변이체 서열을 선택하였다 (Perry, L.C.A, Jones, T.D. and Baker, M.P. New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during

Preclinical Development (2008). Drugs in R&D 9 (6): 385-396; 20 Bryson, C.J., Jones, T.D. and Baker, M.P. Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins (2010). Biodrugs 24 (1):1-8). 최종적으로, 설계된 변이체의 뉴클레오티드 서열을 코돈-최적화하였다. 인간화 CD137 항체 (CD137-009-HC7LC2)의 가변 영역 서열은 본원 서열 목록 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 16에 제시된다.

[0579] 실시예 3: CD137 항체의 결합에 중요한 도메인을 결정하기 위한 멧돼지 CD137 또는 코끼리 CD137과 인간 CD137 사이의 DNA 셔플링

[0580] 인간 CD137에 대한 CD137 항체의 결합에 중요한 도메인을 결정하기 위해, 인간과 멧돼지 CD137 (수스 스크로파; XP_005665023) 사이 또는 인간과 아프리카 코끼리 CD137 (록소돈타 아프리카나; XP_003413533) 사이에서 DNA 셔플링을 수행하였다. 인간 CD137을 코딩하는 DNA로부터 인간 도메인을 멧돼지 도메인으로 대체하여 셔플 구축물 (셔플 구축물 1-4, 6)을 제조하거나 또는 인간 도메인을 코끼리 도메인으로 대체하여 셔플 구축물 (셔플 구축물 5)을 제조하였다. 셔플 구축물의 아미노산 서열은 표 1에 제시된다.

[0581] 인간 CD137에서의 도메인이 항-CD137 항체의 결합에 중요한 경우, 그러한 도메인을 멧돼지 또는 아프리카 코끼리 도메인으로 교체할 때 결합은 상실될 것이다.

[0582] 인간과 멧돼지 CD137 사이의 상동성 및 인간과 아프리카 코끼리 CD137 사이의 상동성은 각각 70.2 및 74.5%이다. 이들 두 종의 선택을 위한 요건은, 아프리카 코끼리 및 멧돼지에서의 관심 도메인이 미스폴딩 또는 발현 상실의 위험을 최소화하는데 필요한 중요한 구조적 상호작용은 유지하면서 결합 상실을 유발하기에 인간과 비교하여 충분히 상이하다는 것이었다. 도 1은 인간, 멧돼지 및 아프리카 코끼리 CD137의 서열 정렬을 보여준다. 도 2는 나타낸 바와 같이 멧돼지 CD137 또는 아프리카 코끼리 CD137 도메인을 함유하는 인간 CD137에 대한 구축물을 보여준다.

[0583] T75 배양 플라스크 (그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One), 카탈로그 번호 658175) 내 10% FCS (바이오크롬(Biochrom), 카탈로그 번호 S 0115)를 함유하는 RPMI 1640 글루타맥스 배지 20 mL 중에 3 x $10^6$개의 HEK293T-17 세포를 시딩하였다. 밤새 인큐베이션한 후에, 제조업체의 지침에 따라 트랜스IT(TransIT)®-LT1 형질감염 시약, 미루스 바이오(Mirus Bio) (VWR 인터내셔널(VWR International), 카탈로그 번호 731-0029)를 사용하여 구성적으로 활성인 인간 신장 인자-1 알파 (EF-1 알파) 프로모터의 하류에 셔플 구축물 또는 멧돼지, 아프리카 코끼리 또는 인간 CD137을 코딩하는 발현 벡터를 세포에 일시적으로 형질도입시켰다. 다음 날, 1.5 mL 아큐타제 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 카탈로그 번호 A6964)를 사용 (37℃에서 5분 동안 인큐베이션)하여 세포를 수거하고, 셔플 구축물 및 인간, 아프리카 코끼리 및 멧돼지 CD137의 표면 발현을 측정하기 위해 및 상이한 셔플 구축물에 대한 항체 클론의 결합을 측정하기 위해, 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 유동 세포측정법을 수행하였다. 구축물의 세포 표면 발현을 측정하기 위해, 형질도입된 세포를 FACS 완충제 중 1 μg/mL 염소 폴리클로날 항-인간 CD137 (알앤디 시스템즈(R&D Systems), 카탈로그 번호 AF838)과 함께 인큐베이션하고 (4℃, 20분), 이어서 APC-표지된 항-염소 IgG (H+L) (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 F0108)와 함께 인큐베이션하였다 (4℃, 20분). 형질도입된 세포를 1 μg/mL의 항체 클론과 함께 인큐베이션하고, 이어서 APC-표지된 아피니퓨어 F(ab')2 단편 (1:50 최종 희석물; 잭슨(Jackson), 카탈로그 번호 109-136-127)과 함께 인큐베이션하여 셔플 구축물을 발현하는 세포에 대한 상이한 CD137 항체 클론의 결합을 측정하였다.

[0584] 모든 CD137 셔플 구축물, 뿐만 아니라 인간, 아프리카 코끼리 및 멧돼지 CD137은 유사한 발현 수준으로 세포 표면 상에서 발현되었다 (도 3).

[0585] 도 4는 CD137-009가 아프리카 코끼리 및 멧돼지 CD137에 대한 결합의 상실을 나타냈다는 것을 보여준다. CD137-009는 또한 인간 CD137에 대한 결합과 비교하여 셔플 구축물 5에 대한 결합의 상실을 나타냈다.

[0586] 실시예 4: PD-L1 항체의 생성

[0587] 알데브론 게엠베하(Aldevron GmbH) (독일 프라이부르크)에서 면역화 및 하이브리도마 생성을 수행하였다. 인간 PD-L1의 아미노산 19-238을 코딩하는 cDNA를 알데브론 독점적 발현 플라스미드 내로 클로닝하였다. 입자-충격 용 핸드-헬드 장치 ("유전자 총")를 사용하는 인간 PD-L1 cDNA-코팅된 금-입자의 피내 적용을 사용하여 옴니래트 동물 (완전 인간 이디오타입을 갖는 항체의 다양화된 레퍼토리를 발현하는 트랜스제닉 래트; 리간드 파마슈티칼스 인크.(Ligand Pharmaceuticals Inc.), 미국 샌디에고)을 면역화시킴으로써 항체 PD-L1-547을 생성하였다. 혈청 샘플을 일련의 면역화 후에 수집하고, 인간 PD-L1을 발현하는 상기 언급된 발현 플라스미드에 의해 일시적으로 형질감염된 HEK 세포 상에서 유동 세포측정법으로 시험하였다. 항체-생산 세포를 단리하고, 표준 절차에 따라 마우스 골수종 세포 (Ag8)와 융합시켰다. PD-L1 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마로부터의

RNA를 추출하고, 서열분석을 수행하였다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 (서열식별번호: 17 및 21)을 유전자 합성하고, 하기 아미노산 돌연변이: L234F, L235E, D265A 및 K409R (FEAR) (여기서 아미노산 위치 번호는 EU 넘버링에 따름 (서열식별번호: 24에 상응함))을 함유하는 인간 IgG1 중쇄를 포함하는 인간 IgG1 람다 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0588] 실시예 5: 2-MEA-유도된 Fab-아암 교환에 의한 이중특이적 항체의 생성

[0589] 제어된 환원 조건 하에서 Fab-아암-교환에 의해 이중특이적 IgG1 항체를 생성하였다. 이러한 방법에 대한 기초는 WO2011/131746에 기재된 바와 같은 특정 검정 조건 하에서 이종이량체의 형성을 촉진하는 상보적 CH3 도메인의 사용이다. F405L 및 K409R (EU 넘버링) 돌연변이를 관련 항체 내로 도입하여 상보적 CH3 도메인을 갖는 항체 쌍을 생성하였다.

[0590] 이중특이적 항체를 생성하기 위해, 2종의 모 상보적 항체를, 각각 0.5 mg/mL의 최종 농도의 항체로, 100 μL PBS의 총 부피 중 75 mM 2-메르캅토에틸아민-HCl (2-MEA)과 함께 31℃에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 스핀 칼럼 (마이크로콘 원심분리 필터, 30k, 밀리포어(Millipore))을 사용하여 환원제 2-MEA를 제거함으로써 환원 반응을 정지시켰다.

[0591] 실시예 1 및 4로부터의 하기 항체들을 조합함으로써 이중특이적 항체를 생성하였다:

[0592] - PD-L1-547-FEAR 항체와 조합된 CD137-009-FEAL 항체,

[0593] - CD137-009-FEAR과 조합된 PD-L1-547-FEAL 항체,

[0594] - CD137-009-HC7LC2-FEAR 항체와 조합된 PD-L1-547-FEAL 항체,

[0595] - 제1 아암으로서 gp120 특이적 항체인 항체 b12를 사용하여 PD-L1-547-FEAR 항체, CD137-009-FEAR 또는 CD137-009-HC7LC2-FEAR 항체와 조합된 b12-FEAL 항체 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23),

[0596] - PD-L1-547-FEAL 또는 CD137-009-FEAL와 b12-FEAR 항체.

[0597] 실시예 6: PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 PD-L1 항체의 효과

[0598] 프로메가(Promega) (미국 매디슨)에 의해 개발된 PD-1/PD-L1 억제 생물검정에서 PD-1 및 PD-L1의 상호작용에 대한 1가 PD-L1 항체 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 효과를 결정하였다. 이는 다음 2종의 유전자 조작된 세포주로 이루어진 생물발광 세포-기반 검정이다: 인간 PD-1 및 NFAT 반응 요소 (NFAT-RE)에 의해 유도되는 루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat T 세포인 PD-1 이펙터 세포, 및 인간 PD-L1 및 항원-비의존성 방식으로 동족 TCR을 활성화시키도록 설계된 조작된 세포 표면 단백질을 발현하는 CHO-K1 세포인 PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포. 2종의 세포 유형이 공동-배양되는 경우, PD-1/PD-L1 상호작용은 TCR 신호전달 및 NFAT-RE-매개된 발광을 억제한다. PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 항체의 첨가는 억제 신호를 방출하고, TCR 활성화 및 NFAT-RE-매개된 발광을 유발한다.

[0599] PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포 (프로메가, 카탈로그 번호 J109A)를 제조업체의 프로토콜에 따라 해동시키고, 10% 태아 소 혈청 (FBS; 프로메가, 카탈로그 번호 J121A)을 함유하는 햄 F12 배지 (프로메가, 카탈로그 번호 J123A)에 재현탁시키고, 96 웰 편평 바닥 배양 플레이트 (컬처플레이트-96, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer), 카탈로그 번호 6005680)에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃, 5% $CO_2$에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 제거하고, 항체의 연속 희석물 (5 내지 0.001 μg/mL 범위의 최종 농도; 1% 태아 소 혈청 [FBS; 프로메가, 카탈로그 번호 J121A]을 함유하는 RPMI 1640 [론자, 카탈로그 번호 BE12-115F] 중 4배 희석물)을 첨가하였다. PD-1 이펙터 세포 (프로메가, 카탈로그 번호 J115A; 제조업체의 프로토콜에 따라 해동되고 RPMI/1% FBS 중에 재현탁됨)를 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% $CO_2$에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 실온으로 평형화시킨 후, 40 μl 바이오-글로 시약 (제조업체의 프로토콜에 따라 바이오-글로 루시페라제 검정 완충체 [프로메가, 카탈로그 번호 G7198] 중에 재구성된 바이오-글로 루시페라제 검정 기질 [프로메가 카탈로그 번호 G720B])을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 5-10분 동안 인큐베이션하고, 엔비전 다중표지 판독기 (퍼킨엘머)를 사용하여 발광을 측정하였다. 대조군 (첨가된 항체 부재) 대비 PD1-PD-L1 상호작용에 대한 효과를 하기와 같이 계산하였다:

[0600] 배수 유도 = RLU (유도-배경)/RLU (항체 부재 대조군-배경), RLU는 상대 광 단위이다.

[0601] 도 5는 1가 항체 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR이 PD1-PD-L1 상호작용을 효율적으로 억제하였다는 것을 보여준다.

[0602] 실시예 7: PD-L1 및 CD137에 결합하는 이중특이적 항체에 의한 효과를 측정하기 위한 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 증식 검정

[0603] CD137xPD-L1 이중특이적 항체의 예상되는 작용 방식의 개략적 표현이 도 6에 제시된다.

[0604] 항원-특이적 검정에서 PD-L1 및 CD137을 표적화하는 이중특이적 항체에 의한 T 세포 증식의 유도를 측정하기 위해, 수지상 세포 (DC)를 클라우딘-6의 시험관내 전사된 RNA (IVT-RNA)로 형질감염시켜 클라우딘-6 항원을 발현시켰다. T 세포를 PD-1 IVT-RNA 및 클라우딘-6-특이적, HLA-A2-제한된 T 세포 수용체 (TCR)로 형질감염시켰다. 이러한 TCR은 DC 상의 HLA-A2에 제시된 클라우딘-6-유래 에피토프를 인식할 수 있다. CD137xPD-L1 이중특이적 항체는 단핵구-유래 수지상 세포 상 또는 종양 세포 상에서 내인성으로 발현된 PD-L1 및 T 세포 상의 CD137을 가교시켜, 억제 PD-1/PD-L1 상호작용의 억제 및 동시에 CD137의 클러스터링을 유도하여, T 세포 증식을 유발할 수 있다. T 세포 상에서 발현된 CD137 수용체의 클러스터링은 CD137 수용체의 활성화를 유도하여, T 세포에 공동-자극 신호를 전달한다.

[0605] 건강한 공여자로부터 $HLA-A2^+$ 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 수득하였다 (독일 마인츠 소재 대학 병원 수혈센터). 제조업체의 지침에 따라 항-CD14 마이크로비드 (밀테니(Miltenyi); 카탈로그 번호 130-050-201)를 사용하여 자기-활성화 세포 분류 (MACS) 기술에 의해 PBMC로부터 단핵구를 단리하였다. 향후 T-세포 단리를 위해 말초 혈액 림프구 (PBL, CD14-음성 분획)를 동결시켰다. 미성숙 DC (iDC)로의 분화를 위해, $1x10^6$개 단핵구/ml을, 5% 인간 AB 혈청 (시그마-알드리치 케미 게엠베하(Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 카탈로그 번호 H4522-100ML), 피루브산나트륨 (라이프 테크놀로지스 게엠베하(Life technologies GmbH), 카탈로그 번호 11360-039), 비-필수 아미노산 (라이프 테크놀로지스 게엠베하, 카탈로그 번호 11140-035), 100 IU/mL 페니실린-스트렙토마이신 (라이프 테크놀로지스 게엠베하, 카탈로그 번호 15140-122), 1000 IU/mL 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF; 밀테니, 카탈로그 번호 130-093-868) 및 1,000 IU/mL 인터류킨-4 (IL-4; 밀테니, 카탈로그 번호 130-093-924)를 함유하는 RPMI 글루타맥스 (라이프 테크놀로지스 게엠베하, 카탈로그 번호 61870-044) 중에서 5일 동안 배양하였다. 이들 5일 동안, 배지의 절반을 신선한 배지로 대체하였다. 비-부착 세포를 수집함으로써 iDC를 수거하고, 부착 세포를 37℃에서 10분 동안 2mM EDTA를 함유하는 PBS와 함께 인큐베이션함으로써 탈착시켰다. 세척 후에, 향후 항원-특이적 T 세포 검정을 위해 10% v/v DMSO (어플라이켐 게엠베하(AppliChem GmbH), 카탈로그 번호 A3672,0050) + 50% v/v 인간 AB 혈청을 함유하는 RPMI 글루타맥스 중에서 iDC를 동결시켰다.

[0606] 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 증식 검정을 시작하기 1일 전에, 동일한 공여자로부터의 동결된 PBL 및 iDC를 해동시켰다. 제조업체의 지침에 따라 항-CD8 마이크로비즈 (밀테니, 카탈로그 번호 130-045-201)를 사용하여 MACS 기술에 의해 PBL로부터 $CD8^+$ T 세포를 단리하였다. 약 10-15 x $10^6$개의 $CD8^+$ T 세포에 BTX ECM® 830 전기천공 시스템 장치 (BTX; 500 V, 1 x 3 ms 펄스)를 사용하여 4-mm 전기천공 큐벳 (VWR 인터내셔널 게엠베하, 카탈로그 번호 732-0023) 내 250 µL X-Vivo15 (바이오짐 사이언티픽 게엠베하(Biozym Scientific GmbH), 카탈로그 번호 881026) 중에서 클라우딘-6-특이적 뮤린 TCR (HLA-A2-제한; WO 2015150327 A1에 기재됨)의 알파-쇄를 코딩하는 시험관내 번역된 (IVT)-RNA 10 µg 플러스 베타-쇄를 코딩하는 IVT-RNA 10 µg 플러스 PD-1을 코딩하는 IVT-RNA 10 µg을 전기천공으로 도입하였다. 전기천공 직후, 세포를 5% 인간 AB 혈청이 보충된 신선한 IMDM 배지 (라이프 테크놀로지스 게엠베하, 카탈로그 번호 12440-061) 내로 옮기고, 37℃, 5% $CO_2$에서 적어도 1시간 동안 휴지시켰다. T 세포를 제조업체의 지침에 따라 PBS 중 1.6 µM 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE; 인비트로젠(Invitrogen), 카탈로그 번호 C34564)를 사용하여 표지하고, 5% 인간 AB 혈청이 보충된 IMDM 배지 중에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0607] 5 x $10^6$개 이하의 해동된 iDC에 상기 기재된 바와 같은 전기천공 시스템 (300 V, 1x12 ms 펄스)을 사용하여 250 µL X-Vivo15 배지 중에서 전장 클라우딘-6을 코딩하는 IVT-RNA 5 µg을 전기천공으로 도입하고, 5% 인간 AB 혈청이 보충된 IMDM 배지 중에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0608] 다음 날, 세포를 수거하였다. DC 상의 클라우딘-6 및 PD-L1 및 T 세포 상의 TCR 및 PD-1의 세포 표면 발현을 유동 세포측정법에 의해 검사하였다. DC를 알렉사647-접합된 CLDN6-특이적 항체 (비-상업적으로 입수가능함; 사내 생산) 및 항-인간 CD274 항체 (PD-L1, 이바이오사이언스, 카탈로그 번호 12-5983)로 염색하고, T 세포를 항-마우스 TCR β 쇄 항체 (벡톤 디킨슨 게엠베하(Becton Dickinson GmbH), 카탈로그 번호 553174) 및 항-인간 CD279 항체 (PD-1, 이바이오사이언스, 카탈로그 번호 17-2799)로 염색하였다. 5,000개의 전기천공된 DC를 96-

웰 둥근 바닥 플레이트 내 5% 인간 AB 혈청이 보충된 IMDM 글루타맥스 중에서 이중특이적 또는 대조군 항체의 존재 하에 50,000개의 전기천공된 CFSE-표지된 T 세포와 함께 인큐베이션하였다. 5일 후 T 세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 플로우조 소프트웨어에 의해 세포 분열을 나타내는 CFSE-피크에 기초한 T 세포 증식의 상세한 분석을 하였다. 결과에서, '% 분열 세포'는 분열에 이른 세포의 백분율을 나타내고, '증식 지수'는 분열에 이른 세포의 평균 분열 수를 나타낸다.

[0609] 1개의 비관련 결합-아암을 갖는 1가 PD-L1-대조군 항체인 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR은 b12 (정규 IgG1로서)와의 인큐베이션과 비교하여 특정 정도로 T 세포 증식을 증진시켰고, 이중특이적 항체 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR은 $CD8^+$ T 세포의 강한 증식을 유도하였다 (도 7). 이는 분열 세포 백분율의 증가 (도 7B 및 D 좌측 패널), 뿐만 아니라 증식 지수의 증가 (도 7B 및 D 우측 패널) 둘 다에 의해 반영되었다.

[0610] 추가로, 본 검정에서 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR에 대해 $EC_{50}$ 값을 결정하였다. 이를 위해, 이중특이적 항체를 1 내지 0.00015 μg/mL의 3배 연속 희석물로 분석하였다 (도 8). 분열 세포의 백분율 및 증식 지수를 플로우조 소프트웨어에 의해 결정하였다. 그래프패드 프리즘 5 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)에 의해 곡선을 분석하였다. CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR의 항원-특이적 T 세포 증식 유도의 $EC_{50}$ 값은 '% 분열 세포'에 대해 0.003492 μg/mL 및 '증식 지수'에 대해 0.005388 μg/mL였다.

[0611] 실시예 8: 활성 PD1/PD-L1 축을 갖는 항원-특이적 T-세포 검정에서 PD-L1 및 CD137을 표적화하는 이중특이적 항체와 2종의 1가 결합 CD137 및 PD-L1 항체의 조합 또는 2종의 모 항체의 조합 (PD-L1-547 + CD137-009)과의 비교

[0612] PD-L1 및 CD137을 표적화하는 이중특이적 항체에 의한 T 세포 증식의 유도를 측정하기 위해, 활성 PD1/PD-L1 축을 갖는 항원-특이적 T 세포 증식 검정을 수행하였다 (실시예 7과 유사한 일반적 검정 설정). 간략하게, 5,000개의 클라우딘-6-IVT-RNA 전기천공된 DC를, 96-웰 둥근 바닥 플레이트 내 5% 인간 AB 혈청이 보충된 IMDM 글루타맥스 중에서 이중특이적 또는 대조군 항체의 존재 하에 50,000개의 클라우딘-6-특이적 TCR- 및 PD1-IVT-RNA 전기천공된 CFSE-표지된 T 세포와 함께 인큐베이션하였다. 5일 후 T 세포 증식을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 세포 분열을 나타내는 CFSE-피크에 기초한 T 세포 증식의 상세한 분석을 수행하였다. 결과에서, '% 분열 세포'는 분열에 이른 세포의 백분율을 나타내고, '증식 지수'는 분열에 이른 세포의 평균 분열 수를 나타낸다.

[0613] 1개의 비관련 결합-아암을 갖는 1가 CD137-대조군 항체 CD137-009-FEALxb12-FEAR 및 상응하는 2가 모 항체 CD137-009는 IgG1-b12와 비교하였을 때 T 세포 증식에 영향을 미치지 않았다. 대조적으로, 1가 PD-L1-대조군 항체뿐만 아니라 2가 모 항체 (각각 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR 및 PD-L1-547)와의 인큐베이션은 IgG1-b12 대조군 항체와의 인큐베이션과 비교하여 중간 정도로 증진된 T-세포 증식을 유도하였다. 조합된 1가 대조군 항체 (CD137-009-FEALxb12-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) 및 조합된 상응하는 모 항체 (CD137-009 + PD-L1-547)와의 인큐베이션시 대등한 수준의 T-세포 증식이 검출가능하였다. 대조적으로, 이중특이적 항체 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR은 $CD8^+$ T 세포의 강한 증식을 유도하였으며, 이는 조합된 대조군 (1가 및 2가) 둘 다보다 우수하였다 (도 9). 이는 분열 세포 백분율의 증가 (도 9B) 뿐만 아니라 증식 지수의 증가 (도 9C) 둘 다에 의해 반영되었다.

[0614] 실시예 9: 종양 침윤 림프구에 대한 CD137xPD-L1 이중특이적 항체의 효과를 평가하기 위한 생체외 TIL 확장 검정.

[0615] 종양 침윤 림프구 (TIL)에 대한 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR의 효과를 평가하기 위해, 인간 종양 조직의 생체외 배양을 하기와 같이 수행하였다. 단리된 종양 덩어리를 세척 배지를 함유하는 6-웰 플레이트 (피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) 카탈로그 번호 10110151) 내의 한 웰에서 다음 웰로 스패튤라 또는 혈청학적 피펫을 사용하여 옮김으로써 신선한 인간 종양 조직 절제 시편을 3회 세척하였다. 세척 배지는 1% Pen/Strep (써모 피셔(Thermo Fisher), 카탈로그 번호 15140-122) 및 1% 푼기존 (써모 피셔, 카탈로그 번호 15290-026)이 보충된 X-VIVO 15 (바이오짐, 카탈로그 번호 881024)로 구성되었다. 이어서, 수술용 나이프 (브라운/로스(Braun/Roth), 카탈로그 번호 5518091 BA223)를 사용하여 종양을 절개하고, 직경이 약 1-2 mm인 조각으로 절단하였다. 2개의 조각을 각각 1 mL TIL 배지 (X-VIVO 15, 10% 인간 혈청 알부민 (HSA, CSL 베링(CSL Behring), 카탈로그 번호 PZN-6446518) 1% Pen/Strep, 1% 푼기존 및 10 U/mL IL-2 (프로류킨®S, 노파르티스 파마(Novartis Pharma), 카탈로그 번호 02238131)이 보충됨)를 함유하는 24-웰 플레이트 (VWR 인터내셔널, 카탈로

그 번호 701605)의 1개의 웰 내에 넣었다. CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR을 나타낸 최종 농도로 첨가하였다. 배양 플레이트를 37℃ 및 5% $CO_2$에서 인큐베이션하였다. 72시간 후에, 나타낸 농도의 이중특이적 항체를 함유하는 신선한 TIL 배지 1 mL를 각각의 웰에 첨가하였다. 웰을 격일로 TIL 클러스터의 발생에 대해 현미경을 통해 모니터링하였다. 각각의 웰에서 25개 초과의 TIL 마이크로클러스터가 검출되었을 때 웰을 개별적으로 옮겼다. TIL 배양물을 분할하기 위해, 24-웰 플레이트의 웰 내의 세포를 2 mL 배지 중에 재현탁시키고, 6-웰 플레이트의 웰 내로 옮겼다. 각각의 웰을 추가로 또 다른 2 mL의 TIL 배지로 보충하였다.

[0616] 10-14일의 총 배양 기간 후에, TIL을 수거하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 세포를 염색 완충제 (5% FCS 및 5 mM EDTA를 함유하는 D-PBS) 중에 1:50으로 모두 희석된 하기 시약에 의해 염색하였다: 항-인간 CD4-FITC (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec), 카탈로그 번호 130-080-501), 항-인간 CD3-PE-Cy7 (비디 파밍겐(BD Pharmingen), 카탈로그 번호 563423), 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD, 베크만 쿨터(Beckman Coulter), 카탈로그 번호 A07704), 항-인간 CD56-APC (이바이오사이언스, 카탈로그 번호 17-0567-42), 및 항-인간 CD8-PE (TONBO, 카탈로그 50-0088). 상이한 처리군들 사이에서의 획득된 세포의 정량적 비교를 가능하게 하기 위해, 세포 펠릿을 마지막 세척 단계 후에 비디™ 콤프비즈(CompBeads) (비디 바이오사이언시스(BD biosciences), 카탈로그 번호 51-90-9001291)가 보충된 FACS-완충제 중에 재현탁시켰다. 비디 FACS칸토(FACSCanto)™ II 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨) 상에서 유동 세포측정 분석을 수행하고, 획득된 데이터를 플로우조 7.6.5 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 6-웰 플레이트 내의 상응하는 웰과 상관관계가 있는 1,000개 비드당 상대 생존 TIL 수, $CD3^+CD8^+$ T 세포 수, $CD3^+CD4^+$ T 세포 수 및 $CD3^-CD56^+$ NK 세포 수를 획득된 비드 수에 대한 획득된 7AAD-음성 세포 분획의 정규화에 의해 계산하였다.

[0617] 도 10은 인간 비소세포 폐 암종 조직 시편으로부터의 TIL 확장의 분석을 보여준다. 여기서, 하기 농도: 0.01, 0.1 및 1 μg/mL의 CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR을 첨가하고; 항체 첨가가 없는 동일한 환자로부터의 조직 시편은 음성 대조군으로서의 역할을 하였다. 10일의 배양 후에, TIL을 수거하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 24-웰 플레이트의 상이한 웰로부터 유래된 각각의 항체 농도에 대한 5개의 샘플 (5개의 원래 웰로부터)을 측정하였다. 이중특이적 항체와 함께 배양된 모든 샘플에서, TIL의 생존 수는 항체가 없는 대조군 샘플과 비교하여 유의하게 증가하였다. 전체적으로, 0.1 μg/mL CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR을 배양물에 첨가하였을 때, 생존 TIL의 최대 10배 확장이 관찰되었다 (도 10A). $CD3^+CD4^+$ T 헬퍼 세포는 단지 약간만 확장되었고 (도 10C; 2.8배 확장), 반면 대조적으로, $CD3^-CD56^+$ NK 세포에 대해 가장 두드러진 TIL 확장이 관찰되었다 (도 10D; 대조군에 비해 최대 64배 확장). 또한, $CD3^+CD8^+$ 세포독성 T 림프구 (CTL)에 대한 강한 효과가 관찰되었다 (도 10B; 대조군에 비해 7.4배 확장).

[0618] 실시예 10: OT-I CD8+ 입양 T 세포 전달 후 C57BL/6 마우스에서의 오브알부민 특이적 T 세포 증식에 대한 mPD-L1 및 mCD137에 결합하는 대용 이중특이적 마우스 항체의 효과

[0619] 제어된 Fab-아암 교환을 기초로 뮤린 이중특이적 항체를 생성하는 방법을 사용하여, 대용 마우스 이중특이적 항체 mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 및 mPD-L1-MPDL3280Axb12를 생성하였다 (Labrijn et al., 2017 Sci Rep. 7(1): 2476 및 WO2016097300).

[0620] 마우스 4-1BB에 결합하는 모노클로날 항체 3H3을 바이오엑셀(BioXcell) (카탈로그 번호 BE0239)로부터 입수하고, 단백질을 프롯테크(ProtTech)에서 서열분석하였다. 추론된 cDNA 서열을 독점적 방법을 사용하여 제외시켰다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 유전자 합성하고, 하기 아미노산 돌연변이: L234A, L235A, F405L 및 R411T를 함유하는 뮤린 IgG2a 불변 영역을 포함하는 마우스 IgG2a 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 유사하게, b12의 가변 영역을 이러한 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0621] 항체 MPDL3280A (각각 서열식별번호: 57 및 58에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 서열)는 인간 및 마우스 PD-L1 둘 다에 결합하는 것으로 기재되었다. 이 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 하기 아미노산 돌연변이: L234A, L235A, T370K 및 K409R을 함유하는 뮤린 IgG2a 불변 영역을 포함하는 마우스 IgG2a 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0622] 이중특이적 마우스 (본질적으로 래트-인간-마우스 키메라) 항체를 상기 기재된 바와 같이 제어된 환원 조건 하에서 Fab-아암-교환에 의해 생성하였다.

[0623] 17 내지 24 g의 체중을 갖는 6-8주령의 암컷 C57BL/6JOlaHsd 마우스 (엔비고 RMS 게임베하(Envigo RMS GmbH), 독일 로스도르프)를 연구 등록 전 적어도 6일 동안 동물 시설에 순응시켰다. 이들 마우스를 수용자로서 사용하

였다. OT-1 및 Thy1.1 대립유전자 둘 다에 대해 동형접합인 암컷 또는 수컷 C57BL/6 Thy1.1 x C57BL/6J OT-1 마우스를 사내 사육하고 (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl 및 B6.PL-Thy1a/CyJ 마우스로부터 교배-사육), 공여자로서 사용하였다. 마우스는 음식물 (오토클레이브가능한 스니프(ssniff) M-Z, 독일 조스트) 및 멸균수에 자유롭게 접근하였고, 22℃ ± 2℃에서 55% ± 15%의 상대 습도로 12시간 명/암 주기 하에 수용하였다.

[0624] 연구 시작일에, C57BL/6 Thy1.1 x C57BL/6J OT-1 공여자 마우스를 희생시키고, 비장을 단리하였다. 비장을 기계적으로 해리시키고, 비장세포 펠릿을 적혈구-용해 완충제 (8.25 g/L $NH_4Cl$, 1 g/L $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA, pH7)로 재현탁시킴으로써 적혈구를 용해시켰다. 후속적으로, 둘베코 PBS (DPBS)로 비장세포를 세척하고, 마우스 CD8a (Ly-2) 마이크로비드를 오토맥스 프로(autoMACS Pro) 분리기와 조합하여 사용함으로써 (둘 다 독일 베르기슈 글라트바흐 소재 밀테니 바이오텍 게엠베하) $CD8^+$ T 세포를 단리하였다. $CD8^+$/$OT\text{-}1^+$/$Thy1.1^+$ T 세포 (2.5-5x$10^5$개 세포)를 C57BL/6JOlaHsd 수용자 마우스당 200 μL의 총 부피로 안와후로 주사하였다. 입양 세포 전달 다음 날, 수용자 마우스를 항원 자극으로서 100 μg 오브알부민/200 μL PBS에 의해 안와후로 '백신접종'하였다. 6시간 후, 마우스를 각각의 이중특이적 항체에 의해 안와후로 처리하였다. 상세하게, 마우스당 100 μg 또는 20 μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 또는 mPD-L1-MPDL3280Axb12 항체를 주사하였다. 기준선 참조로서 순 PBS 주사를 사용하고, 음성 대조군으로서 비처리 동물 (공여자 세포만을 받은 마우스)을 사용하였다. 6일 후, 100 μL 혈액을 안와후 경로를 통해 채취하고, V500 래트 항-마우스 CD45 (벡톤 디킨슨 게엠베하, 카탈로그 번호 561487), FITC 래트 항-마우스 CD8a (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 MCD0801) 및 알렉사 플루오르 647 항-래트 CD90/마우스 CD90.1 (바이오레전드 유럽(BioLegend Europe), 카탈로그 번호 202508) 항체를 사용하여 비디 FACS칸토 II 세포측정기 (벡톤 디킨슨 게엠베하) 상에서 $Thy1.1^+CD8^+$ T 세포에 대해 분석하였다. OT-1 특이적 T 세포에 대한 대용물로서 양성 Thy1.1 (CD90.1)을 사용하였다.

[0625] 도 11A는 OT-1 입양 T-세포 전달 검정 윤곽의 개략적 표현이다. 도 11B는 유동 세포측정법에 의해 결정된 $Thy1.1^+$ $CD8^+$ T-세포 빈도의 분석을 보여준다. 각각의 이중특이적 항체 치료 양식에 대해, n=5 마우스를 사용하였다. 오브알부민 항원 자극 단독으로 비처리 동물과 비교하여 Thy1.1+ CD8+ T-세포 빈도의 검출가능한 증가를 유도하였다. 흥미롭게도, 1개의 비관련 b12 결합-아암을 갖는 1가 대조군 항체인 mCD137-3H3-xb12 및 mPD-L1-MPDL3280Axb12는 둘 다 오브알부민만으로 처리된 동물과 비교하여 오브알부민-특이적 OT-1 T-세포 확장을 부스팅할 수 없었다. 대조적으로, 이중특이적 항체 mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A는 시험된 두 용량 수준 (20 및 100 μg 항체)에서 10-20% $CD8^+$/$OT\text{-}1^+$/$Thy1.1^+$ T-세포 (총 T 세포 집단의 %)의 T-세포 빈도를 가져오는 OT-1 T 세포의 강한 증식을 유도할 수 있었다.

[0626] 실시예 11: 피하 동계 CT26 마우스 종양 모델에서 종양 성장에 대한 mPD-L1 및 mCD137에 결합하는 대용 이중특이적 마우스 항체 결합의 효과

[0627] 17 내지 24 g의 체중을 갖는 6-8주령의 암컷 BALB/c Rj 마우스 (장비에(Janvier), 프랑스 제네스트-St.-아일)를 연구 등록 전 적어도 6일 동안 순응시켰다. 마우스는 음식물 (오토클레이브가능한 스니프 M-Z, 독일 조스트) 및 멸균수에 자유롭게 접근하였고, 22℃ ± 2℃에서 55% ± 10%의 상대 습도로 12시간 명/암 주기 하에 수용하였다. CT26 세포를 ATCC® (카탈로그 번호 CRL-2638™)로부터 입수하고, 37℃에서 5% $CO_2$ 하에 10% 태아 소 혈청 (FBS) (바이오크롬, 카탈로그 번호 S 0115)이 보충된 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지 (RPMI) 1640 배지인 글루타맥스™ (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 61870-044)에서 배양하였다. 세포를 스템프로(StemPro)® 아큐타제(Accutase)® 세포 해리 시약 (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 A1110501)을 사용하여 수거하고, DPBS (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 14190-169) 중에 재현탁시키고, 마우스당 0.5 x $10^6$개 세포/100 μl를 암컷 BALB/c Rj 마우스의 우측 면도된 측복부 내에 피하로 (SC) 이식하였다. 종양 부피를 2-3일마다 캘리퍼 측정에 의해 평가하고, 하기 식을 사용하여 수직 직경의 곱으로서 표현하였다: $a^2$ x b/2 (여기서 b는 2개의 직경 중 더 긴 것임 (a<b)). 30 $mm^3$의 평균 종양 부피에 도달하였을 때 동물을 4개의 군으로 계층화하였다. 다음 날 mPD-L1 및 mCD137에 결합하는 이중특이적 항체 (mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A) 20 μg, 1개의 비관련 결합 아암을 갖는 1가 mCD137- 또는 mPD-L1-대조군 항체 (mCD137-3H3xb12 및 mPD-L1-MPDL3280Axb12), 또는 음성 대조군으로서의 PBS를 복강내 주사하여 처리를 시작하였다. 투여 스케줄은 처음 8회 주사에 대해 2-3일마다, 이어서 실험 종료시까지 7일마다의 주사였다. 종양 세포 접종 후 제29일에, 100 μL 혈액을 안와후 경로를 통해 채취하고, V500 래트 항-마우스 CD45 (벡톤 디킨슨 게엠베하, 카탈로그 번호 561487), FITC 래트 항-마우스 CD8α (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 MCD0801) 항체 및 T-셀렉트 H-2Ld

MuLV gp70 사량체-SPSYVYHQF-APC (MBL Ltd. Corp., 카탈로그 번호 TS-M521-2)를 사용하여 비디 FACS칸토 II 세포측정기 (벡톤 디킨슨 게엠베하) 상에서 gp70-특이적 $CD8^+$ T 세포 (gp70은 CT26 종양 세포 상에서 발현된 외피 단백질임)에 대해 분석하였다.

[0628] 도 12A는 단일 종양/마우스를 나타내는 개별 세포주를 사용한 모든 4개의 처리군에 대한 종양 성장 곡선을 보여준다. 각각의 처리군에 대한 무진행 생존 (PFS) 빈도는 각각의 플롯의 하단에 제공된다. 도 12B는 종양 세포 접종 후 제71일에 실험 종료시까지의 상응하는 카플란-마이어 생존 곡선을 나타낸다. 도 12C는 유동 세포측정법에 의해 결정된 gp70 사량체$^+$ $CD8^+$ T-세포 빈도의 분석을 보여준다. 각각의 치료 양식에 대해, 종양 세포 이식 후 제29일에 여전히 살아있는 모든 마우스를 분석하였다. 요약하면, mPD-L1 및 mCD137에 결합하는 이중특이적 항체 (mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A)가 가장 효율적인 종양 제어를 제공하였고 10마리 중 5마리 (즉 50%) 동물이 완전한 종양 퇴행으로 진행되었다. 비교하면, mCD137-3H3xb12 대조군에 대해서는 약간 더 약하지만 여전히 현저한 항종양 효과가 관찰되었고; 처리는 11마리 중 3마리 (즉 27%) 동물이 종양을 거부할 수 있도록 하였다. 두 경우에서, 완전 완화 상태로 진행된 모든 마우스는 실험 종료시까지 무종양 상태로 유지되었다. 현저하게 대조적으로, mPD-L1-MPDL3280Axb12-처리된 코호트뿐만 아니라 PBS 대조군은 둘 다 종양 부담을 제어할 수 없었고, mPD-L1-MPDL3280Axb12-처리는 종양 세포 접종 후 제15일 내지 제30일에 11마리 중 2마리 (즉 18%) 동물에서 적어도 일부 간헐적 종양 성장 억제를 유도하였다. gp70 사량체에 결합할 수 있는 CD8+ T 세포의 빈도를 조사하였을 때, mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A 처리된 동물에서 가장 높은 gp70-특이적 CD8+ T-세포 빈도가 검출가능하였다 (2.14% ± 1.52%). 비교하면, mCD137-3H3xb12 (0.90% ± 0.46%), mPD-L1-MPDL3280Axb12 (0.94% ± 1.06%) 및 PBS-처리된 대조군 동물 (0.66% ± 0.49%)에서의 gp70 사량체$^+$ CD8- T-세포 빈도는 상기 3가지 치료 양식 사이에 단지 최소의 차이만을 가지면서 상당히 더 낮았다.

[0629] 실시예 12: 종양 세포에 대한 PD-L1 항체 또는 b12xPD-L1 이중특이적 항체의 결합

[0630] 인간 종양 세포주 MDA-MB-231 (유방 선암종; ATCC; 카탈로그 번호 HTB-26), PC-3 (전립선 선암종; ATCC; 카탈로그 번호 CRL-1435) 및 SK-MES-1 (폐 편평 세포 암종; ATCC; 카탈로그 번호 HTB-58)에 대한 PD-L1 항체 및 b12xPD-L1 이중특이적 항체의 결합을 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.

[0631] 세포 (3-5 x $10^4$개 세포/웰)를 폴리스티렌 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (그라이너 바이오-원, 카탈로그 번호 650101)에서 50 μL PBS/0.1% BSA/0.02% 아지드 (FACS 완충제) 중 항체의 연속 희석물 (5배 희석 단계로 0.0001 내지 10 μg/mL 범위)과 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충제 중에서 2회 세척한 후, 세포를 2차 항체와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 2차 항체로서, 50 μL FACS 완충제 중에 1:500 희석된 R-피코에리트린 (PE)-접합된 염소-항-인간 IgG $F(ab')_2$ (카탈로그 번호 109-116-098, 잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈, 인크.(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), 펜실베니아주 웨스트 그로브)를 모든 실험에 사용하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충제 중에서 2회 세척하고, 20 μL FACS 완충제 중에 재현탁시키고, iQue 스크리너 (인텔리사이트 코포레이션(Intellicyt Corporation), 미국) 상에서 분석하였다. 그래프패드 프리즘 V75.04 소프트웨어 (그래프패드 소프트웨어, 미국 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응)를 사용하여 결합 곡선을 분석하였다.

[0632] MDA-MB-231, PC-3 및 SK-MES-1 세포의 형질 막 상의 항원 밀도를 정량화하기 위해 MPDL3280A (각각 서열식별번호: 57 및 58에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 서열)를 사용하여 문헌 [Poncelet and Carayon, 1985, J. Immunol. Meth. 85: 65-74]에 기재된 바와 같이 정량적 유동 세포측정법 (QIFIKIT®, 다코(Dako); 카탈로그 번호 K0078)을 수행하였다. 세포주는 하기 PD-L1 항원 밀도 (ABC, 항체 결합 용량)를 갖는 것으로 결정되었다:

[0633] ● MDA-MB-231: 대략 21,000개 ABC/세포

[0634] ● PC-3: 대략 6,000개 ABC/세포

[0635] ● SK-MES-1: 대략 30,000개 ABC/세포

[0636] MDA-MB-231 세포에 대한 결합

[0637] 도 13 (A)는 MDA-MB-231 세포에 대한 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 용량-의존성 결합을 보여주며, 이는 단일특이적 2가 PD-L1-547-FEAR보다 더 높은 최대 결합을 갖는다.

[0638] PC-3 세포에 대한 결합

[0639] 도 13 (B)는 PC3 세포에 대한 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 용량-의존성 결합을 보여주며, 이는 단일특이적 2가 PD-L1-547-FEAR보다 더 높은 최대 결합을 갖는다.

[0640] SK-MES-1 세포에 대한 결합

[0641] 도 13 (C)는 SK-MES-1 세포에 대한 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR의 용량-의존성 결합을 보여주며, 이는 단일특이적 2가 PD-L1-547-FEAR보다 더 높은 최대 결합을 갖는다.

[0642] 실시예 13. 알라닌 스캐닝을 사용하는 항체 결합에 대한 CD137 아미노산 잔기의 기여의 결정.

[0643] 라이브러리 설계

[0644] 알라닌 또는 시스테인을 이미 함유하는 위치를 제외하고 인간 CD137의 세포외 도메인 내의 모든 아미노산 잔기를 알라닌으로 개별적으로 돌연변이시킨 CD137 (유니프롯 Q07011) 단일 잔기 알라닌 라이브러리를 합성하였다 (진아트(Geneart)). 항원의 구조적 파괴의 가능성을 최소화하기 위해, 시스테인은 돌연변이시키지 않았다. 알라닌을 갖는 위치를 글리신으로 돌연변이시켰다. CMV/TK-폴리A 발현 카세트, Amp 저항성 유전자 및 pBR322 복제 기점을 함유하는 pMAC 발현 벡터에서 라이브러리를 클로닝하였다.

[0645] 라이브러리 생산 및 스크리닝

[0646] 야생형 CD137 및 알라닌 돌연변이체를 제조업체의 지침 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 따라 프리스타일 HEK293 세포에서 개별적으로 발현시켰다. 형질감염 1일 후, 세포를 수거하였다. 대략 100,000개의 세포를 FACS 완충제 중에서 20 μL 알렉사 플루오르® 488- (A488-) 접합된 관심 항체와 함께 인큐베이션하였다 (표 3). 세포를 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 150-200 μL FACS 완충제를 사용하여 원심분리에 의해 2회 세척하였다. 세포를 30 μL FACS 완충제 중에 현탁시키고, iQue 스크리너를 사용하여 유동 세포 측정법에 의해 분석할 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0647] 전체 실험을 3중으로 수행하였다.

[0648] 표 3: 알라닌 스캐닝을 사용하여 항체 결합에서의 CD137 아미노산 잔기의 기여를 결정하는데 사용된 항체. 실험 수행 전에 제조업체의 지침에 따라 알렉사488 (인비트로젠, 카탈로그 번호 A20000)로 항체를 표지하였다. CD137-MOR7480-FEAR은 FEAR 돌연변이를 함유하는 인간 IgG1 백본 내로 클로닝된 대용 MOR7480 항체이다.

[0649]

| 항체 | 최종 농도 | 접합체 |
|---|---|---|
| b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488 | 3 μg/mL | 알렉사488 |
| CD137-005-FEAR-A488 | | |
| CD137-MOR7480-FEAR-A488 | | |

[0650] 데이터 분석

[0651] 모든 샘플에 대해, 세포당 결합된 항체의 평균 양을 생존 단일 세포 집단에 대한 형광 강도의 기하 평균 (gMFI)으로서 결정하였다. gMFI는 CD137 돌연변이체에 대한 항체의 친화도 및 세포당 CD137 돌연변이체의 발현 수준에 의해 영향을 받는다. 특정 알라닌 돌연변이가 돌연변이체 CD137의 표면 발현 수준에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 및 일반적으로 각각의 CD137 돌연변이체에 대한 발현 차이를 교정하기 위해, 하기 방정식을 사용하여 데이터를 비-교차 차단 CD137 특이적 대조군 항체의 결합 강도에 대해 정규화하였다:

[0652] $$정규화된\ gMFI_{aa\,위치} = Log_{10}\left(\frac{gMFI_{시험\,Ab}}{gMFI_{대조군\,Ab}}\right)$$

[0653] 여기서 'aa 위치'는 알라닌 또는 글리신으로 돌연변이된 위치를 지칭한다. 항체 결합의 상실 또는 획득을 표현하기 위해, 하기 계산식에 따라 z점수를 계산하였다:

[0654] $$z점수(배수\ 변화) = \frac{정규화된\ gMFI_{aa\,위치} - \mu}{\sigma}$$

[0655] 여기서 μ 및 σ는 모든 돌연변이체로부터 계산된 정규화된 gMFI의 평균 및 표준 편차이다.

[0656] z점수 0은 참조 항체의 결합과 비교하여 특정한 항체에 의한 결합의 상실 또는 획득이 존재하지 않는다는 것을 나타내고; z점수 >0은 참조 항체의 결합과 비교하여 결합의 획득을 나타내고; z점수 <0은 참조 항체의 결합과

비교하여 결합의 상실을 나타낸다. 대부분의 경우, z점수에 의해 결정된 결합의 획득은 특정 알라닌 또는 글리신 돌연변이체에 대한 참조 항체의 결합의 상실에 의해 유발된다. 샘플 변동을 교정하기 위해, 결합에 대한 z 점수가 - 1.5 미만인 CD137 아미노산 잔기만을 '결합 돌연변이체의 상실'로 간주하였다.

[0657] 특정한 CD137 돌연변이체에 대한 대조군 항체의 gMFI가 평균 $gMFI_{aa\ 위치}$ - 2.5 x 평균 $gMFI_{대조군\ Ab}$의 SD보다 더 낮은 경우, 데이터를 분석에서 제외시켰다 (이러한 CD137 돌연변이체에 대한 발현 수준이 결론을 이끌어내기에 충분하지 않은 것으로 가정됨).

[0658] 도 14는 위치 1 내지 163 (서열식별번호: 41에 따름)에서의 알라닌 또는 글리신 돌연변이를 갖는 CD137 변이체에 대한 CD137 항체의 결합의 상실을 보여준다. 결과는 하기를 나타낸다:

[0659] ● 항체 CD137-005-FEAR은 aa L1, Q2, P4, G11, T12, D15 또는 Q20을 알라닌으로 돌연변시켰을 때 결합의 상실을 나타냈다. 이는 항체 CD137-005-FEAR의 결합이 적어도 인간 CD137의 aa L1, Q2, P4, G11, T12, D15, Q20에 의존성임을 시사한다.

[0660] ● 항체 b12-FEALxCD137-009-FEAR은 aa F13, F30, T38, D40 또는 N60을 알라닌으로 돌연변이시켰을 때 결합의 상실을 나타냈다. 이는 항체 b12-FEALxCD137-009-FEAR의 결합이 적어도 인간 CD137의 aa F13, F30, T38, D40 및 N60에 의존성이라는 것을 시사한다. F13 및 F30이 에피토프 상호작용에 구조적으로 영향을 미칠 가능성이 가장 크기 때문에, 항체 b12-FEALxCD137-009-FEAR은 적어도 aa T38, D40 및 N60에 의존성이다.

[0661] ● 항체 CD137-MOR7048-FEAR은 aa L72, G93, F102, N103, I109, R111 또는 W113을 알라닌으로 돌연변이시켰을 때 결합의 상실을 나타냈다. 이는 항체 MOR7048의 결합이 적어도 인간 CD137의 aa L72, G93, F102, N103, I109, R111 및 W113에 의존성이라는 것을 시사한다.

[0662] 실시예 14: PD-L1 및 CD137에 결합하는 이중특이적 항체의 효과를 측정하기 위한 비-항원-특이적 T-세포 증식 검정

[0663] PD-L1xCD137 이중특이적 항체의 예상되는 작용 방식의 개략적 표현이 도 6에 제시된다.

[0664] 폴리클로날로 활성화된 T 세포에서의 T-세포 증식의 유도를 측정하기 위해, PBMC를 준최적 농도의 항-CD3 항체 (클론 UCHT1)와 함께, PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR 이중특이적 항체 또는 대조군 항체와 조합하여 인큐베이션함으로써 T 세포를 활성화시켰다. PBMC 집단 내에서, PD-L1을 발현하는 세포는 이중특이적 항체의 PD-L1-특이적 아암에 의해 결합될 수 있고, 반면 상기 집단 내의 T 세포는 CD137-특이적 아암에 의해 결합될 수 있다. 이 검정에서, T-세포 증식은 이중특이적 항체를 통한 PD-L1-발현 세포와의 가교 및 PD-L1:PD-1 상호작용의 차단에 의해 유도되는, CD137-특이적 아암을 통한 T 세포의 트랜스-활성화에 대한 척도이고, T-세포 증식으로서 측정된다.

[0665] PBMC를 피콜 구배 (VWR, 카탈로그 번호 17-5446-02)를 사용하여 건강한 공여자의 백혈구 연층 (독일 마인츠 소재 대학 병원 수혈센터)으로부터 수득하였다. 제조업체의 지침에 따라 PBS 중 1.6 μM 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE) (써모 피셔, 카탈로그 번호 C34564)를 사용하여 PBMC를 표지하였다. 96-웰 둥근 바닥 플레이트 (시그마 알드리치, CLS3799-50EA)에 웰당 75,000개의 CFSE-표지된 PBMC를 시딩하고, 5% 인간 AB 혈청이 보충된 150 μL IMDM 글루타맥스 중에서, 준-최적 T 세포 증식을 유도하기 위해 각각의 공여자에 대해 미리 결정된 준최적의 농도의 항-CD3 항체 (알앤디 시스템즈, 클론 UCHT1, 카탈로그 번호 MAB100; 0.03-0.1 μg/mL 최종 농도) 및 이중특이적 또는 대조군 항체와 함께 37℃, 5% $CO_2$에서 4일 동안 인큐베이션하였다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. FACS 완충제 중 PE-표지된 CD4 항체 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences), 카탈로그 번호 555347; 1:80 최종 희석), PE-Cy7-표지된 CD8α 항체 (클론 RPA-T8, 이바이오사이언스, 카탈로그 번호 25-0088-41; 1:80 최종 희석), APC-표지된 CD56 항체 (이바이오사이언스, 카탈로그 번호 17-0567; 1:80 최종 희석) 및 7-AAD (베크만 쿨터, 카탈로그 번호 A07704; 1:80 최종 희석)를 함유하는 30 μL를 사용하여 세포를 염색하고, $CD56^+$ 자연 킬러 (NK) 세포 및 $7\text{-}AAD^+$ 사멸 세포를 분석에서 제외시켰다. 샘플을 비디 FACS칸토 II 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 증식 판독값으로 측정하였다. 세포 분열을 나타내는 CFSE-피크에 기초한 T-세포 증식의 상세한 분석을 플로우조 10.4 소프트웨어에 의해 수행하고, 나온 확장 지수 값을 사용하여 그래프패드 프리즘 버전 6.04 (그래프패드 소프트웨어, 인크.)에서 용량-반응 곡선을 플롯팅하였다. 확장 지수는 전체 배양물의 배수-확장을 결정하며; 확장 지수 2.0은 세포 수의 배가를 나타내고, 반면 확장 지수 1.0은 전체 세포 수의 변화가

없음을 나타낸다.

[0666] 자극을 위한 2가지 상이한 항-CD3 농도 및 항-CD3이 없는 대조군을 시험하면서 3명의 상이한 공여자로부터의 PBMC를 분석하였다. 도 15는 이중특이적 항체 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR이 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 둘 다의 강한 확장을 유도하였다는 것을 보여준다. 1가 CD137-대조군 항체인 하나의 비관련 아암을 갖는 b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR 및 상응하는 2가 모 항체 CD137-009-HC7LC2-FEAR은 이소형 대조군 항체 b12 IgG와의 인큐베이션과 비교하였을 때 $CD4^+$ (A) 또는 $CD8^+$ (B) T-세포 증식에 영향을 미치지 않았다. 1가 PD-L1-대조군 항체뿐만 아니라 2가 모 항체 (각각 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR 및 PD-L1-547-FEAR)는, 항-CD3에 의한 PBMC 자극이 이미 강한 T 세포 활성화를 유발하였을 때에만 (배지 단독 대조군에서 더 높은 확장 지수에 의해 관찰된 바와 같이) [공여자 1의 0.1 μg/ml 항-CD3 자극 참조]), b12 IgG와 비교하여 T-세포 증식을 약간 증진시켰다. 또한 조합된 1가 대조군 항체 (b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) 및 조합된 상응하는 모 항체 (CD137-009-HC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR)에 대해 1가 및 2가 PD-L1 대조군 항체와 대등한 T-세포 증식의 수준이 검출가능하였다. 그러나, 이중특이적 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR 항체에 의해 유도된 증식의 증진은 조합된 대조군 둘 다 (1가 및 2가)보다 우수하였다 (도 15).

[0667] 또 다른 독립적 연구에서 0.03 및 0.09 μg/mL 항-CD3에 의해 준최적으로 자극시킨, 2명의 공여자로부터 수득된 PBMC를 사용하여 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR에 대한 $EC_{50}$ 값을 결정하였다. 1 μg/mL에서 시작하여 0.15 ng/mL에서 끝나는 연속 희석물을 사용하여 PD-L1-547-FEAL xCD137-009-HC7LC2-FEAR을 검정하고, 이소형 대조군 항체로서 1 μg/mL의 b12-IgG-FEAL을 포함시켰다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포의 증식에 대해, 용량-반응 곡선을 생성하고 (도 16), $CD8^+$ T-세포 증식에 대해, 표 4에 제시된 바와 같이 $EC_{20}$, $EC_{50}$ 및 $EC_{90}$ 값을 또한 결정하였다.

[0668] 표 4. 비-항원-특이적 T-세포 증식 검정에 의해 측정된 $CD8^+$ T-세포 확장 데이터에 기초한, PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 $EC_{20}$, $EC_{50}$ 및 $EC_{90}$-값의 결정. 제시된 데이터는 4 파라미터 로그 피트에 기초하여 계산된 값이다 (도 16).

[0669]

| 공여자 | 항-CD3 [μg/ml] | $EC_{50}$ 값 [μg/ml] | 힐-기울기 | $EC_{20}$ 계산치 [μg/ml] | $EC_{90}$ 계산치 [μg/ml] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.03 | 0.01218 | 1.134 | 0.00359 | 0.08455 |
| 2 | 0.09 | 0.00689 | 0.635 | 0.00078 | 0.21917 |

[0670] 실시예 15: PD-L1 및 CD137에 결합하는 이중특이적 항체에 의해 유도된 시토카인 방출을 측정하기 위한 항원-특이적 $CD8^+$ T-세포 증식 검정

[0671] PD-L1 및 CD137을 표적화하는 이중특이적 항체 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR에 의한 시토카인 방출의 유도를 본질적으로 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행된 항원-특이적 검정에서 측정하였다.

[0672] T 세포에 2 μg의 PD-1-코딩 IVT RNA를 갖거나 갖지 않는 10 μg TCR α 쇄-코딩 RNA 및 10 μg TCR β 쇄-코딩 RNA를 전기천공으로 도입하였다. 전기천공된 T 세포를 CFSE-표지 (상기 기재된 바와 같음)하지 않고, 전기천공 직후, 5% 인간 AB 혈청이 보충된 신선한 IMDM 배지 (라이프 테크놀로지스 게엠베하, 카탈로그 번호 12440-061) 내로 옮겼다. iDC에 상기 기재된 바와 같이 5 μg 클라우딘-6 (CLDN6)-코딩 RNA를 전기천공으로 도입하였다. 밤새 인큐베이션한 후에, 상기 기재된 바와 같이 DC를 알렉사647-접합된 CLDN6-특이적 항체로 염색하고, T 세포를 항-마우스 TCR β 쇄 항체 및 항-인간 CD279 항체로 염색하였다.

[0673] 5,000개의 전기천공된 DC를 96-웰 둥근 바닥 플레이트 내 5% 인간 AB 혈청이 보충된 IMDM 글루타맥스 중에서 상이한 농도의 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR 이중특이적 항체 또는 대조군 항체 b12xIgG-FEAL의 존재하에 50,000개의 전기천공된 T 세포와 함께 인큐베이션하였다. 48-시간 인큐베이션 기간 후, 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 각각의 웰로부터 새로운 96-웰 둥근 바닥 플레이트로 조심스럽게 옮기고, MSD® 플랫폼 상에서의 시토카인 분석시까지 -80℃에서 저장하였다. 항원-특이적 증식 검정으로부터 수집된 상청액을 제조업체의 지침에 따라 메소 퀵플렉스 SQ 120 기기 (메소 스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨.(Meso Scale Diagnostics, LLC.), 카탈로그 번호 R31QQ-3) 상에서 MSD V-플렉스 인간 염증유발 패널 1 (10-플렉스) 키트 (메소 스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨., 카탈로그 번호 K15049D-2)에 의해 10종의 상이한 시토카인의 시

토카인 수준에 대해 분석하였다.

[0674] PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 첨가는 주로 IFN-γ, TNF-α, IL-13 및 IL-8 분비의 농도-의존성 증가를 일으켰다 (도 17). 모든 다른 시토카인 (IL-10, IL-12p70, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6)의 시토카인 수준은 대조군 항체 b12-IgG-FEAL로 처리된 공동-배양물에 대해 검출된 수준 초과로 상승하지 않았다. T 세포에 PD-1 RNA를 전기천공으로 도입하지 않은 T 세포:DC 공동-배양물을, T 세포에 2 μg PD-1 RNA를 전기천공으로 도입한 것과 비교하였을 때, PD-1 RNA 전기천공이 없는 공동-배양물에 대해 약간 더 높은 시토카인 수준이 검출가능하였다. 이는 PD-L1-547-FEALxCD137-009-FEAR 용량 반응 곡선뿐만 아니라 b12-IgG-FEAL 대조군 항체 값 둘 다에 대해 관찰되었다.

[0675] 실시예 16: PD-L1 및 CD137에 결합하는 이중특이적 항체에 의해 유도된 시토카인 방출을 측정하기 위한 항원-비특이적 시험관내 T-세포 증식 검정

[0676] PD-L1 및 CD137을 표적화하는 이중특이적 항체 PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR에 의한 시토카인 방출의 유도를 본질적으로 상기 (실시예 14) 기재된 바와 같이 수행된 항원-비특이적 시험관내 T-세포 증식 검정에서 측정하였다. 항체 첨가 48시간 후에 수집된 상청액의 멀티플렉스 샌드위치 면역검정에 의해, 10종의 염증유발 시토카인 (IFN-γ, TNF-α, IL-13, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6)의 시토카인 방출에 대한 트랜스-결합, 즉 각각의 표적에 대한 두 아암의 동시 결합의 효과를 분석하였다.

[0677] PBMC를 CSFE 표지 (상기 기재된 바와 같음)하지 않고, 단리 직후 시딩하고, 단지 1가지 농도의 항-CD3 항체 (0.03 μg/mL 최종 농도)를 사용하였다.

[0678] 48-시간 인큐베이션 기간 후, 세포를 500 x g에서 5분 동안 원심분리에 의해 수집하고, 상청액을 각각의 웰로부터 새로운 96-웰 둥근 바닥 플레이트로 조심스럽게 옮기고, MSD® 플랫폼 상에서의 시토카인 분석시까지 -80℃에서 저장하였다. 수집된 상청액을 제조업체의 지침에 따라 메소 퀵플렉스 SQ 120 기기 (메소 스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨., 카탈로그 번호 R31QQ-3) 상에서 MSD V-플렉스 인간 염증유발 패널 1 (10-플렉스) 키트 (메소 스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨., 카탈로그 번호 K15049D-2)에 의해 10종의 상이한 시토카인의 시토카인 수준에 대해 분석하였다.

[0679] PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR의 첨가는 주로 IFN-γ, TNF-α, IL-2 및 IL-13 분비의 농도-의존성 증가를 유도하였다 (도 18). 또한 IL-10, IL-12p70 뿐만 아니라 IL-4에 대해서도 단지 약간 상승된 수준을 갖는 용량-반응 곡선이 검출가능하였다. IL-1β, IL-6 및 IL-8의 시토카인 수준은 기준선 수준에서 유지되었고, 따라서 대조군 항체 b12-IgG-FEAL로 처리된 공동-배양물에 대해 검출된 수준과 대등하였다.

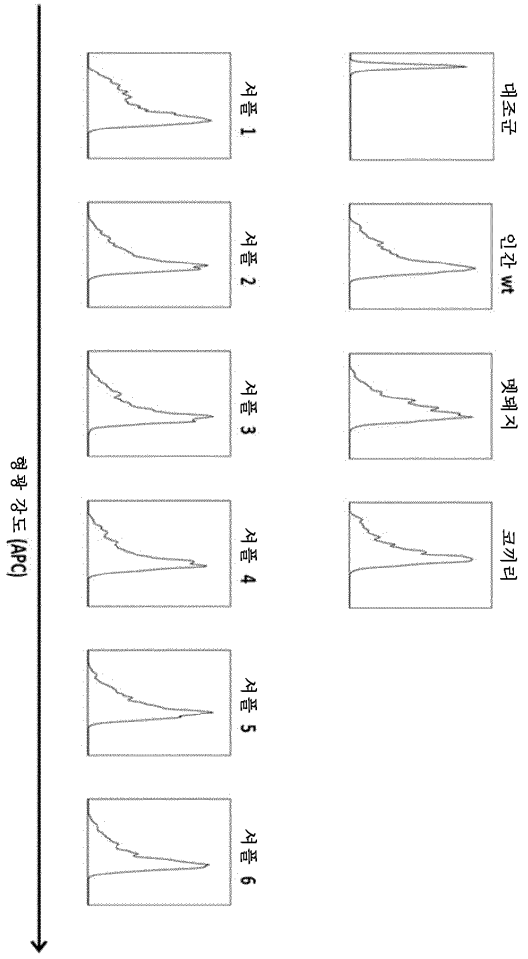
## 도면

### 도면1

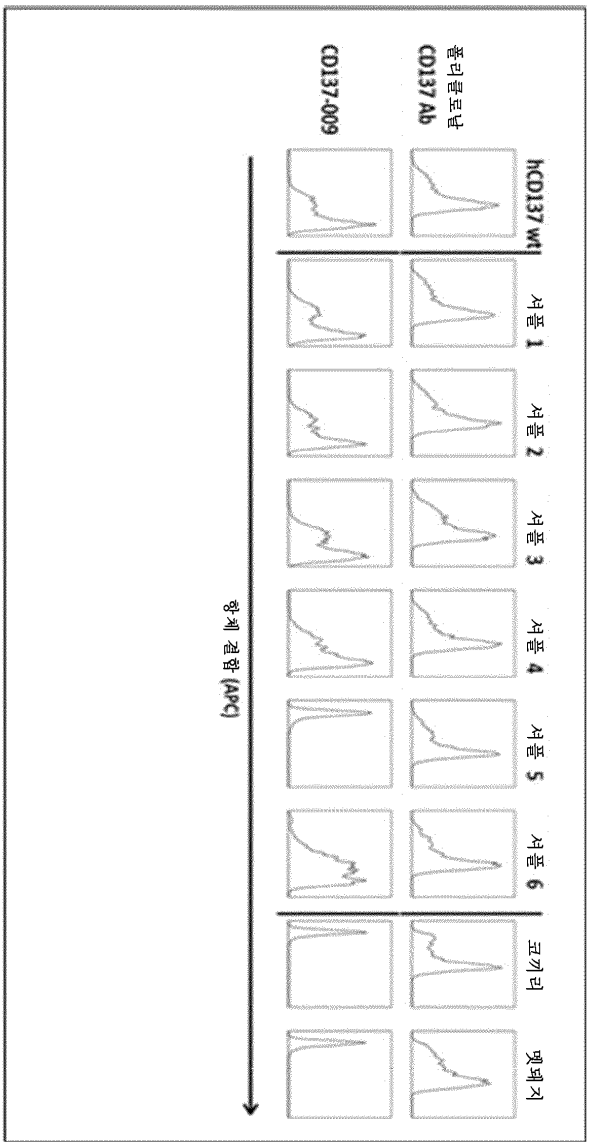
```
                          1                                                  50
  인간  (TNR9_HUMAN)    (1) -----MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC
코끼리 (XP_003413533)    (1) MQDFIMGNGYYNMVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGTYCVKNPSQIC
멧돼지 (XP_005665023)    (1) MQDFIMGNGYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCGKNIQDLC

                         51                                                 100
  인간  (TNR9_HUMAN)   (46) SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL
코끼리 (XP_003413533)   (51) SPCPLNSFSSTGGQMNCDMCRKCEGVFKTKKACSETRDAECECVSGFHCL
멧돼지 (XP_005665023)   (51) MPCPSNSFSSTSGQKACNVCRKCEGVFRTKKECSSTSNAVCECVPGFRCL

                        101                                                 150
  인간  (TNR9_HUMAN)   (96) GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS
코끼리 (XP_003413533)  (101) GAGCTMCQQDCKQGQELTKEGCKDCCLGTFNDQKNGICRPWTNCSLEGKS
멧돼지 (XP_005665023)  (101) GAGCAMCEEYCQQGQELTQEGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLAGKP

                        151                                                 200
  인간  (TNR9_HUMAN)   (146) VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALT
코끼리 (XP_003413533)  (151) VLANGTKKRDVVCGPEAADSFFDTSSVTVPAPERKPDHHPQIITFFLALI
멧돼지 (XP_005665023)  (151) VLMNGTKARDVVCGPRPTDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHVIIFFLALM

                        201                                                 250
  인간  (TNR9_HUMAN)   (196) STALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
코끼리 (XP_003413533)  (201) SAALLFLVFFLVVRFSVAKWGRKKLLYIFKQPFIKPVQTAQEEDGCSCRF
멧돼지 (XP_005665023)  (201) STAVFVLVSVLALRFSVVQQGRKKLLYIVKQPFLKPAQTVQEEDACSCRF
                        251

  인간  (TNR9_HUMAN)   (246) PEEEEGGCEL
코끼리 (XP_003413533)  (251) PEEEEGDCEL
멧돼지 (XP_005665023)  (251) PEEEEGECEL
```

도면2

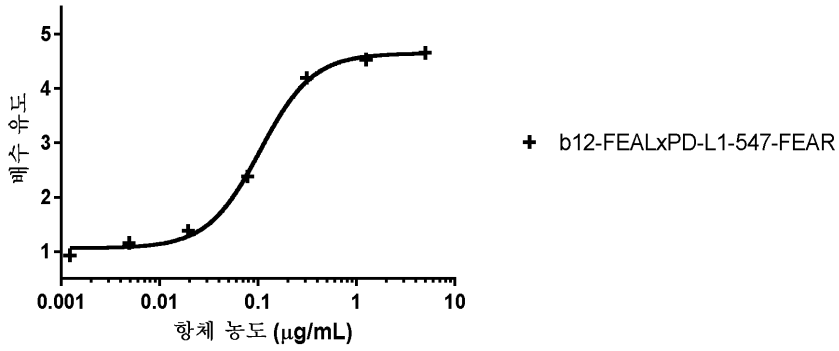
도면3



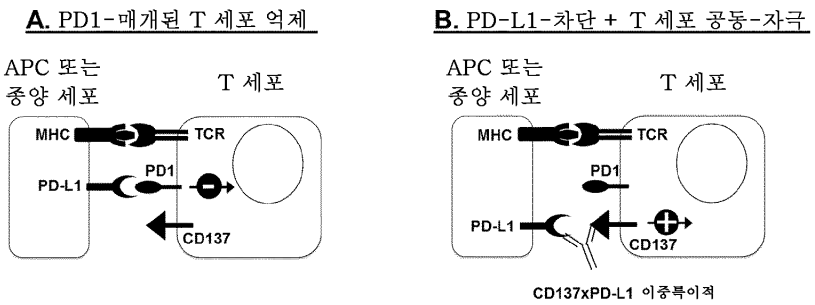
도면4


CD137-009
CD137 Ab
폴리클로날
hCD137 wt
셔플 1
셔플 2
셔플 3
셔플 4
셔플 5
셔플 6
코끼리
멧돼지
항체 결합 (APC)

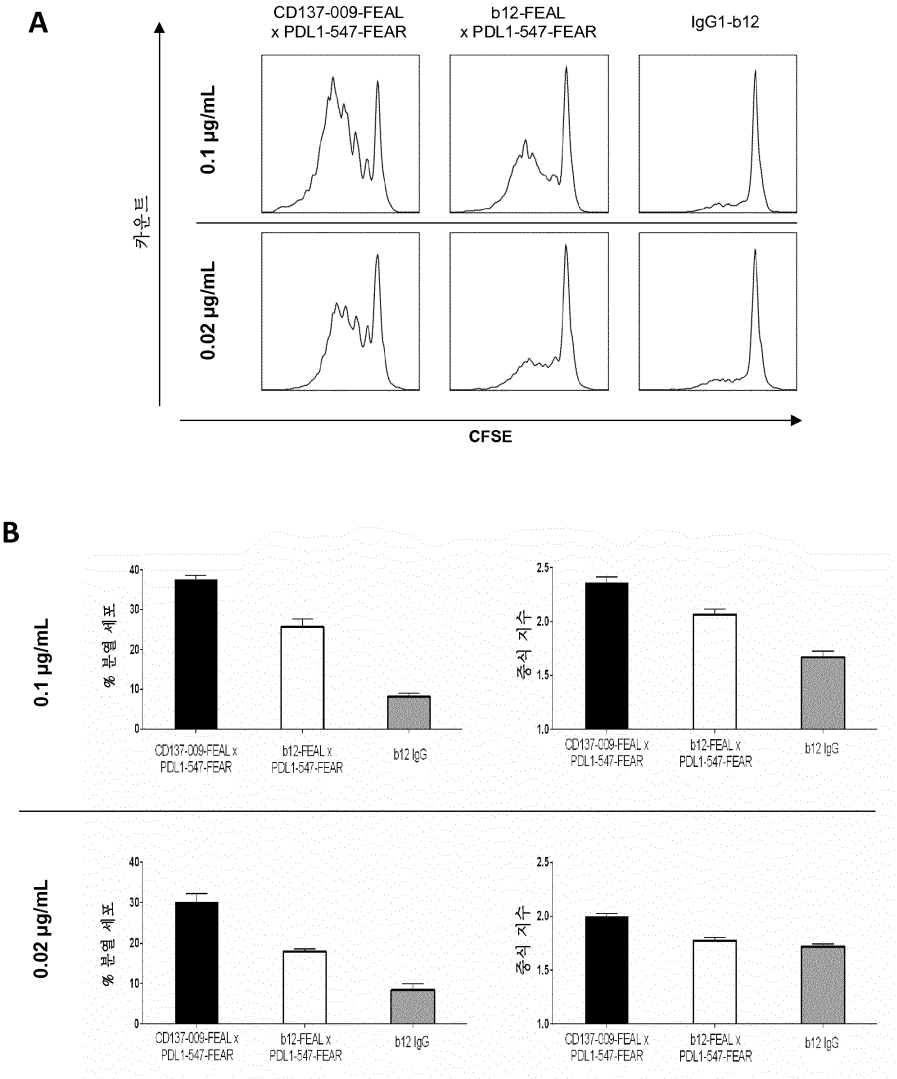
도면5


5
4
3
2
1
0.001
0.01
0.1
1
10
배수 유도
항체 농도 (μg/mL)
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR

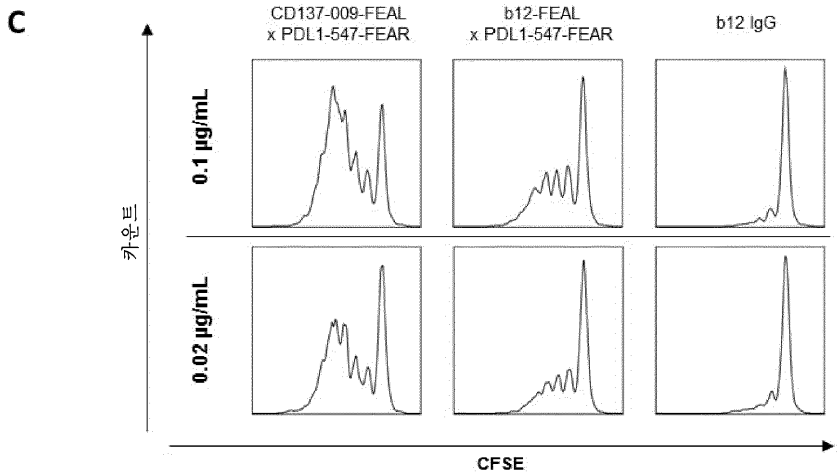
도면6


A. PD1-매개된 T 세포 억제
APC 또는
종양 세포
T 세포
MHC
TCR
PD-L1
PD1
CD137
B. PD-L1-차단 + T 세포 공동-자극
APC 또는
종양 세포
T 세포
MHC
TCR
PD1
PD-L1
CD137
CD137xPD-L1 이중특이적

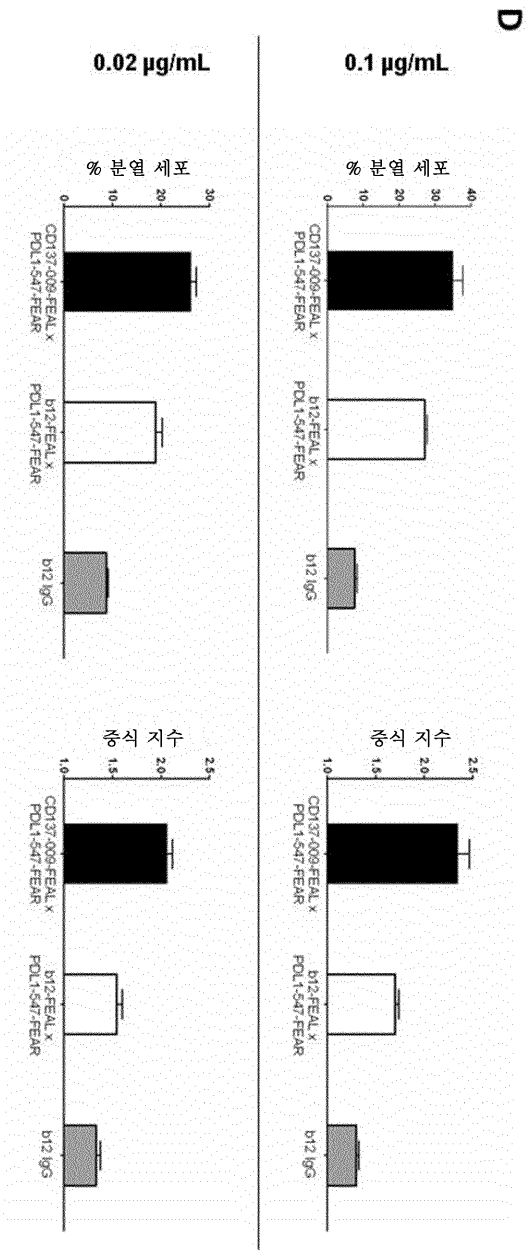
도면7ab


A
CD137-009-FEAL
x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL
x PDL1-547-FEAR
IgG1-b12
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
카운트
CFSE
B
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
% 분열 세포
증식 지수
CD137-009-FEAL x
PDL1-547-FEAR
b12-FEAL x
PDL1-547-FEAR
b12 IgG

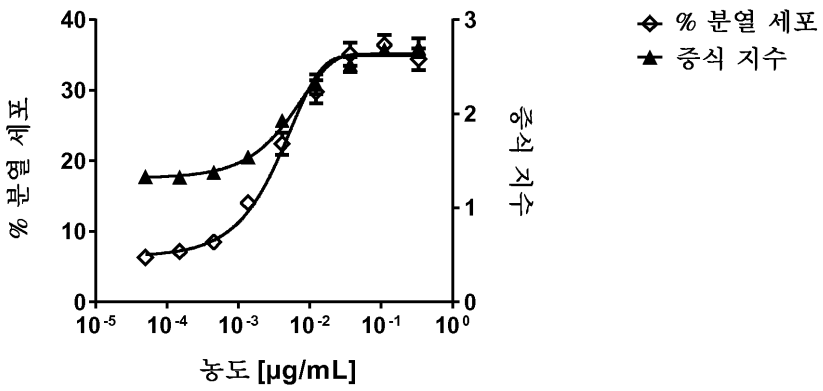
도면7c


C
CD137-009-FEAL
x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL
x PDL1-547-FEAR
b12 IgG
0.1 μg/mL
0.02 μg/mL
카운트
CFSE

도면7d

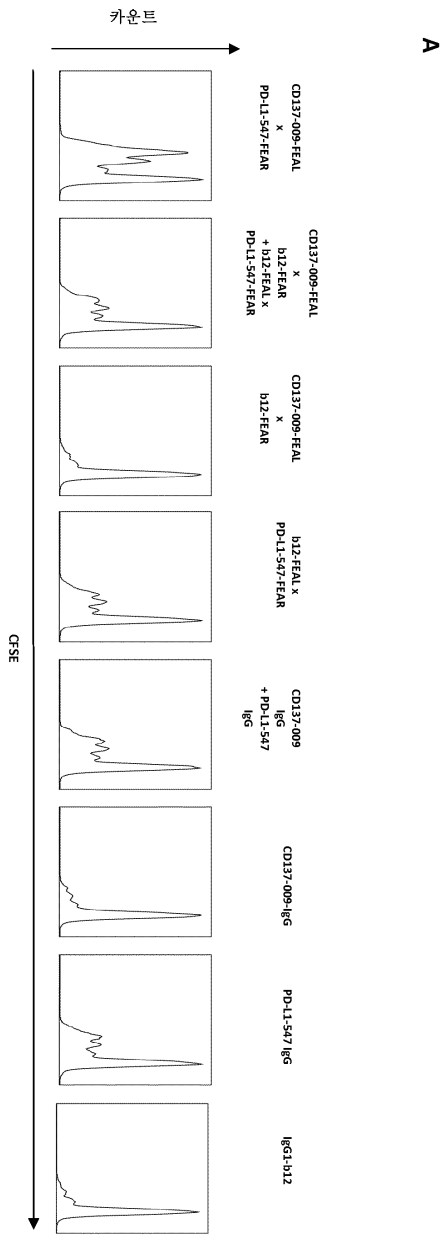

D
0.02 μg/mL
0.1 μg/mL
% 분열 세포
중식 지수
CD137-009-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12-FEAL x PDL1-547-FEAR
b12 IgG

도면8



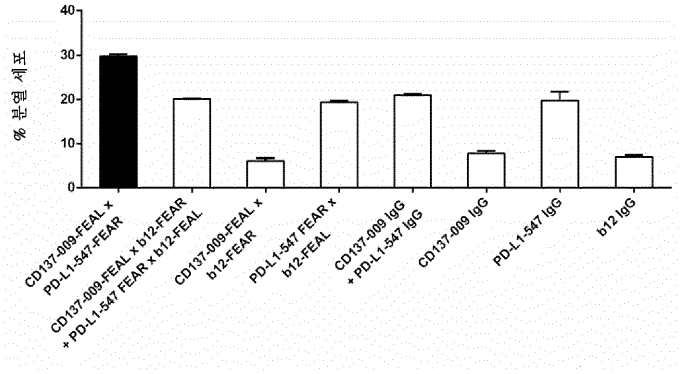

| | % 분열 세포 | 증식 지수 |
|---|---|---|
| $EC_{50}$ | 0.003492 μg/mL | 0.005388 μg/mL |

도면9a

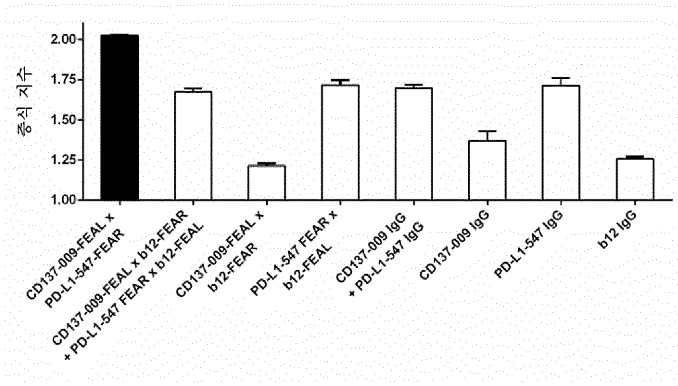

A
카운트
CFSE
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009-IgG
PD-L1-547 IgG
IgG1-b12

도면9bc

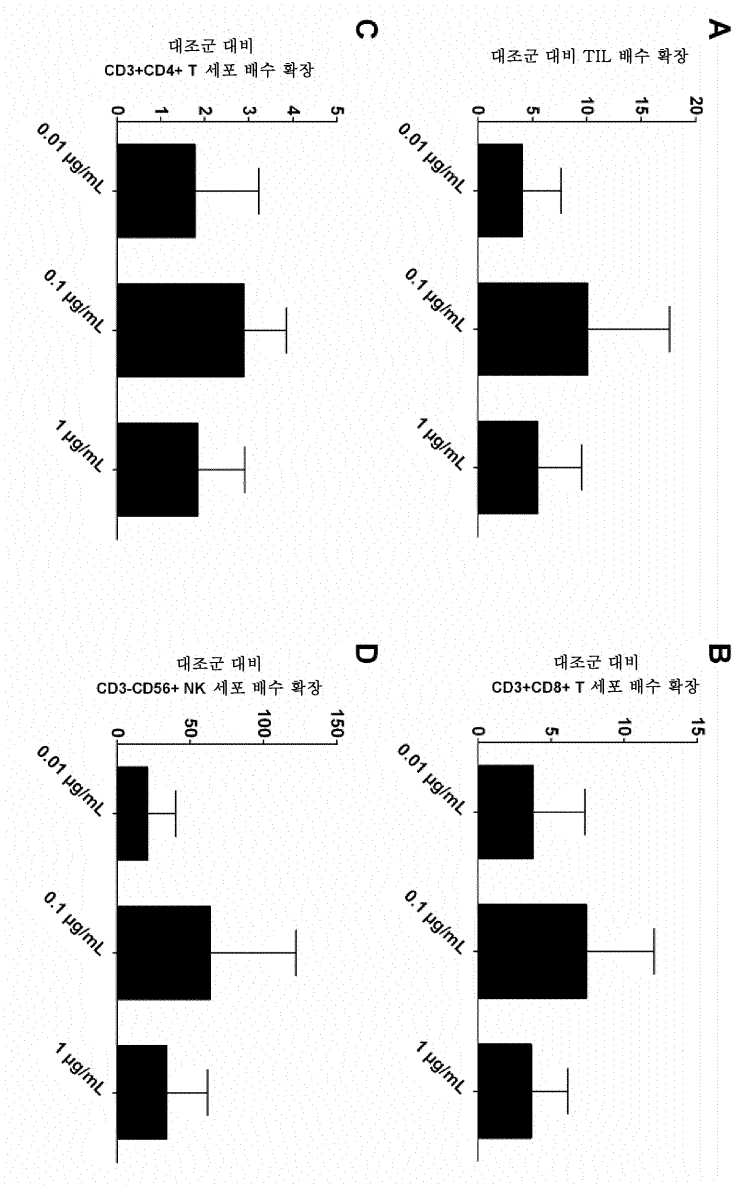
B


% 분열 세포
40
30
20
10
0
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009 IgG
PD-L1-547 IgG
b12 IgG

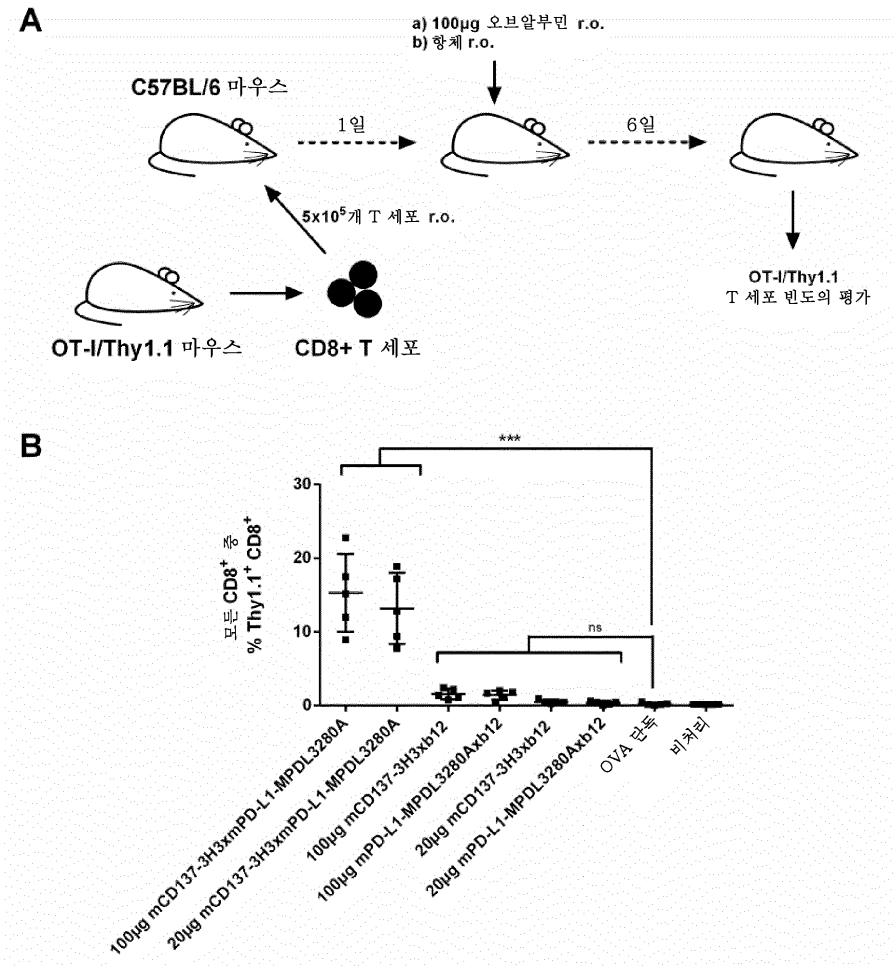
C


증식 지수
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
CD137-009-FEAL x PD-L1-547-FEAR
CD137-009-FEAL x b12-FEAR + PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009-FEAL x b12-FEAR
PD-L1-547 FEAR x b12-FEAL
CD137-009 IgG + PD-L1-547 IgG
CD137-009 IgG
PD-L1-547 IgG
b12 IgG

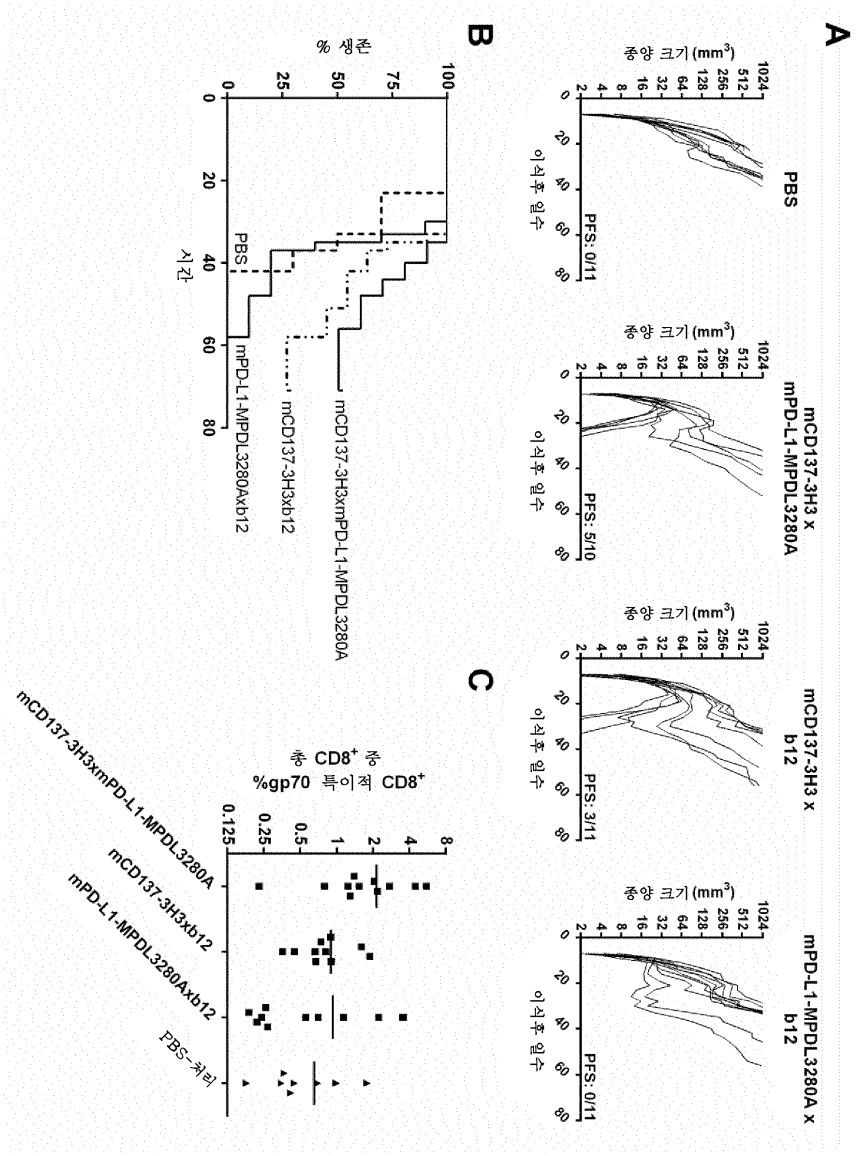
도면10


A
대조군 대비 TIL 배수 확장
0
5
10
15
20
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
B
대조군 대비
CD3+CD8+ T 세포 배수 확장
0
5
10
15
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
C
대조군 대비
CD3+CD4+ T 세포 배수 확장
0
1
2
3
4
5
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL
D
대조군 대비
CD3-CD56+ NK 세포 배수 확장
0
50
100
150
0.01 μg/mL
0.1 μg/mL
1 μg/mL

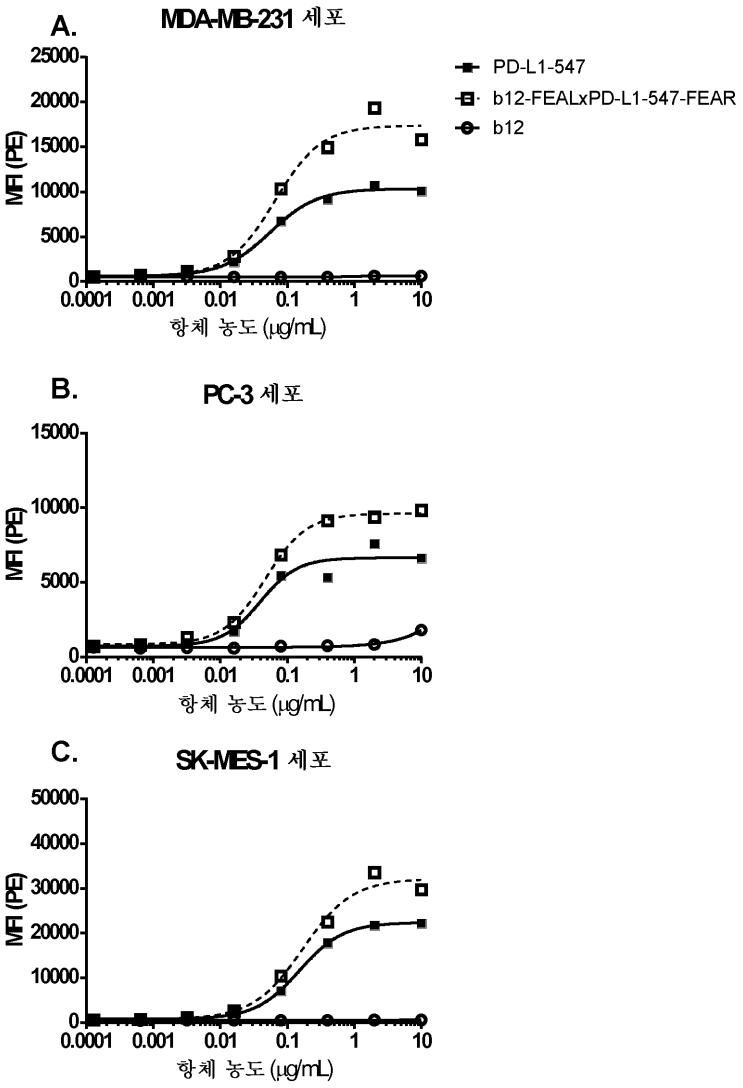
도면11


A
a) 100μg 오브알부민 r.o.
b) 항체 r.o.
C57BL/6 마우스
1일
6일
5x10^5개 T 세포 r.o.
OT-I/Thy1.1
T 세포 빈도의 평가
OT-I/Thy1.1 마우스
CD8+ T 세포
B
***
ns
모든 CD8+ 중
% Thy1.1+ CD8+
30
20
10
0
100μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
20μg mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
100μg mCD137-3H3xb12
100μg mPD-L1-MPDL3280Axb12
20μg mCD137-3H3xb12
20μg mPD-L1-MPDL3280Axb12
OVA 단독
비처리

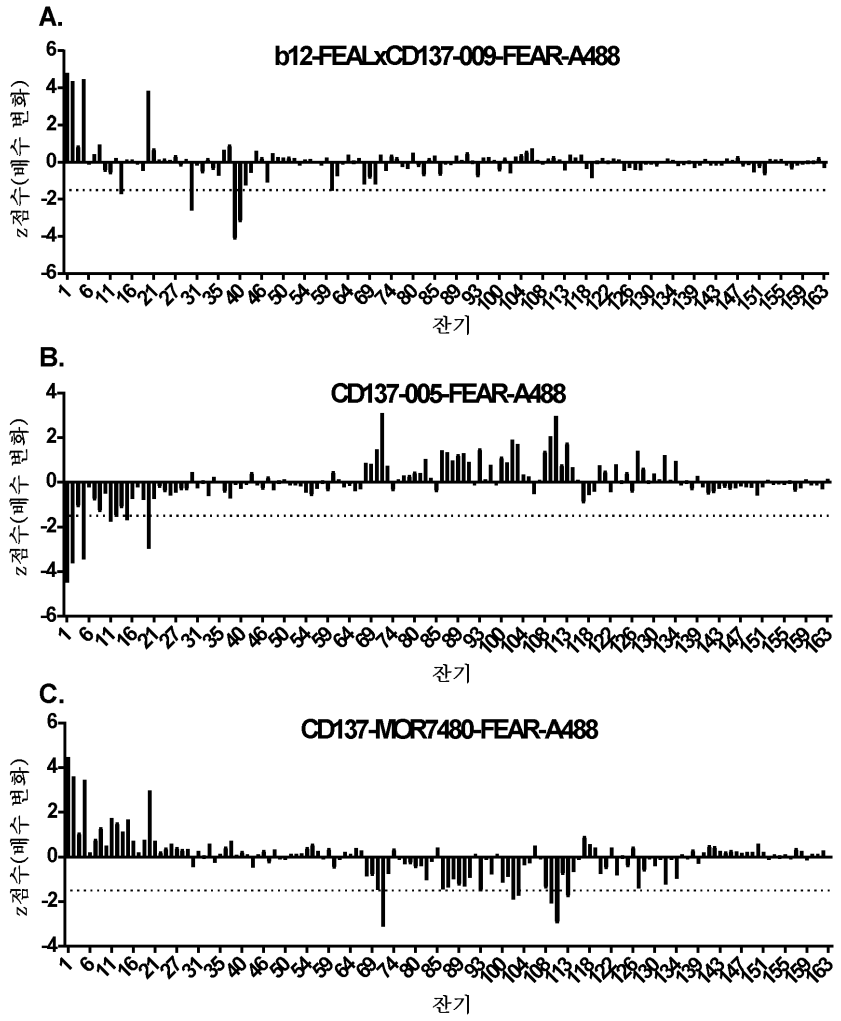
도면12


A
PBS
mCD137-3H3 x mPD-L1-MPDL3280A
mCD137-3H3 x b12
mPD-L1-MPDL3280A x b12
종양 크기 (mm3)
이식후 일수
PFS: 0/11
PFS: 5/10
PFS: 3/11
PFS: 0/11
B
% 생존
시간
PBS
mPD-L1-MPDL3280Axb12
mCD137-3H3xb12
mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
C
총 CD8+ 중 %gp70 특이적 CD8+
mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A
mCD137-3H3xb12
mPD-L1-MPDL3280Axb12
PBS-처리

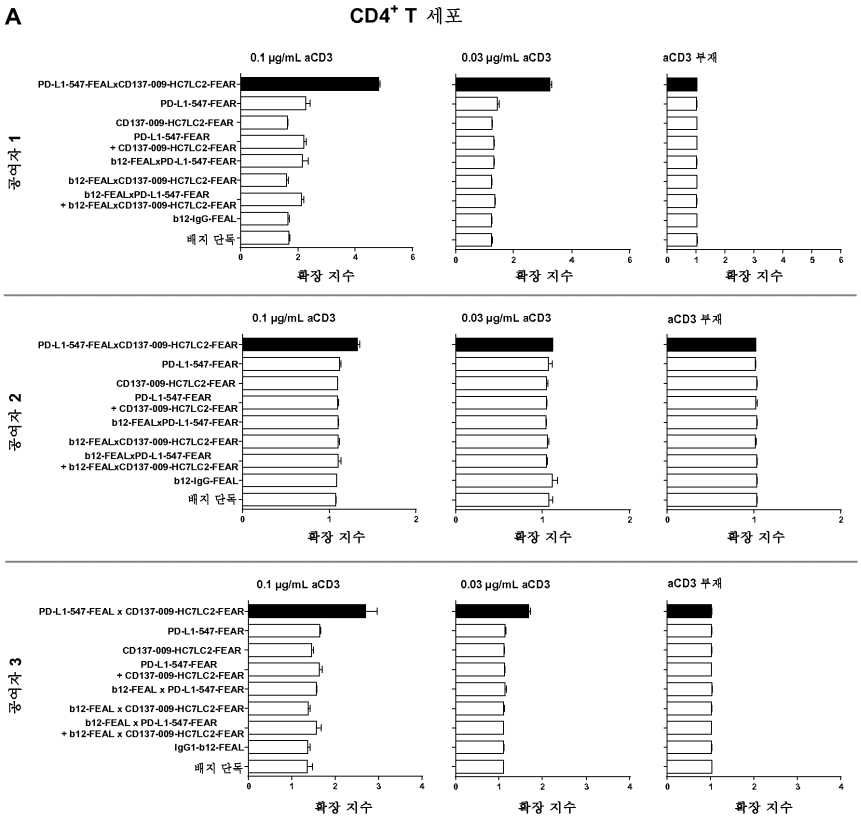
도면13


A.
MDA-MB-231 세포
MFI (PE)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 농도 (μg/mL)
PD-L1-547
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12
B.
PC-3 세포
MFI (PE)
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 농도 (μg/mL)
C.
SK-MES-1 세포
MFI (PE)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
항체 농도 (μg/mL)

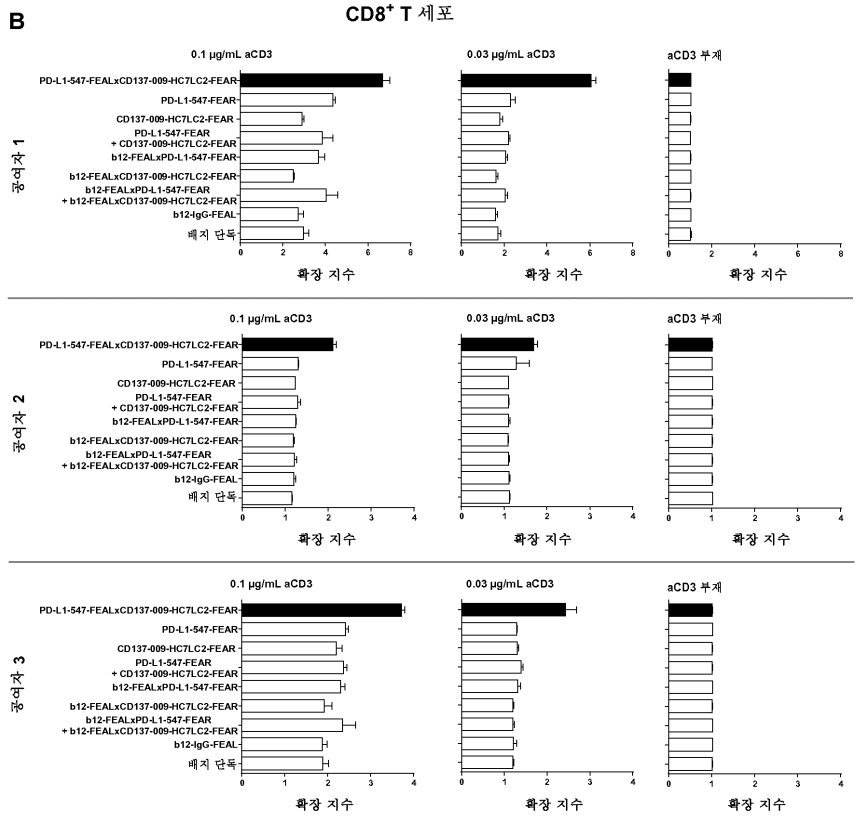
도면14


A.
b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488
z점수(배수 변화)
잔기
B.
CD137-005-FEAR-A488
z점수(배수 변화)
잔기
C.
CD137-MOR7480-FEAR-A488
z점수(배수 변화)
잔기

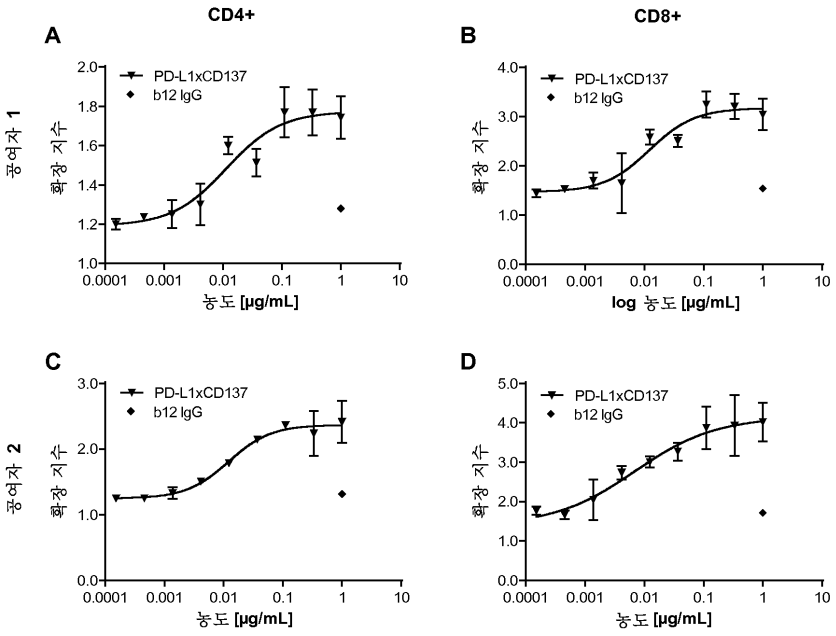
도면15a


A
CD4+ T 세포
0.1 μg/mL aCD3
0.03 μg/mL aCD3
aCD3 부재
공여자 1
공여자 2
공여자 3
PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR
CD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR + CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR + b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-IgG-FEAL
배지 단독
PD-L1-547-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR
b12-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEAL x PD-L1-547-FEAR + b12-FEAL x CD137-009-HC7LC2-FEAR
IgG1-b12-FEAL
확장 지수

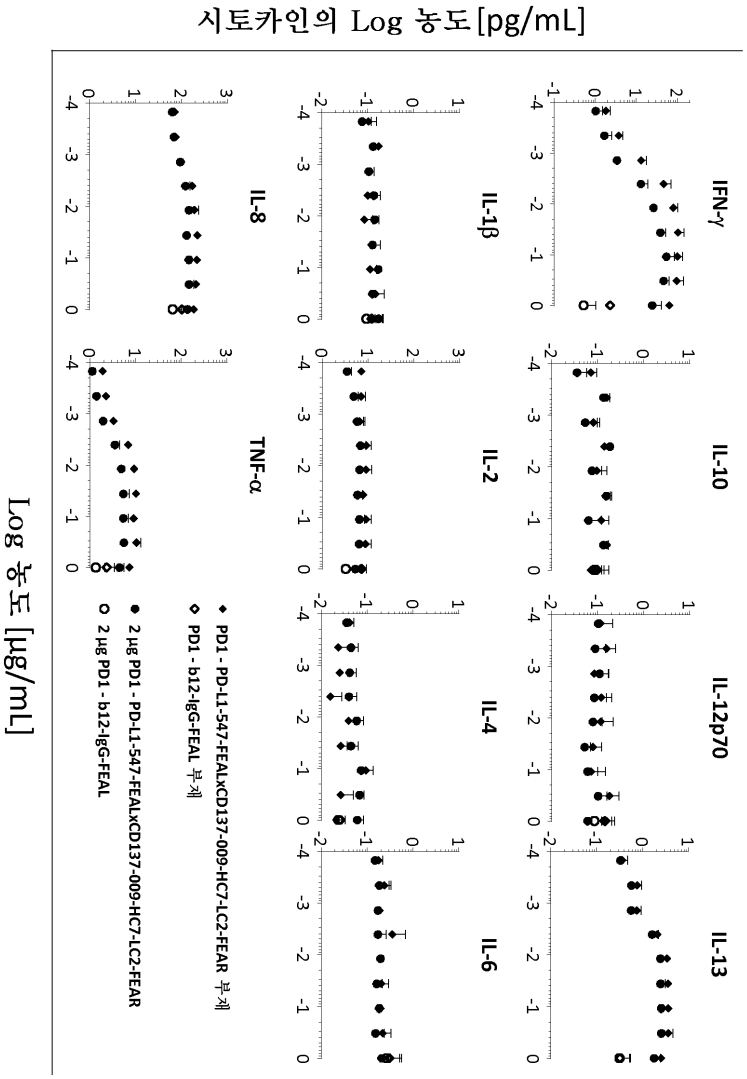
도면15b


B
CD8+ T 세포
0.1 μg/mL aCD3
0.03 μg/mL aCD3
aCD3 부재
공여자 1
공여자 2
공여자 3
PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR
CD137-009-HC7LC2-FEAR
PD-L1-547-FEAR + CD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR
b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-FEALxPD-L1-547-FEAR + b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR
b12-IgG-FEAL
배지 단독
확장 지수

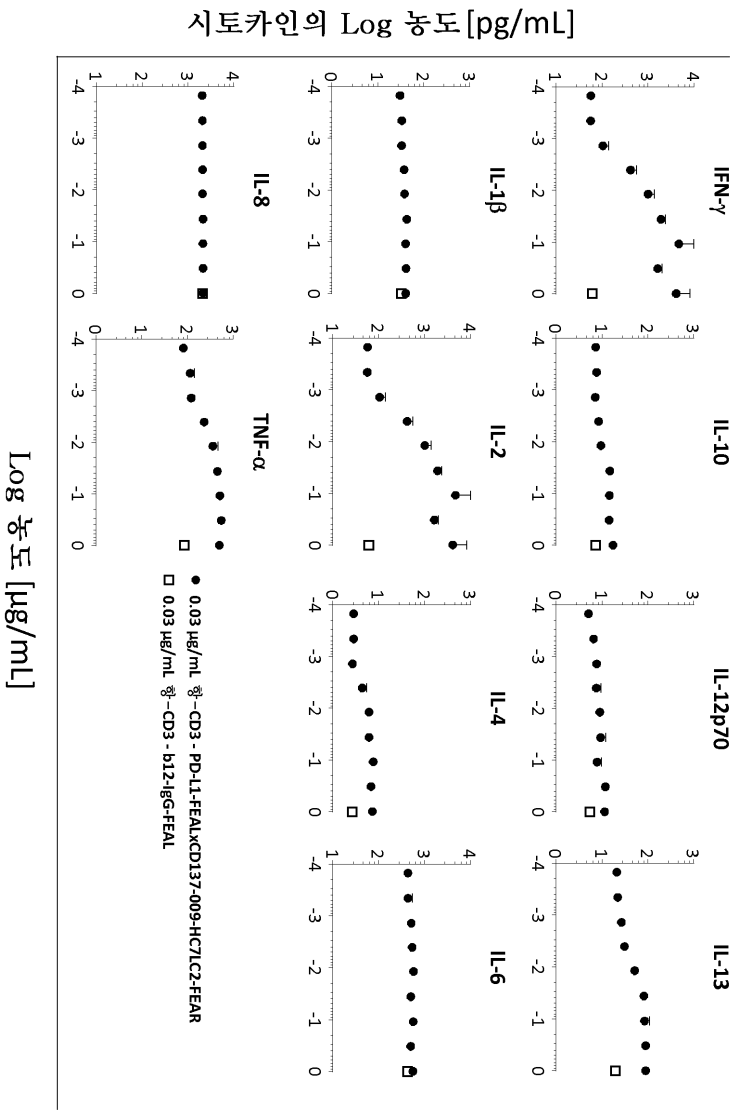
도면16


CD4+
CD8+
A
B
C
D
공여자 1
공여자 2
확장 지수
PD-L1xCD137
b12 IgG
농도 [μg/mL]
log 농도 [μg/mL]
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10

도면17


시토카인의 Log 농도[pg/mL]
IFN-γ
IL-10
IL-12p70
IL-13
IL-1β
IL-2
IL-4
IL-6
IL-8
TNF-α
PD1 - PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7-LC2-FEAR 부재
PD1 - b12-IgG-FEAL 부재
2 μg PD1 - PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7-LC2-FEAR
2 μg PD1 - b12-IgG-FEAL
Log 농도 [μg/mL]

도면18




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

BioNtech AG

Alintas, Isil

Satijn, David

Rademaker, Rik

Parren, Paul

Sahin, Ugur

Gieseke, Friederike

Muik, Alexander

<120> BINDING AGENTS BINDING TO PD-L1 AND CD137 AND USE THEREOF

<130> P/0116-WO-PCT[3]

<150> PCT/EP2017/069839

<151> 2017-08-04

<150> PCT/EP2018/052946

<151> 2018-02-06

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys

1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr

1 5 10 15

Tyr Met Asp Val

20

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys

100 105

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

His Ser Ile Arg Ser Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asp Tyr Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ile Asp Val Gly Gly Ser Leu Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 9

Gly Phe Ser Leu Asn Asp Tyr Trp

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 10

Ile Asp Val Gly Gly Ser Leu

1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 11

Ala Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ala Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly
85 90 95

Leu Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 13

Glu Asp Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 14

His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Gly Val Ala
1 5 10

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 15

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

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

Arg Gly Gly Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 16

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly
85 90 95

Leu Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

Gly Ser Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Phe Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr

1 5

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 20

Ala Ile Pro Ala Arg Gly Tyr Asn Tyr Gly Ser Phe Gln His

1 5 10

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35 40 45

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Leu Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 22

<

211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 with FEAR substitutions

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 with FEAL substitutions

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

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

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 27
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 27
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105
<210> 28
<211> 290
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<220><221> SIGNAL
<222> (1)..(18)

<400> 28
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

275 280 285

Glu Thr

290

<210> 29

<211> 290

<212> PRT

<213> Macaca Fascicularis

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(18)

<400> 29

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

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

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

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

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

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

Gly Ile Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu
275 280 285
Glu Thr
290

<210> 30
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<220><221> SIGNAL
<222> (1)..(23)
<400> 30
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 31

<211> 253

<212> PRT

<213> Macaca Fascicularis

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 31

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Phe Phe Leu Ala

180 185 190

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

195 200 205

Phe Ser Val Val Lys Arg Ser Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu

245 250

<210> 32

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 32

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Val Pro Asp Pro Cys Ser Asn Cys Ser

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Gly Lys Asn Ile Gln Glu Leu Cys Met Pro Cys

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Gly Gly Cys Glu Leu

195 200 205

<210> 33

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 33

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35 40 45

Pro Leu Asn Ser Phe Ser Ser Thr Gly Gly Gln Met Asn Cys Asp Met
50 55 60

Cys Arg Lys Cys Glu Gly Val Phe Lys Thr Lys Arg Ala Cys Ser Pro
65 70 75 80

Thr Arg Asp Ala Glu Cys Glu Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 34

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 34

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Val Pro Gly Phe Arg Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ala Met Cys Glu Glu Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Gln Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 35

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 35

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu

100 105 110

Thr Lys Glu Gly Cys Lys Asp Cys Ser Phe Gly Thr Phe Asn Asp Glu

115 120 125

Glu His Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asp Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 36

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 36

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln

115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Ala Gly Lys
130 135 140

Pro Val Leu Met Asn Gly Thr Lys Ala Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

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

245 250 255

<210> 37
<211> 255
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Human-Wild boar chimeric CD137
<220><221> SIGNAL
<222> (1)..(23)
<400> 37
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys

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

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

Ser Pro Thr Asp Phe Ser Pro Gly Thr Pro Ser Thr Thr Met Pro Val

165 170 175

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

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 38

<211> 255

<212> PRT

<213> Sus Scrofa

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 38

Met Gly Asn Gly Tyr Tyr Asn Ile Val Ala Thr Val Leu Leu Val Met

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Val Pro Asp Pro Cys Ser Asn Cys Ser

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Gly Lys Asn Ile Gln Glu Leu Cys Met Pro Cys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Cys Ala Met Cys Glu Glu Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Gln Glu Gly Cys Lys Asp Cys Ser Phe Gly Thr Phe Asn Asp Glu
115 120 125

Glu His Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asp Cys Ser Leu Ala Gly Lys
130 135 140

Pro Val Leu Met Asn Gly Thr Lys Ala Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Arg Pro Thr Asp Phe Ser Pro Gly Thr Pro Ser Thr Thr Met Pro Val
165 170 175

Pro Gly Gly Glu Pro Gly His Thr Ser His Val Ile Ile Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Met Ser Thr Ala Val Phe Val Leu Val Ser Tyr Leu Ala Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Gln Gln Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Val
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Leu Lys Pro Ala Gln Thr Val Gln Glu Glu Asp Ala
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 39

<211> 255

<212> PRT

<213> Loxodonta Africana

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<400> 39

Met Gly Asn Gly Tyr Tyr Asn Met Val Ala Thr Val Leu Leu Val Met
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Gly Ala Val Gln Asp Ser Cys Arg Asp Cys Leu
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Arg Asp Ala Glu Cys Glu Cys Val Ser Gly Phe His Cys Leu Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Val Leu Ala Asn Gly Thr Lys Lys Arg Asp Val Val Cys Gly Pro

145 150 155 160

Pro Ala Ala Asp Ser Phe Pro Asp Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ala

165 170 175

Pro Glu Arg Lys Pro Asp His His Pro Gln Ile Ile Thr Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Ile Ser Ala Ala Leu Leu Phe Leu Val Phe Phe Leu Val Val

195 200 205

Arg Phe Ser Val Ala Lys Trp Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Ile Lys Pro Val Gln Thr Ala Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Asp Cys Glu Leu

245 250 255

<210> 40

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 40

Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp
1 5 10 15

Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser
20 25 30

Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys
35 40

<210> 41

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 41

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

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

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

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

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
225 230

<210> 42
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH-CD137 with FEAR substitutions
<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

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

100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 43

Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr Trp

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 44

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 45

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr

1 5

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 47

Asn Ile Gly Asp Gln Tyr

1 5

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 48

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val

1 5 10

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ile Ile Thr Ser Ala Ser Thr Thr Ala Tyr Ala Thr Trp Ala Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser

85 90 95

Thr Tyr Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 50

Gly Phe Thr Ile Ser Asp Phe His

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 51

Ile Ile Thr Ser Ala Ser Thr Thr

1 5

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213

> Homo Sapiens

<400> 52

Ala Arg Ser Thr Tyr Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe

1 5 10 15

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 53

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

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

Asn Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Ala Ile Ser Asp Val
65 70 75 80

Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Asp Cys
85 90 95

Asp Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
100 105 110

Glu

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 54

Gln Ser Ile Tyr Asn Gly Asn Arg
1 5

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 55

Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Asp Ser Ala Asp Cys Phe Ala
1 5 10

<210> 56

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Recombinant human interleukin analog

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(20)

<400> 56

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Ser Glu Tyr Ala
115 120 125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 57

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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 Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30
Trp Ile His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Tyr
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr 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
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58
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 Ser 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 Gly 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 Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105